

Technische Universität München
Physik Department
Lehrstuhl für Biophysik, E22

Etablierung eines Modellsystems der
Zelladhäsion über spezifische Bindungen
geringer Affinität – eine
mikrointerferometrische Studie

Barbara G. Lorz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der
Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Friedrich
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
2. Univ.-Prof. Dr. J. O. Rädler,
Ludwig-Maximilian-Universität München

Die Dissertation wurde am 30.04.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 17.06.2003 angenommen.

Danksagung

Zu Beginn dieser Arbeit soll mein Dank an diejenigen stehen, ohne die ihr Entstehen nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst ist hier mein Doktorvater Herr Prof. Erich Sackmann zu nennen. Vielen Dank für Ihre Begleitung bei einem spannenden und aktuellen Thema, für viele interessante Diskussionen und die gute Atmosphäre, die durch Sie am Lehrstuhl herrscht.

Christian Gege hat mit viel Geduld das Sialyl-Lewis^X-Lipid in allen erdenklichen Variationen synthetisiert. Herzlichen Dank dafür!

Ana Smith wasn't only a terrific room mate, her way of 'building the bridge' between theory and experiment is just great. Thanks for a marvelous great time.

Paris ist immer eine Reise wert, besonders mit Steffi Gönnerwein. Vielen Dank fürs Korrekturlesen und vor allem die vergnüglichen Experimentiertage mit der magnetischen Pinzette.

Außerdem geht mein besonderer Dank an...

- meinen Bürogenossen Jörg Uhde ganz besonders für viele Diskussionen physikalischer und kulinarischer Natur.
- meinen Sportsfreund Ulf Rädler für Nachhilfe in Chemie und extraschnelles Korrekturlesen.
- Kheya Sengupta for her good mood, her help with nasty english sentences and the wonderful time we had (and hopefully will have).
- Frau Kirpal, die immer Rat in Chemiefragen wusste und die meinen Zusammenschreibfrust oft erfolgreich bekämpft hat.
- Jörg Schilling für die weltbeste Bildverarbeitungssoftware und Hilfe in Computerfragen (manchmal sogar Mac ...)
- Stephan Kaufmann für seine Hilfe mit der vertrackten Biochemie.

- die Damen im Chemielabor und die Herren in der Werkstatt, sowie Sonja Kraus und Claudine Voelcker dafür, dass alles so reibungslos wie möglich gelaufen ist.

- ganz E22 für eine schöne und mit Sicherheit unvergessliche Zeit.

Meinem lieben Freund Wolfgang danke ich für eine wunderschöne gemeinsame Doktorandenzeit, für viele gute Gespräche – auch für die über Physik, und fürs Korrekturlesen.

Meinem Bruder Christian möchte ich für die vielen guten Gespräche zur rechten Zeit danken.

Meinen Eltern, die mit ihrer Liebe immer hinter mir gestanden sind und manchmal mit überraschenden Carepaketen für große Begeisterung gesorgt haben. Jürgen, besonders vielen Dank fürs Korrekturlesen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Zusammenfassung	7
1 Einleitung	9
2 Aufbau des Systems	12
2.1 Vesikel	13
2.1.1 Zusammensetzung und Herstellung	13
2.1.2 Charakterisierung	16
Untersuchungen an Monoschichten	16
Untersuchungen an Vesikeln	21
2.2 Oberflächen	24
2.2.1 Zusammensetzung und Herstellung	24
2.2.2 Charakterisierung	26
3 Messmethoden	30
3.1 Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie RIKM	30
3.1.1 Aufbau des Mikroskops	30
Optischer Weg	31
Kontrastverbesserung durch die Antiflextechnik	31
3.1.2 Theorie der Bildentstehung	33
Partielle Kohärenz als Bedingung für Interferenz	33
Bestimmung der Höhe über dem Substrat	38
Rekonstruktion von Objektkonturen	39
3.2 Die magnetische Pinzette	40
3.3 Konfokale Mikroskopie	43
4 Betrachtung im Thermodynamischen Gleichgewicht	46
4.1 Theoretische Grundlagen	46
4.1.1 Wechselwirkungspotential der unspezifischen Adhäsion	47
Kolloidale Wechselwirkung	48
Entropische Beiträge	49

	Gravitation	51
	Gesamtpotential der unspezifischen Adhäsion	51
4.1.2	Zusätzliches Potential der spezifischen Adhäsion	51
4.1.3	Anwendung der lokalen Theorie zur Datenauswertung . . .	55
4.1.4	Anwendung der globalen Theorie zur Datenauswertung . .	58
4.1.5	Verbindung beider Theorien	59
4.2	Phasendiagramm der Adhäsionsstärke	60
4.2.1	Kriterien starker Adhäsion	60
4.2.2	Einfluss des reduzierten Volumens auf die Adhäsionsstärke	62
4.2.3	Einfluss der Konzentrationen von Rezeptor und Ligand . .	64
4.2.4	Einfluss der Polymer-Konzentration	66
4.2.5	Einfluss der Polymer-Länge	69
4.3	Diskussion der Ergebnisse	70
5	Adhäsions- und Entbindungsdynamik spezifisch adhärerter Vesikel	75
5.1	Experimente zur Adhäsionsdynamik	76
5.1.1	Einfluss der Systemzusammensetzung auf die globale Form des Flächenwachstums	76
5.1.2	Einfluss der E-Selektindichte auf das Kurzzeitverhalten der Adhäsionsdynamik	79
5.2	Ablösen der Vesikel durch Verschiebung des chemischen Potentials	82
5.2.1	Verwendung von löslichem Sialyl-Lewis ^X als Antagonist . .	84
5.2.2	Verwendung von Anti-E-Selektin als Antagonist	84
5.3	Diskussion	87
6	Störung des Systems durch eine Punktkraft — die magnetische Pinzette	91
6.1	Einführung	91
6.2	Theoretische Grundlagen	92
6.3	Verfahren zur Auswertung der Daten	96
6.4	Experimente mit der magnetischen Pinzette	99
6.4.1	Abhängigkeit der resultierenden Adhäsionsfläche von Systemaufbau und angreifender Linienkraft	101
6.4.2	Abhängigkeit der Relaxationszeit von Systemaufbau und angreifender Linienkraft	103
6.5	Diskussion	103
6.6	Anwendbarkeit bestehender Theorien	107
7	Ausblick	114

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein Modellsystem etabliert, das es erlaubt, neue Einblicke in die Wechselwirkungsmechanismen der Zell-Zell-Adhäsion zu gewinnen. Es ist dabei gelungen, die spezifische Wechselwirkung, die durch ein Rezeptor-Ligand-Paar mit geringer Affinität vermittelt wird, und deren Zusammenwirken mit unspezifischen (generischen) Wechselwirkungen sowohl im thermodynamischen Gleichgewicht als auch unter dem Einfluss einer äußeren Störung zu charakterisieren.

Dazu wird ein einfaches Modellsystem aufgebaut, das die wesentlichen Elemente enthält, die für die Zelladhäsion notwendig sind. Es besteht aus einschaligen Riesenvesikeln mit rekonstituierten Liganden, die als Testzellen dienen und festen Substraten mit adhären Rezeptoren, die als Zielzellen fungieren. Zusätzlich werden in die Vesikelmembran Lipopolymere inkorporiert, die die Glykokalix einer Zelle modellieren. Das verwendete Rezeptor-Ligand-Paar (das Membranprotein E-Selektin und das Glykolipid Sialyl-Lewis^X-Lipid) spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Migration von Leukozyten aus den Blutgefäßen ins entzündete Gewebe während der Immunantwort.

Es werden zunächst beide Teile des Adhäsionssystems getrennt charakterisiert: Das Glykolipid Sialyl-Lewis^X lässt sich in Konzentrationen bis zu 30% in eine Lipid-Cholesterol-Matrix einbauen, ohne Phasentrennung zu zeigen. Die auf der Oberfläche des Substrats immobilisierten E-Selektin-Proteine lassen sich in ihrer Dichte bis maximal 3250 Moleküle pro μm^2 variieren. Unspezifische Adhäsion wird durch die abschließende Passivierung der funktionalisierten Substrate mit Milchproteinen verhindert.

Die Adhäsionsstudien werden mit Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie durchgeführt, einer mikrointerferometrischen Technik, mit der das Oberflächenprofil der Vesikel in der Nähe des Substrats sehr genau analysiert werden kann. Dadurch kann u. a. das Wachstum der Kontaktfläche verfolgt und die Stärke der Adhäsion bestimmt werden. Bei der Betrachtung im thermodynamischen Gleichgewicht kann sowohl die Größe der Adhäsionsfläche, als auch die Stärke der Wechselwirkung durch Variation der Rezeptordichte auf der Oberfläche und der Repellerkonzentration im Vesikel erheblich verändert werden. Zusätzlich wird der Durchmesser der Polymere, die als Repeller dienen, verändert, indem Lipopolymere mit verschiedenen langen Polymerketten

verwendet werden. Haben die Repeller den gleichen Durchmesser wie die Liganden, so beträgt die maximale Adhäsionsfläche bei 1% Repellergehalt 50% der Gesamtfläche, die maximale Adhäsionsstärke $3 \cdot 10^{-7} \text{N/m}$. Eine Verkürzung der Polymere auf etwa die Hälfte des Durchmessers resultiert bei gleichem Polymeranteil in einer Vergrößerung der Adhäsionsstärke um das 10-fache. Die Variation des Ligandengehalts zwischen 8% und 15% hat keine Veränderung des Adhäsionsverhaltens zur Folge, was die in früheren Studien geforderte Polyvalenz dieses Liganden bestätigt. Außerdem kann der Einfluss des reduzierten Volumens der Vesikel auf die Stärke der Adhäsion nachgewiesen werden, da in dieser Arbeit erstmals ein theoretisches Modell zur Verfügung steht, das die Bestimmung des reduzierten Volumens aus den Interferenzbildern ermöglicht.

Auch die Adhäsionsdynamik wird untersucht, wobei hier ebenfalls die Konzentrationen aller beteiligten Moleküle verändert werden. Es ergibt sich ein dendritisches Wachstum aus mehreren spontan entstehenden Nukleationszentren, was das Modell des Adhäsionsübergangs als aktivierten Prozess erster Ordnung bestätigt und den großen Einfluss der repulsiven Polymere deutlich macht. Eine Verkleinerung des Polymerdurchmessers kann sogar zu einer qualitativen Veränderung der Adhäsionsdynamik führen.

In einem weiteren Schritt wird die Adhäsion außerhalb des thermodynamischen Gleichgewichts betrachtet. Dazu werden die Vesikel mit einer punktförmigen Kraft, die am oberen Pol des Vesikels angreift, angehoben. Durch die elastischen Eigenschaften der Lipidmembran wird diese Punktkraft in eine Linienkraft entlang der Kontaktlinie des adhärenierten Vesikels übertragen. Die Größe der Adhäsionsfläche lässt sich durch die Anwendung einer Linienkraft an der Kontaktlinie bis zu $8 \mu\text{N/m}$ verkleinern, sie stabilisiert sich auf einem neuen Niveau, das stark von der angelegten Kraft und der E-Selektindichte abhängt. Diese Relaxation folgt einem Exponentialgesetz, die charakteristischen Zeiten sind dabei ebenfalls von der Systemzusammensetzung abhängig.

Kapitel 1

Einleitung

Die Vielzahl der Prozesse, die nach einem hochkomplexen Muster ablaufen müssen, um Leben zu ermöglichen, ist scheinbar unbegrenzt. Sowohl der Metabolismus einer einzelnen Zelle, als auch der Aufbau und die Funktionalität von Geweben müssen durch chemische Reaktionen und physikalische Wechselwirkungen aufrecht erhalten werden. Einen wichtigen Anteil an diesen Reaktionen hat die Gruppe der Adhäsionsphänomene, die unter anderem in der Zell-Zell-Wechselwirkung eine entscheidende Rolle spielen. Diese Adhäsionsprozesse werden durch das äußerst sensitive Zusammenspiel von spezifischen und generischen Wechselwirkungspotentialen wie van der Waals-Wechselwirkung, Elektrostatik, Hydratation, oder hydrophober Effekt gesteuert, wobei die Exprimierung der beteiligten Moleküle an der Zelloberfläche wiederum durch komplexe Signalketten initiiert wird.

Als Adhäsionsmoleküle fungieren Rezeptoren und dazugehörige Liganden, die sowohl in ihren chemischen Eigenschaften als auch in ihrer räumlichen Konstruktion so aufeinander abgestimmt sind, dass sie ausschließlich aneinander binden. Man spricht daher auch von einem Schlüssel-Schloss-Mechanismus. Diese Bindung besitzt je nach Art des Rezeptor-Ligand-Paares unterschiedliche Wechselwirkungsstärken, ist aber immer reversibel (vgl. z.B. Alberts et al. 2002). Für die Regulation der generischen Wechselwirkungen sind die Moleküle der Glykokalix, bzw. der extrazellulären Matrix verantwortlich. Die Glykokalix besteht aus Glykolipiden und peripheren oder integralen Proteinen mit Zuckerresten. Sie wird als Zellmantel bezeichnet, da sie eine Schutzschicht für die Zellmembran darstellt. Sie übernimmt aber vor allem auch Aufgaben in der Zellkommunikation und der Zell-Zell-Wechselwirkung und kann dabei unter anderem Adhäsion vermitteln (vgl. Lodish et al. 2000).

Die Erforschung dieser besonderen Rolle bei der Zelladhäsion, die den Glykoproteinen und -lipiden zufällt, stellt heute einen Brennpunkt in Biologie, Biochemie und Medizin dar. Die Prozesse, bei denen die Kohlehydratwechselwirkung involviert ist, reichen dabei von der Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermium über wichtige Schritte in der Embryonalentwicklung bis zur Bekämpfung

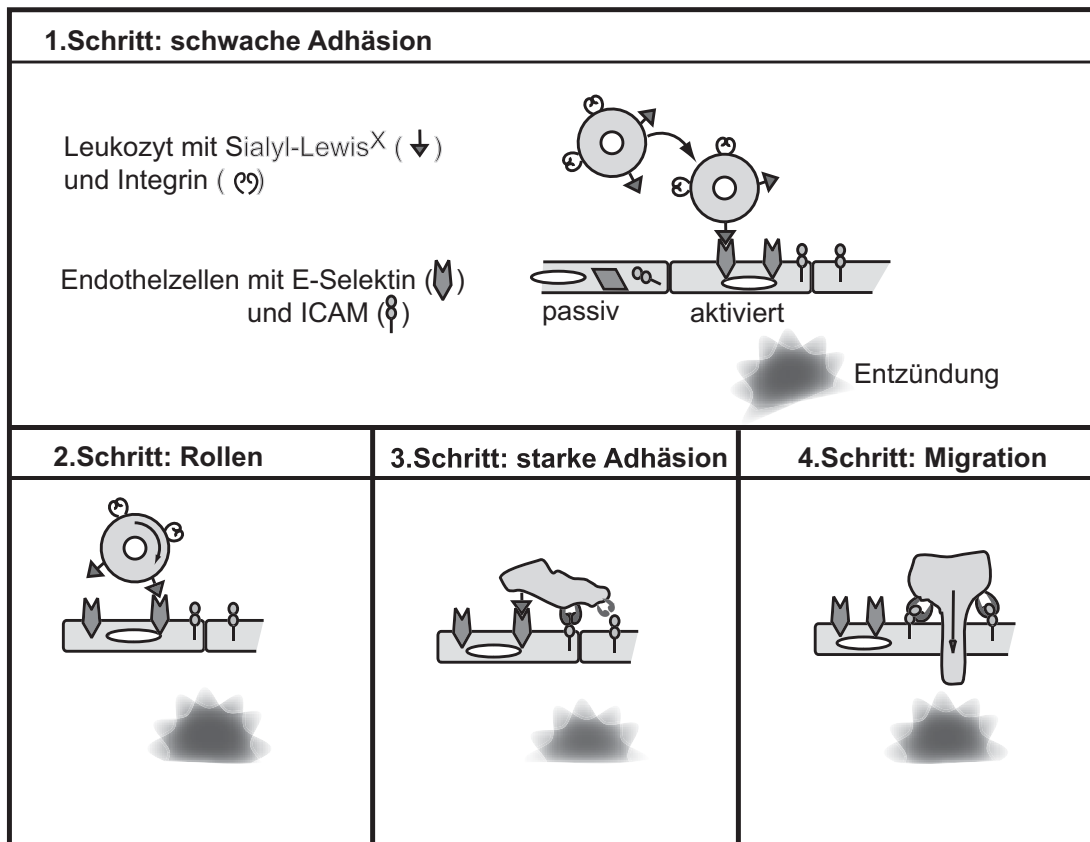


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Leukozyten-Migration: Ein erstes Rezeptor-Ligand Paar vermittelt eine schwache Adhäsion, die zur Rollbewegung an der Gefäßwand führt und dadurch eine zweite spezifische Bindung ermöglicht, die zur Migration der Leukozyten ins entzündete Gewebe führt.

von Tumoren und damit auch der Immunantwort des Körpers auf Entzündungen (Gabius & Gabius 1997). Dieses letzte Beispiel soll etwas genauer betrachtet werden, da hier das in dieser Arbeit verwendete Glykolipid Sialyl-Lewis^X und sein Bindungspartner E-Selektin eine unerlässliche Rolle spielen.

Bei der Immunantwort laufen eine Reihe von Reaktionsketten ab (vgl. z.B. Lorz 2003), eine davon ist die Migration von Leukozyten aus dem Blutgefäß in das umgebende Gewebe (vgl. Abbildung 1.1). Dazu werden vom entzündeten Gewebe Cytokine als Botenstoffe ausgesandt, die die Expression von E- und P-Selektin auf den Endothelzellen, die die Wand eines Blutgefäßes auskleiden, aktivieren. Leukozyten, die im Blut zirkulieren, tragen auf ihrer Oberfläche die spezifischen Liganden für die Selektine, nämlich das Oligosaccharid Sialyl-Lewis^X enthaltende Proteine. Die Leukozyten binden an die Endothelzellen. Die Selektin-Sialyl-Lewis^X-Bindung ist stark genug, Leukozyten an der Gefäßwand zu halten, wo sie im Scherfeld des zirkulierenden Bluts jedoch nicht fest haften, son-

dern an der Gefäßwand entlangrollen und dabei langsamer werden (Schritt 2 in Abbildung 1.1). Dadurch können neue Schlüssel-Schloss-Paare zwischen Integrinen auf den Leukozyten und ihren spezifischen Liganden auf den Endothelzellen gebildet werden. Diese Wechselwirkung ist stärker als die Selektin-vermittelte Bindung, so dass die Leukozyten zum Stillstand kommen (Schritt 3 in Abbildung 1.1). Sie verformen sich und gelangen durch die Endothelschicht, die durch die Entzündung durchlässiger wird, ins betroffene Gewebe (Schritt 4) (vgl. z.B. Simanek et al. 1998).

Ein Modellsystem für den ersten Schritt dieser Immunreaktion aufzubauen und zu charakterisieren, ist das Ziel dieser Arbeit. Dazu wird ein einfaches Adhäsionssystem aufgebaut, das alle für die Adhäsion wesentlichen Elemente enthält. Es besteht aus Riesenvesikeln, in deren Lipidmembran sowohl Sialyl-Lewis^X-Moleküle als spezifische Liganden, als auch Lipopolymere als Repellermoleküle eingebettet werden. Diese Vesikel dienen als Testzellen, die an Oberflächen, die mit E-Selektin funktionalisiert sind und als Zielzellen fungieren, adhären. Dieses System erlaubt aufgrund seiner einfachen Struktur und der bekannten, im Experiment wählbaren Zusammensetzung quantitative Aussagen über Bedingungen für Adhäsionsprozesse. Es wird zunächst hauptsächlich mit lichtmikroskopischen Mitteln im thermodynamischen Gleichgewicht charakterisiert, indem sowohl Bindungsstärke als auch Bindungsdynamik in Abhängigkeit von der Systemzusammensetzung untersucht werden. Es wird dazu die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie gewählt, da diese mikrointerferometrische Technik besonders gut geeignet ist, die Oberflächenstruktur der Vesikel in der Nähe des Substrats, und damit die Kontaktfläche, zu analysieren.

Da die Sialyl-Lewis^X-Selektin-Bindung gerade im Scherfeld eines Blutgefäßes, also im thermodynamischen Nichtgleichgewicht, ihren biologisch relevanten Ursprung hat, wird in einem zweiten Schritt ein solcher Nichtgleichgewichtszustand erzeugt. Aus der Vielzahl der in der Biophysik zur Erzeugung von Kräften verwendeten Techniken (vgl. Merkel 2001) wird dazu der Zugang über die magnetische Pinzette gewählt, mit deren Hilfe über eine Sonde eine Kraft definierter Stärke auf den adhärenen Vesikel senkrecht nach oben ausgeübt werden kann. Durch die elastischen Eigenschaften der Vesikelmembran wird die als Punktkraft am oberen Pol des Vesikels angreifende Kraft in eine Linienkraft entlang der Kontaktlinie des adhärenen Vesikels übertragen. Mit dem verwendeten Aufbau ist die Stärke dieser an der Kontaktlinie der Adhäsionsfläche anliegenden Linienkraft sehr gut kontrollierbar. Dadurch kann das Zusammenspiel von Bindungsmechanismen und Membraneigenschaften studiert werden und es können so neue Erkenntnisse über die Zell-Zell-Wechselwirkung und deren Regulation erlangt werden.

Kapitel 2

Aufbau des Systems

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Modellsystem der Zelladhäsion besteht aus einschaligen Riesenvesikeln mit eingebetteten Rezeptoren, die über Rezeptor-Ligand Bindungen spezifisch an eine funktionalisierte Oberfläche binden (vgl. Abbildung 2.1). Modellsysteme dieser Art wurden bereits in mehreren vorangegangenen Arbeiten verwendet (Rädler et al. 1995a, Nardi et al. 1998, Kloboucek

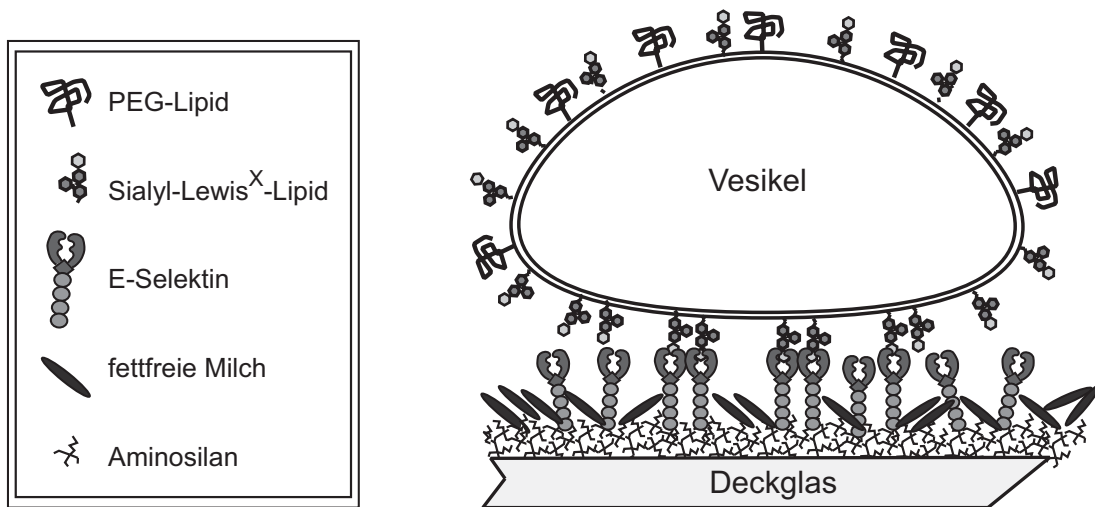


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des untersuchten Modellsystems: Als Modellzelle dient ein Riesenvesikel, in den spezifische Liganden (Sialyl-Lewis^X-Lipide) und als Glykokalix dienende Polymere (PEG-Lipide) eingebettet sind. Das Gewebe, an das die Modellzelle anbinden soll, wird durch eine Glasoberfläche simuliert, die zunächst mit Aminosilan leicht hydrophobisiert wird und auf der anschließend Rezeptorproteine immobilisiert werden. Die restliche Oberfläche wird anschließend mit Proteinen aus fettfreier Milch passiviert.

et al. 1999, Guttenberg et al. 2001). Sie eignen sich sehr gut für die Untersuchung physikalischer Aspekte der Zelladhäsion, da die Anzahl der im System enthaltenen Komponenten relativ klein ist. Dies ermöglicht eine Variation fast aller Parameter und damit die Aufstellung komplexer Phasendiagramme der Adhäsion. Zusätzlich ist durch den Aufbau auf einem Deckglas die direkte Betrachtung des Modells mit verschiedenen Mikroskopietechniken möglich.

Bevor die spezifische Adhäsion studiert werden kann, ist es unbedingt notwendig, die Einzelkomponenten des Systems zu charakterisieren. Damit kann sichergestellt werden, dass alle Komponenten in der gewünschten Konzentration im System enthalten sind. Dazu wird die Dichte der Proteine, die auf dem Substrat immobilisiert werden, bestimmt und die thermotropen Eigenschaften von Vesikeln mit unterschiedlichen Zusammensetzungen werden untersucht. Desweiteren kann der Einfluss unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Vesikel und Substrat abgeschätzt werden. Im folgenden Kapitel werden die Zusammensetzung des Systems und die Ergebnisse dieser Charakterisierung dargestellt.

2.1 Vesikel

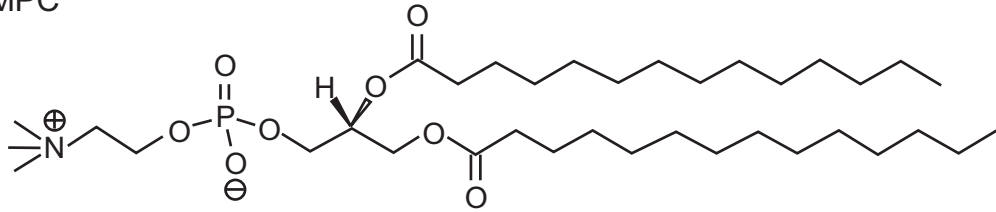
Als Modellzellen werden einschalige Riesenvesikel verwendet. Sie bestehen aus einer Lipidmatrix, in die sowohl Liganden für die spezifische Adhäsion, als auch Polymere, die die Glykokalix simulieren, eingebettet werden. Beide Moleküle sind lipidgekoppelt, was den Einbau in die Membran sehr vereinfacht.

2.1.1 Zusammensetzung und Herstellung

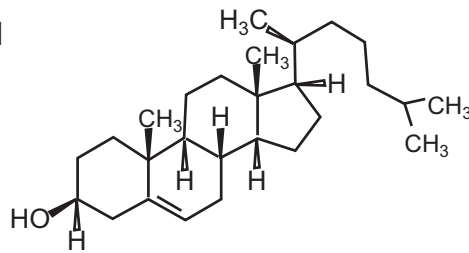
Die Vesikelmatrix besteht aus einer äquimolaren Mischung von 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC) und Cholesterol (vgl. Abbildung 2.2a und b) (beides synthetisch hergestellt von Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA). DMPC besitzt in einer Lipiddoppelschicht bei $23,5^{\circ}\text{C}$ einen Phasenübergang von einer kristallinen (P'_{β}) in eine fluide (L_{α}) Phase (Cevc 1993). Da dieser Phasenübergang sehr nahe an der Experimentiertemperatur liegt und sichergestellt werden soll, dass sich die Membran immer in einem fluiden Zustand befindet, wird Cholesterol in die Membran inkorporiert. Nach dem bei Sackmann (1995) vorgestellten Phasendiagramm für DMPC-Cholesterol Mischungen, ist bei einer äquimolaren Mischung kein Phasenübergang mehr zu beobachten und das System befindet sich in einem quasifluiden Zustand (Diffusionskonstante $D \approx 5 \cdot 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$). Zusätzlich erhöht die Zugabe von Cholesterol die Biegesteifigkeit der DMPC-Membran um etwa das fünffache auf $\kappa \approx 100k_B T$ und unterdrückt damit höhere Moden thermischer Undulationen.

Da sich Zellen, die nicht spezifisch aneinander gebunden sind, abstoßen, reine Lipidmembranen sich aber durch die van der Waals-Wechselwirkung anziehen, ist es notwendig, die Glykokalix einer Zelle zu modellieren, um diese

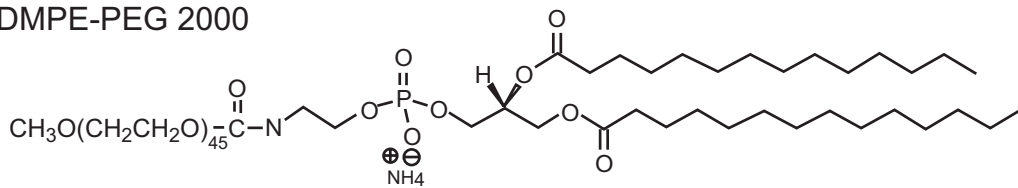
a) DMPC



b) Cholesterol



c) DMPE-PEG 2000



d) Sialyl Lewis^X-Lipid

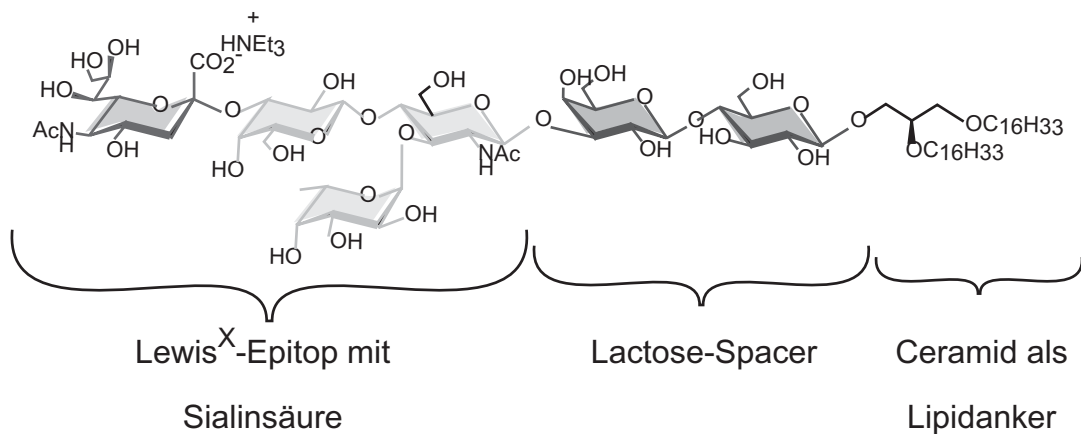


Abbildung 2.2: Strukturformeln der verwendeten Moleküle

a) 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin — DMPC

b) Cholesterol

c) 2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Methoxy(Polyethylenglycol)-2000] — DMPE-PEG 2000

d) Sialyl-Lewis^X-Lipid

unspezifische Wechselwirkung zwischen Lipidmolekülen zu unterdrücken. Dazu werden lipidgekoppelte Polymere verwendet, in dieser Arbeit Dimyristoylphosphoethanolamin-N-Poly-(Ethylen-Glykol) (DMPE-PEG) mit 45 bzw. 16 Monomereinheiten ((DMPE-PEG 2000 bzw. DMPE-PEG 750, beide von Avanti Polar Lipids; vgl. Abbildung 2.2c). Der Floryradius – und damit bei geringer Ankerdichte auch die Schichtdicke (Mathe 2000) des längeren Lipopolymers liegt bei 34,4Å, die des kürzeren bei 17,8Å (die Monomerlänge beträgt jeweils 3,5Å). Damit entspricht die Polymerschichtdicke im Fall von DMPE-PEG 2000 der Länge des verwendeten Rezeptors. Die Konzentration der Lipopolymere wird zwischen 0mol% und 5mol%¹ variiert.

Der verwendete Rezeptor wurde von Christian Gege (2001) synthetisiert. Es handelt sich um ein Sialyl-Lewis^X-Glykosphingolipid (sLe^X-GSL) (vgl. Abbildung 2.2d), das in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen spezifisch an das Membranprotein E-Selektin (vgl. Kapitel 2.2.1) bindet. Die Carboxyl-Gruppe der Sialinsäure ist dabei essentiell notwendig, da sie eine ionische Bindung mit einem Argininrest (Arg-97) des E-Selektins eingeht. Außerdem werden Wasserstoffbrücken und Bindungen über Ca²⁺ als Ionenbrücke eingegangen (Simanek et al. 1998). Die Dissoziationskonstante dieser Bindung ist etwa 10⁻⁴M (Vestweber & Blanks 1999, Wild et al. 2001). Das Epitop (Sialinsäure + Lewis^X-Trisaccharid) ist über einen Lactoseabstandhalter (engl.: spacer) an ein Ceramid gekoppelt. Das Ceramid (hier mit zwei ungesättigten C₁₆-Ketten) dient als Membrananker; der Lactose-spacer ist notwendig, um sicherzustellen, dass die funktionale Gruppe für den Bindungspartner E-Selektin zugänglich ist. In einigen Experimenten wird ein sLe^X-GSL mit einem Fluoreszenzmarker in einer Fettsäurekette verwendet. Dazu wurde Nitrobenzodiazol (NBD) in das Molekül eingebaut (Gege et al. 2001).

Für die Charakterisierung des Adhäsionssystems wird ein ungeladenes Lewis^X-Glykosphingolipid (Le^X-GSL) verwendet, das aus dem sLe^X-GSL durch Abspalten der Sialinsäure entsteht. Dieses Molekül kann homophile Bindungen eingehen (Geyer et al. 2000), die Wechselwirkung ist aber zu schwach, um mit den in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden zu können.

Soweit nicht anders im Text angegeben, werden alle Experimente in S1-Puffer durchgeführt. Dieser besteht aus einer 10mM Hepes-Lösung mit 100mM NaCl, 1mM CaCl₂ und 1mM NaN₃. Der pH-Wert beträgt 7,25, die Osmolalität 210mOsm. Für alle Experimente wird hochreines Millipore-Wasser (Filter von Millipore, Molsheim, Frankreich) verwendet. Alle Lipide, sowie Cholesterol werden in Chloroform (je nach Löslichkeit 3:1 Chloroform:Methanol) gelöst bei -20°C aufbewahrt.

Die einschaligen Riesenvesikel werden nach der Methode des Elektroquellens

¹Alle Angaben zu prozentualen Anteilen in Mischungen sind in dieser Arbeit im Bezug auf DMPC zu verstehen, d.h., der Anteil von DMPC wird als 100mol% angenommen und auf diesen beziehen sich alle weiteren Angaben.

(Dimitrov & Angelova 1988) in einer 170mOsm Sucroslösung hergestellt. Eine ausführliche Beschreibung des Herstellungsablaufs findet sich z.B. bei Guttenberg (2001). Die Vesikel haben einen Durchmesser von 10–100 μm , wobei ein Maximum der Größenverteilung bei einem Durchmesser von etwa 15–25 μm liegt. Vesikel werden immer am selben Tag verwendet, an dem sie hergestellt werden, da sie bei Raumtemperatur gelagert werden müssen und sich in der Sucroslösung Bakterien sehr leicht vermehren, was zu unbrauchbaren Ergebnissen führt.

2.1.2 Charakterisierung

Zur Charakterisierung von Mischungen aus den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Molekülen werden im wesentlichen zwei Methoden angewandt: zum einen die Langmuir-Filmwaage, zum Teil kombiniert mit Fluoreszenzmikroskopie, zum anderen Kalorimetrie. Mit letzterer Technik werden Vesikel, also Lipiddoppelschichten untersucht, mit ersterer Lipidmonolagen.

Untersuchungen an Monoschichten

Die Langmuir-Filmwaage dient zur thermodynamischen Charakterisierung eines Systems aus amphiphilen Molekülen, die sich an der Wasser-Luft-Grenzfläche anordnen. Durch die Messung der Zustandsgrößen Temperatur, zur Verfügung stehende Fläche und Lateraldruck (Differenz der Oberflächenspannungen mit und ohne Amphiphile) ist es möglich, ein Phasendiagramm in zwei Dimensionen aufzustellen.

Der Messaufbau soll hier nur kurz skizziert werden, eine ausführliche Beschreibung findet sich u.a. bei Dietrich (1995). Aus Abbildung 2.3 geht hervor, dass die Apparatur aus zwei Teilen aufgebaut ist: dem Fluoreszenzmikroskop, das mit einer hochempfindlichen SIT-Kamera ausgestattet ist und der Filmwaage selbst. Diese besteht aus einem Teflontrog, der mit Flüssigkeit gefüllt wird, auf deren Oberfläche Amphiphile aufgebracht werden. Ein Filterpapier, das an ein Federsystem (Wilhelmy-System) zur Ermittlung der Oberflächenspannung gekoppelt ist, taucht in die Flüssigkeit (Subphase) ein. Eine durch einen Schrittmotor bewegliche Barriere teilt die Oberfläche in zwei Teile, einen mit Amphiphilen und einen ohne, deren Größe definiert ist. Die Temperatur des Systems kann durch eine temperierbare Kupferplatte eingestellt werden. Damit können alle notwendigen Zustandsgrößen bestimmt und Phasendiagramme aufgenommen werden. Es werden verschiedene Phasen beobachtet, die sich durch den Ordnungszustand und die Packungsdichte der Amphiphile unterscheiden. Die Nomenklatur für die einzelnen Zustände lehnt sich an die Bezeichnungen in der Flüssigkristallographie an. Man unterscheidet gasförmige, flüssiganaloge (L_α) und verschiedene festanaloge (z.B. $L_\beta, L_{\beta'}$) Zustände. Die in Phasenübergängen auftretenden Entmischungserscheinungen aufgrund von Domänenbildung können mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden, wenn ein Farbstoff gewählt wird, der sich in einer

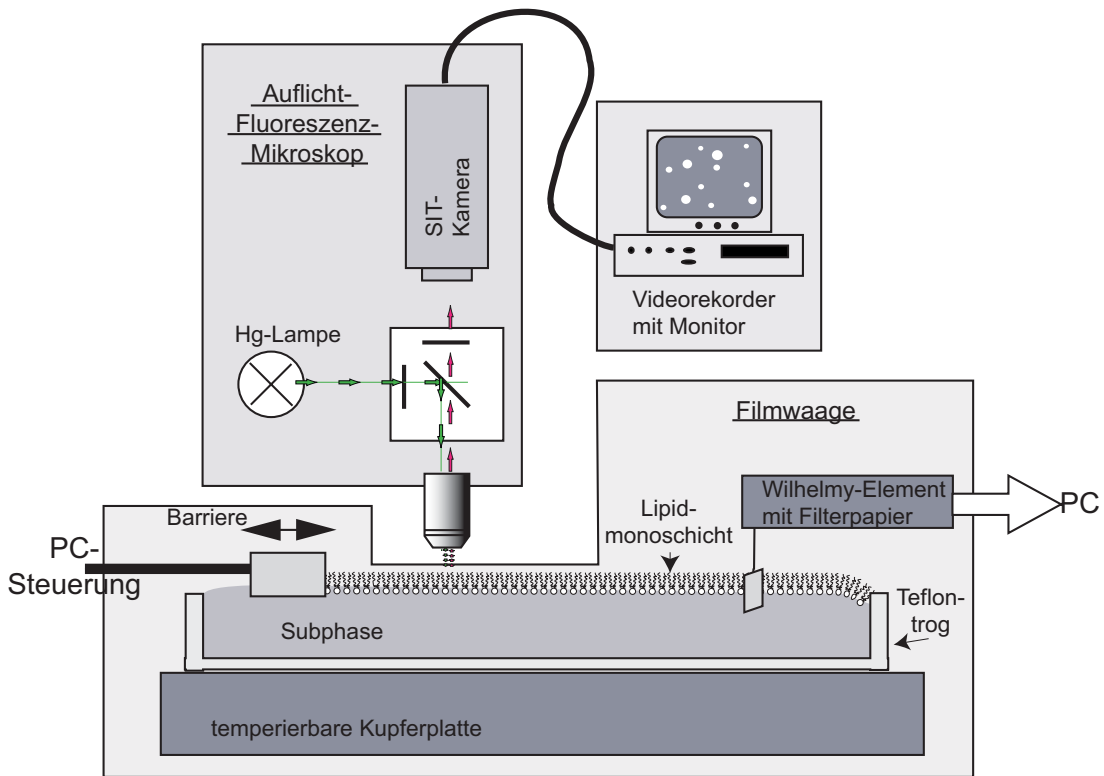


Abbildung 2.3: Aufbau der Fluoreszenzfilmwaage. Mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop wird das Phasenverhalten eines zweidimensionalen Systems an der Wasser-Luft-Grenzfläche beobachtet.

der beiden Phasen anreichert.

Stabilität der Glykolipide an der Wasser-Luft-Grenzfläche

Für die Untersuchung des Mess-Systems wird zunächst überprüft, ob die verwendeten Glykolipide stabile Monoschichten an der Puffer-Luft-Grenzfläche bilden. Dazu wird reines Lewis^X-Lipid auf Puffer gespreitet und bei 20°C von ca. 0mN/m auf 35mN/m komprimiert (das ist in etwa der Lateraldruck, der in der Doppelschicht eines Vesikels herrscht). Dann wird der Druck konstant gehalten und die Flächenentwicklung beobachtet.

Die Fläche ist über mehrere Stunden konstant, der Film damit stabil, da offenbar keine Moleküle in die Subphase diffundieren, was sich in einer Oberflächenverringerung bemerkbar machen würde. Von einer Prüfung des Sialyl-Lewis^X-Lipids auf diese Weise kann abgesehen werden, da die Kopfgruppen dieser Moleküle durch die negativ geladene Sialinsäure die Monoschichten stabilisieren, indem sie Brücken über zweiwertige Kationen des verwendeten Puffers eingehen

(Kalziumbrücken).

Phasenverhalten von Glykolipid-Phospholipid Mischungen

In einem nächsten Schritt werden Isothermen von DMPC-Monoschichten mit verschiedenen großen Anteilen (0, 5, 10, 20, 30 und 100%) von Sialyl-Lewis^X-Lipid (sLe^X-GSL) bzw Lewis^X-Lipid (Le^X-GSL) bei Temperaturen von 20°C und 30°C mit einer Barrierengeschwindigkeit von 75µm/s aufgenommen. Eine zweite, schnellere Kompression und Expansion ($v=150\mu\text{m/s}$) wird zur Kontrolle durchgeführt und ist hier nicht dargestellt, da sie die gleichen Ergebnisse liefert wie die langsame Kompression.

Es wird folgendes beobachtet: Alle Mischungen zeigen ein reversibles Verhalten mit leichten Hysteresen bei der Expansion. Bei $T=20^\circ\text{C}$ ist für die Mischungen mit einem Glykolipid-Anteil von über 5% ein Phasenübergang zu beobachten, der sich mit steigender Glykolipid-Konzentration verbreitert und zu niedrigeren Lateraldruckwerten verschoben wird. Bei $T=30^\circ\text{C}$ ist bei keiner der untersuchten Mischungen ein Phasenübergang zu beobachten, lediglich reines Le^X-GSL zeigt ein schmales Plateau. Grundsätzlich sind alle Übergangspateaus nicht horizontal, sondern der Lateraldruck nimmt mit abnehmender Fläche zu.

In Abbildung 2.4 ist für $T=20^\circ\text{C}$ dargestellt, wie sich der Lateraldruck zu Beginn und am Ende des Übergangspateaus in Abhängigkeit vom Glykolipidanteil entwickelt. Der Übergangsdruck wurde deshalb gewählt, weil dieser Wert auch ohne die Normierung auf Fläche pro Molekül ablesbar ist². Der Molenbruch ist der tatsächliche Anteil der Glykolipide am Gesamtsystem, deshalb sind die Glykolipidanteile im Diagramm kleiner als die auf 100% DMPC bezogenen Prozentangaben im Text.

Die nicht-horizontalen Plateauverläufe entsprechen der Gibbsschen Phasenregel für Mischungen (Landau & Lifschitz 1987), können aber auch auf Verunreinigungen der Lipide zurückgeführt werden, insbesondere da die reinen Glykolipid-Schichten auch ein geneigtes Plateau zeigen. Der Abfall des Übergangsdrucks und die Verbreiterung des Druckbereichs, innerhalb dessen der Übergang stattfindet, mit steigendem Molenbruch der Glykolipide kann, wenn man Phasenübergänge im van der Waals-Gas als Analogon betrachtet, so interpretiert werden, dass die Phasenübergangstemperatur des Glykolipids oberhalb derer von DMPC liegt. Diese Tendenz ist für das Le^X-Lipid noch ausgeprägter, als für das sLe^X-Lipid.

Am Ende jeder Messreihe mit sLe^X-Lipiden werden 200µl der Subphase gegen die gleiche Menge einer 0.5M Lösung des Komplexbildners für zweiwertige Kationen Ethylendiamintetra-Azetat (EDTA) (pH 8.0 in Wasser) ausgetauscht, was einen EDTA-Gehalt von 100µmol bei 25µmol Kalzium-Gehalt bedeutet. Die zweiwertigen Kationen der Subphase sind damit komplexiert und können nicht weiter

²Das Volumen der Subphase bei diesen Messungen beträgt 25ml und die Oberfläche wird zwischen 48 und 9cm² variiert; diese Fläche ist sehr klein, daher ist eine Eichung auf Fläche pro Molekül nicht sinnvoll, da Randeffekte eine zu große Rolle spielen.

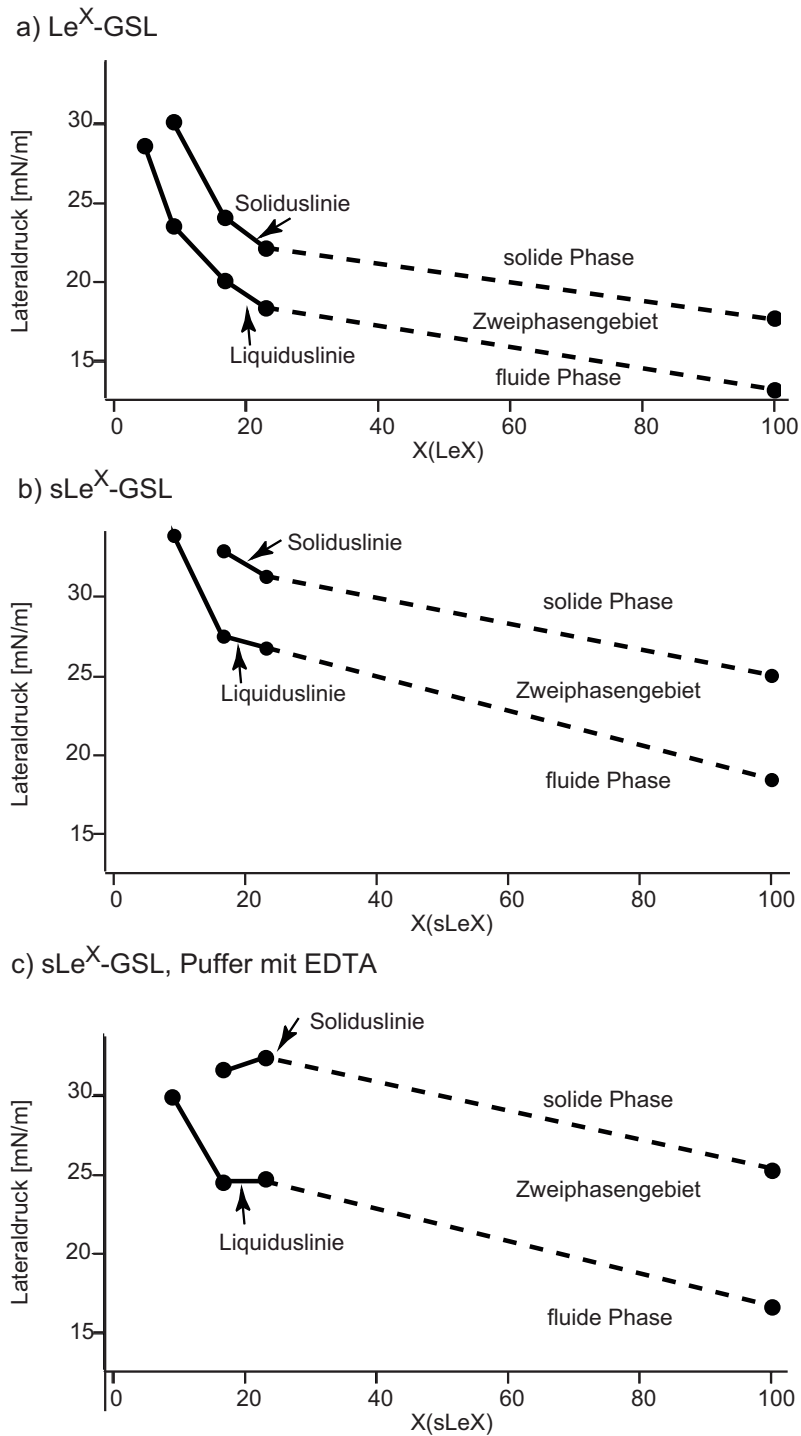


Abbildung 2.4: Phasendiagramme von Lewis^X- und Sialyl-Lewis^X-Lipid-Mischungen mit DMPC bei 20°C. Dargestellt sind Anfang (Liquiduslinie) und Ende (Soliduslinie) des Übergangsplateaus in Abhängigkeit vom Molenbruch der Glykolipide. a) Lewis^X-Lipid-DMPC Mischung; b) Sialyl-Lewis^X-Lipid-DMPC Mischung; c) Sialyl-Lewis^X-Lipid-DMPC Mischung auf Puffer mit EDTA.

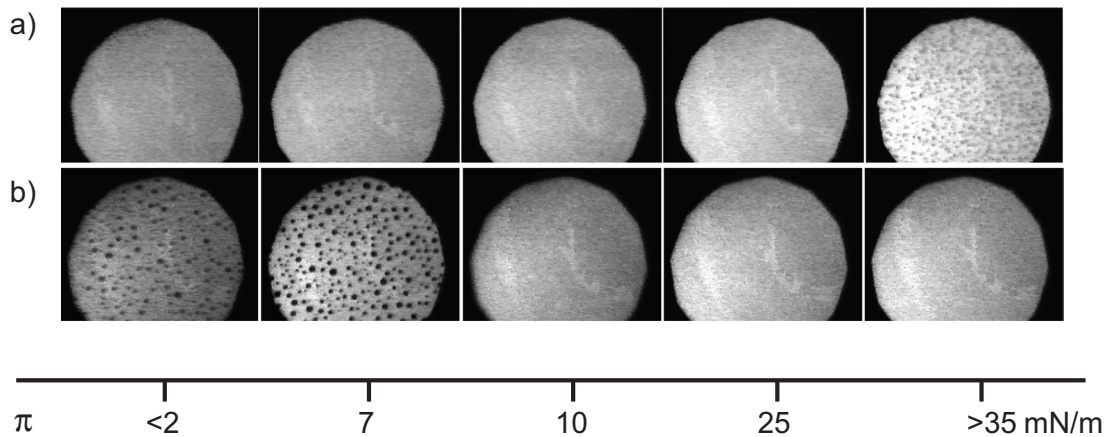


Abbildung 2.5: Epifluoreszenzaufnahmen bei verschiedenen Lateraldrücken.
a) In einer DMPC/Glykolipidmischung ist eine Phasenseparation erst bei hohen Drücken sichtbar.
b) In einer Mischung, die zusätzlich Cholesterol enthält, wird die Entmischung bei hohem Druck unterdrückt, bei niedrigen Lateraldrücken erscheint eine zusätzliche Entmischung des Cholesterols.

als Brücken zwischen den negativ geladenen Sialinsäuren dienen. Im Phasendiagramm macht sich dies durch eine Erweiterung des Koexistenzgebiets zu niedrigeren Lateraldrücken bemerkbar, die Phasenübergangstemperatur verschiebt sich also zu höheren Temperaturwerten hin.

Fluoreszenzfilmwaage

Ziel der Messreihe mit der Fluoreszenzfilmwaage ist es, mögliche Phasenseparationen bei verschiedenen Lateraldrücken in der Lipidmonolage durch fluoreszenzmarkierte Sondenmoleküle zu untersuchen. Dabei wird auch der Einfluss einer Beimischung von 20% Cholesterol auf das Phasenverhalten berücksichtigt. Für alle Experimente dieser Serie liegt der Anteil von Glykolipid bei 10%, als Farbstoff dient ein lipidgekoppeltes Texas Red-Molekül (TR-DHPE, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), das mit einem Anteil von 0,02% den Lipidmischungen beigegeben wird.

Es werden Druck-Flächen-Isothermen bei einer Temperatur von 20°C auf S1-Puffer aufgenommen, Phasenübergänge sind aufgrund der komplexen Mischungen im Isothermenverlauf aber nur noch schwer zu erkennen.

Die Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 2.5 zeigen, dass die Mischung *ohne* Cholesterol (100% DMPC, 10% sLe^X-GSL, 0,02% TR-DHPE) zunächst homogen ist und keine Phasentrennung aufweist; bei Lateraldrücken über 35mN/m aber werden kleine dunkle Domänen sichtbar. Die Lipidmischung *mit* Cholesterol (100% DMPC, 20% Cholesterol, 10% sLe^X-GSL, 0,02% TR-DHPE) dagegen

weist bei Lateraldrücken unter 7mN/m dunkle Domänen auf, die mit steigendem Lateraldruck verschwinden. Der Fluoreszenzfarbstoff reichert sich dabei in der cholesterolarmen Phase an (Radhakrishnan & McConnell 1999). Dieses Verhalten entspricht der bei Hirshfeld & Seul (1989) beschriebenen Entmischung von DMPC und Cholesterol bei niedrigen Lateraldrücken und ist, wie durch eine Kontrollmessung mit einer Lipidmischung ohne Glykolipid, aber mit Cholesterol (100% DMPC, 20% Cholesterol, 0,02% TR-DHPE) bestätigt wird, unabhängig von der Zugabe von Glykolipiden.

Die Phasenentwicklung für Mischungen mit Le^X -Lipid verläuft äquivalent zu der mit sLe^X -Lipid und soll deshalb hier nicht dargestellt werden.

Schlussfolgerung

Insgesamt lässt sich feststellen, dass beide Glykolipide stabil in Monoschichten eingebaut werden können, wobei die Phasenübergangstemperatur der Glykolipide oberhalb derer von DMPC liegt. Entmischungen bei hohen Lateraldrücken können durch die Zugabe von Cholesterol zur Lipidmischung unterdrückt werden.

Untersuchungen an Vesikeln

Die dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry — DSC) dient zur genauen Bestimmung des thermodynamischen Zustands einer Lösung innerhalb eines weiten Temperaturbereichs (McElhaney 1986). Insbesondere in der Untersuchung von Lipid-Vesikeln aus verschiedenen Molekülsorten liegt eine wichtige Anwendungsmöglichkeit dieser Technik, da aus den durch die Kalorimetrie gewonnenen Phasengrenzen zusammen mit Informationen über die Feinstruktur (z.B. aus der Neutronenstreuung) ein Phasendiagramm in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis erstellt werden kann (Sackmann 1995).

Im Kalorimeter werden eine Messzelle mit der zu untersuchenden Substanz, gelöst in einer im Messbereich thermisch inerten Flüssigkeit (hier Puffer), und eine Referenzzelle, die nur das Lösungsmittel enthält, thermisch isoliert, um alle Vorgänge adiabatisch ablaufen zu lassen. Es werden dann beide Zellen mit gleicher Heizrate erwärmt, d.h., es wird ihnen die gleiche Wärmemenge in definierten Schritten zugeführt. Dadurch steigt die Temperatur in beiden Systemen linear an. Findet in der Messlösung jedoch ein thermisch induzierter Phasenübergang statt, so wird ein Teil der aufgenommenen Wärme dafür verwendet, die Struktur und Anordnung der Moleküle zu verändern und die Probe erwärmt sich weniger stark als die Referenz. Diese Temperaturdifferenz wird ausgeglichen, wobei die zusätzlich zugeführte latente Wärme gemessen wird. Die Wärmekapazität $C_p = dQ/dT$ wird gegen die Temperatur aufgetragen und es können sowohl die Phasengrenzen als auch (durch Integration über den Temperaturbereich des Übergangs) die Übergangswärme eines Phasenübergangs ermittelt werden (Garidel & Blume 2000). Ein Vorteil des hier verwendeten Mikrokalorimeters (VP-DSC, Microcal Inc., Northhampton, USA) (Plotnikov et al. 1997) liegt dabei in den

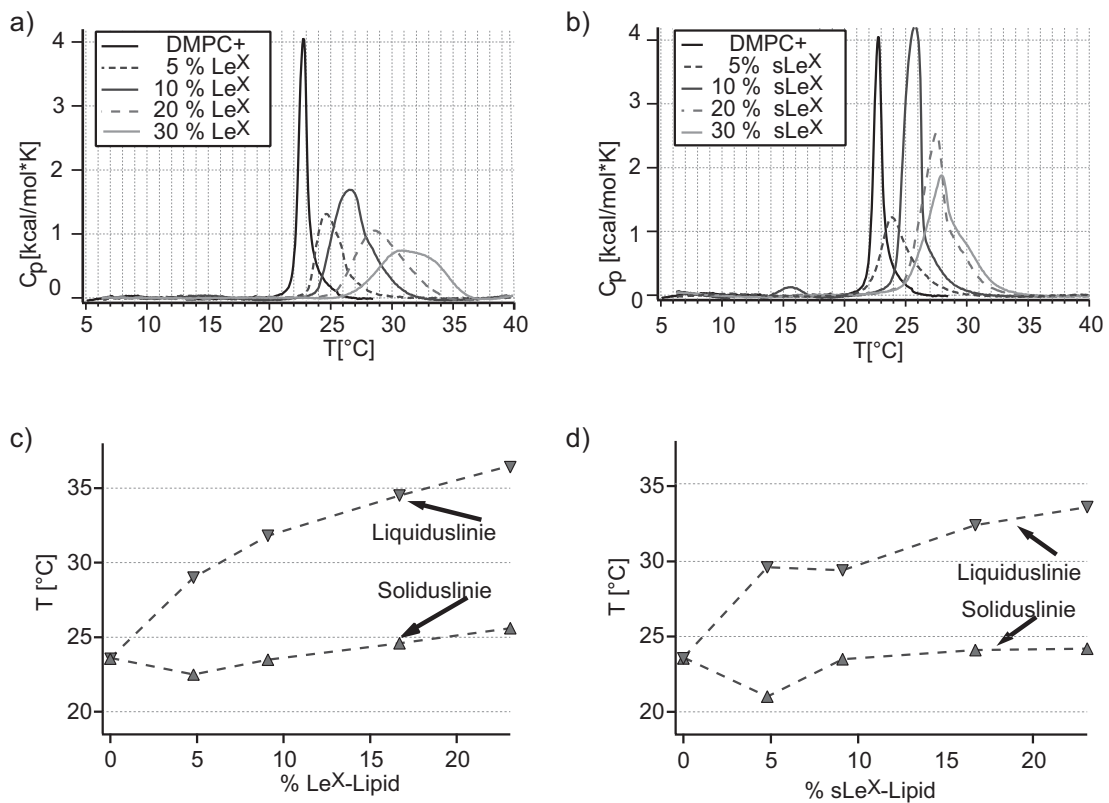


Abbildung 2.6: DSC-Heizkurven für a) DMPC Le^X-Lipid und b) DMPC sLe^X-Lipid Mischungen. Wegen der höheren Phasenübergangstemperatur der Glykolipide verschiebt sich der Übergang mit zunehmendem Glykolipidanteil zu höheren Temperaturen. c) und d) Zigarrenartige Phasendiagramme für die jeweiligen Mischungen. Anfang und Ende eines Phasenübergangs werden aus dem Schnittpunkt der Kurvenflanken aus a) und b) mit der Grundlinie bestimmt

geringen benötigten Probenvolumina, die sowohl einen Temperaturgradienten innerhalb der Probe verhindern, als auch wenig Probenmaterial erfordern (im hier verwendeten Gerät liegt das Probenvolumen bei $500\mu\text{l}$ und die Mindestkonzentration bei $200\mu\text{g/ml}$).

Mit dem Kalorimeter wird untersucht, ob sich aus verschiedenen DMPC-Glykolipid-Mischungen Vesikel mit gemischten Membranen oder verschiedene Fraktionen von Zusammensetzungen bilden. Mischungen eines zweiten Moleküls mit einer anderen Phasenumwandlungstemperatur in einer Membran führen nämlich zu einer Verschiebung des Übergangs, zwei getrennte Fraktionen mit verschiedenen Übergangstemperaturen weisen dagegen zwei getrennte Maxima auf.

Es werden die gleichen Vesikellösungen wie für die Untersuchungen an Monoschichten verwendet, also DMPC mit 5, 10, 20 und 30% Glykolipidanteil. Die

Lipidmischungen werden wie bei Zantl (2001) beschrieben präpariert: Zunächst werden die in Chloroform gelösten Lipidmischungen eingetrocknet (min. 12h im Vakuum) und in der Konzentration 0,5mg/ml mit S1-Puffer gemischt. Bei 40°C werden die Vesikel 2h gequollen, dabei wird alle 20min mit einem Vortex-Gerät geschüttelt. Die entstehenden multilamellaren Vesikel werden durch Ultraschallung zu unilamellaren kleinen Vesikeln. Sowohl die Vesikellösung als auch der Referenzpuffer werden kurz vor der Messung entgast. Die Heizrate beträgt 15°C/h, der Temperaturbereich erstreckt sich von 5-40°C.

Da hier mit sehr kleinen Konzentrationen gearbeitet wird, ist die Bestimmung der Übergangswärme mit relativ großen Fehlern behaftet und daher wird diese Größe nicht verwendet (vgl. Abbildung 2.6a und b). Allerdings kann aus den Anfängen und Endpunkten der einzelnen Übergangskurven ein Teil eines Phasendiagramms erstellt werden (vgl. Abbildung 2.6c und d). In beiden Systemen steigen Solidus- und Liquidustemperatur mit zunehmendem Glykolipidanteil an, für das Le^X-GSL System etwas stärker als für das sLe^X-GSL System. Dabei verschiebt sich das Maximum der Übergangskurve und der Übergangsbereich wird zunehmend breiter. Im Temperaturbereich unterhalb der Soliduslinie befindet sich das System in einem kristallinen, oberhalb der Liquiduslinie in einem fluiden Zustand. Im Bereich zwischen Solidus- und Liquiduslinie herrscht Koexistenz beider Phasen, deren Mikrostruktur ohne eine zusätzliche Messmethode (z.B. Neutronenstreuung) nicht ermittelt werden kann. Die Form des hier erstellten Phasendiagramms ist im Einklang mit den von Maggio et al. (1985) erstellten Phasendiagrammen für Glykosphingolipid-DPPC Mischungen. Die dort untersuchte Mischung von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) mit Lactosylceramid (LacCer) entspricht trotz einiger Abweichungen in den Molekülstrukturen am ehesten dem hier betrachteten System. Das DPPC-LacCer Phasendiagramm ist zigarrenförmig und entspricht dem einer realen Lösung. Lediglich bei sehr kleinen Glykolipidanteilen (unter 10%) könnten Entmischungen in der kristallinen Phase auftreten. Diese Deutung ist sicherlich nicht direkt auf die hier gezeigten Ergebnisse übertragbar, kann aber einen Anhaltspunkt für das mögliche Phasenverhalten bieten.

Die Zugabe von Cholesterol macht eine Beobachtung mit kalorimetrischen Methoden unmöglich, da keine thermisch induzierten Phasenübergänge mehr auftreten (Mabrey & Sturtevant 1976).

Schlussfolgerung

Durch die Ergebnisse der kalorimetrischen Untersuchung werden die Resultate der Untersuchungen an Monoschichten insoweit bestätigt, als sich DMPC und Glykolipide zu Lipidmischungen verbinden lassen, wobei die Phasenübergangstemperatur der Glykolipide oberhalb derer von DMPC liegt. Das reduzierte Volumen v der Vesikel, das sich aus dem Verhältnis der Osmolalitäten des eingeschlossenen und des umgebenden Mediums ergibt, wird in den jeweiligen Messreihen

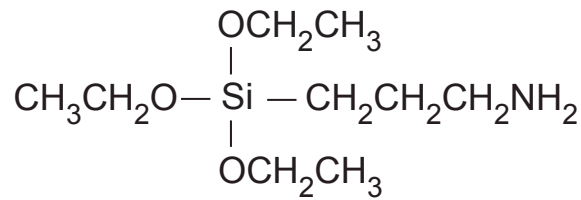


Abbildung 2.7: Strukturformel des verwendeten 3-Aminopropyltriethoxysilans

gesondert bestimmt. Es liegt im Allgemeinen mindestens bei $v = 0,8$, was auf elliptische Vesikelformen hindeutet (Kraus et al. 1995, Guttenberg 2001).

2.2 Oberflächen

2.2.1 Zusammensetzung und Herstellung

Die verwendeten Substrate werden in mehreren Schichten auf 0,17mm dicken, 24x24mm großen Deckgläsern aufgebaut. Wie in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt, wird zunächst auf die mit dem Base-Schritt der RCA-Methode (Kern & Puotinen 1970) gereinigten trockenen Deckgläser eine selbstassemblierte Aminosilanschicht aufgebracht.

Aus dem verwendeten Aminosilan 3-Aminopropyltriethoxysilan (vgl. Abbildung 2.7) wird dazu eine 1%ige Lösung mit wasserfreiem vorgewärmtem Toluol (Fluka, Buchs, Schweiz) hergestellt und die Deckgläser verbleiben bei 60°C für 4min in der Lösung. Danach wird fünfmal mit Toluol gespült und mit N₂ getrocknet. Diese Präparation folgt Petri et al. (1999). Als Kontrolle wird eine Kontaktwinkelmessung durchgeführt; dabei liegen die Kontaktwinkel für einen sich ausbreitenden Tropfen bei ca. 60°, für einen sich zurückziehenden Tropfen bei ca. 30°. Dies indiziert eine zwar relativ rauhe, aber leicht hydrophobe Oberfläche (Joanny & de Gennes 1984), auf der Proteine adsorbieren können.

Das Adhäsionsprotein E-Selektin, das in dieser Arbeit als Rezeptor verwendet wird, ist ein langgestrecktes Membranprotein, das im Wesentlichen aus fünf Untereinheiten besteht (vgl. Abbildung 2.8). Die Bindungsdomäne setzt sich aus einer Kohlehydrat-erkennenden Domäne (CRD = carbohydrate recognition domain) und einem Wachstumsfaktor (EGF=epidermal growth factor) zusammen. Beide Domänen sind für die kalziumabhängige Bindung von Kohlehydraten notwendig, auch wenn die Bindungstasche auf der CRD-Domäne liegt (Simanek et al. 1998). Der mögliche Bindungsmechanismus wurde bereits im Abschnitt 2.1 beschrieben. Unterhalb der Bindungsregion liegt eine Art Abstandhalter von der Membran, der aus sechs aufeinanderfolgenden Domänen, den SCR-Einheiten besteht. Es folgt eine Transmembrandomäne und ein zytosolischer Rest, der eine Rolle in der Signalübertragung spielen könnte. In der vorliegenden Arbeit wird

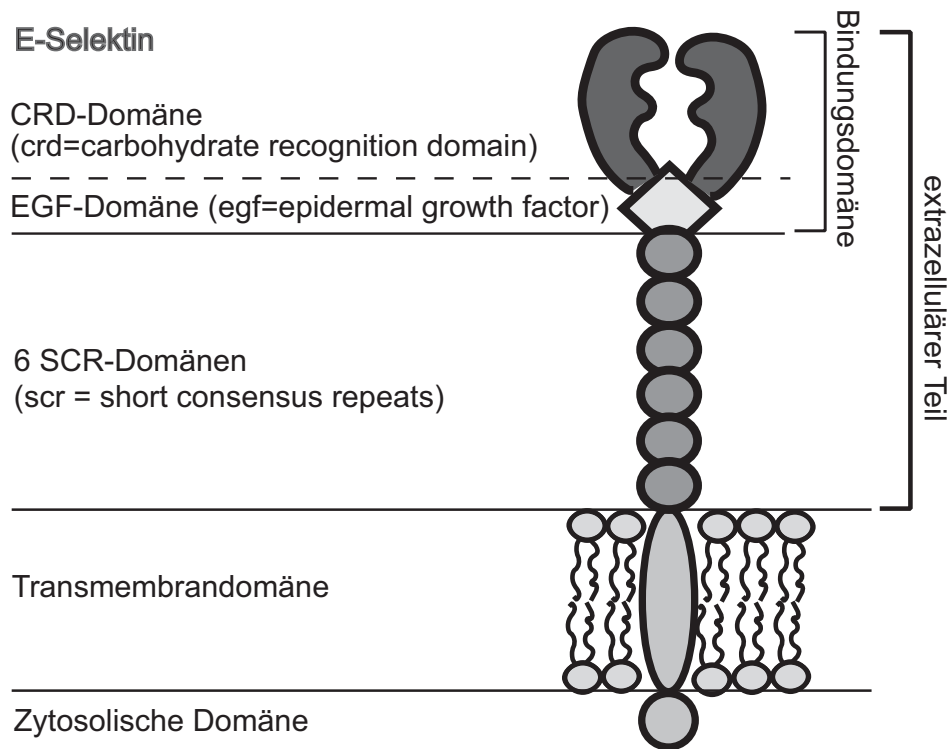


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau des Membranproteins E-Selektin. Die beiden obersten Domänen (CRD und EGF) bilden die Bindungsdomäne für Sialyl-Lewis^X.

eine Rekombinante des menschlichen E-Selektins verwendet, die nur aus dem extrazellulären Teil des Proteins besteht und in einer CHO Zell-Linie exprimiert wird (Calbiochem, San Diego, USA). Die lyophilisiert gelieferten Proteine werden in einer Konzentration von 2,5 bzw. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in S1-Puffer gelöst, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Proteine werden in verschiedenen Konzentrationen, angelehnt an die Methode von Greenberg et al. (2000) adsorbiert. Dazu wird die Proteinlösung auf die silanisierten Gläser gegeben und 2h bei Raumtemperatur unter leichtem Durchmischen mit einem Schüttler inkubiert. Danach wird sorgfältig mit Puffer gespült (das Volumen wird sechsmal ausgetauscht) und die Gläser werden mit einer dreiprozentigen Lösung fettfreier Trockenmilch (Bio-Rad, Hercules, USA) in S1-Puffer passiviert. Fettfreie Milch lagert sich in einer Schichtstruktur an der Oberfläche an und verhindert so ein unspezifisches Anbinden der Vesikel an die Glasoberfläche. Zur Präparation wird eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, Schütteln ist dabei nicht mehr notwendig. Zum Abschluss wird noch einmal sorgfältig mit Puffer gespült, die Proben werden bei Raumtemperatur gehalten und noch am selben Tag verwendet.

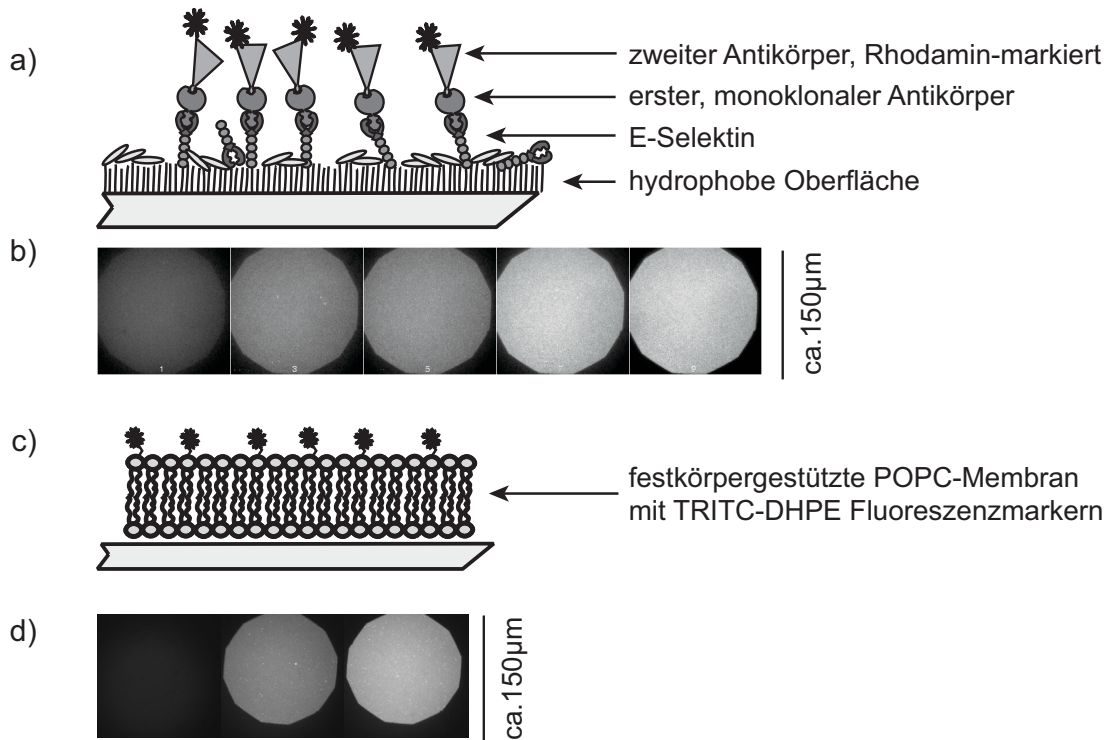


Abbildung 2.9: Quantifizierung der Oberflächendichte von E-Selektin mittels Fluoreszenz. Die Intensität einer Eichkurve bekannter Fluorophorendichte wird mit der Intensität der Selektinfluoreszenz verglichen und dadurch die Belegungsichte ermittelt.

a) und c) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus
 b) und d) Intensitätsverteilungen der Mikrofotografie-Bilder der untersuchten Konzentrationsreihen. Die Fluorophorendichte nimmt jeweils von links nach rechts zu.

2.2.2 Charakterisierung

Bei der Charakterisierung der Substrate gibt es zwei wesentliche Aspekte. Zum einen wird die Konzentration der E-Selektine auf der Oberfläche bestimmt, zum anderen wird kontrolliert, ob die Passivierung durch die fettfreie Milch ausreicht, damit Vesikel nicht unspezifisch an der Oberfläche adhären können.

Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentration der E-Selektine auf der Substratoberfläche wird über Fluoreszenzanalyse ermittelt. Basierend auf einer Idee von Brunk & Hammer (1997) werden E-Selektin-Oberflächen mit verschiedenen Konzentrationen der E-Selektin-Inkubationslösung hergestellt. Die ursprüngliche Proteinlösung von $5\mu\text{g/ml}$ wird dabei auf das 0,5-, 0,3- und 0,2-fache verdünnt und wie oben beschrieben präpariert. Auf die fertigen Oberflächen wird ein monoklonaler Antikörper gegen E-

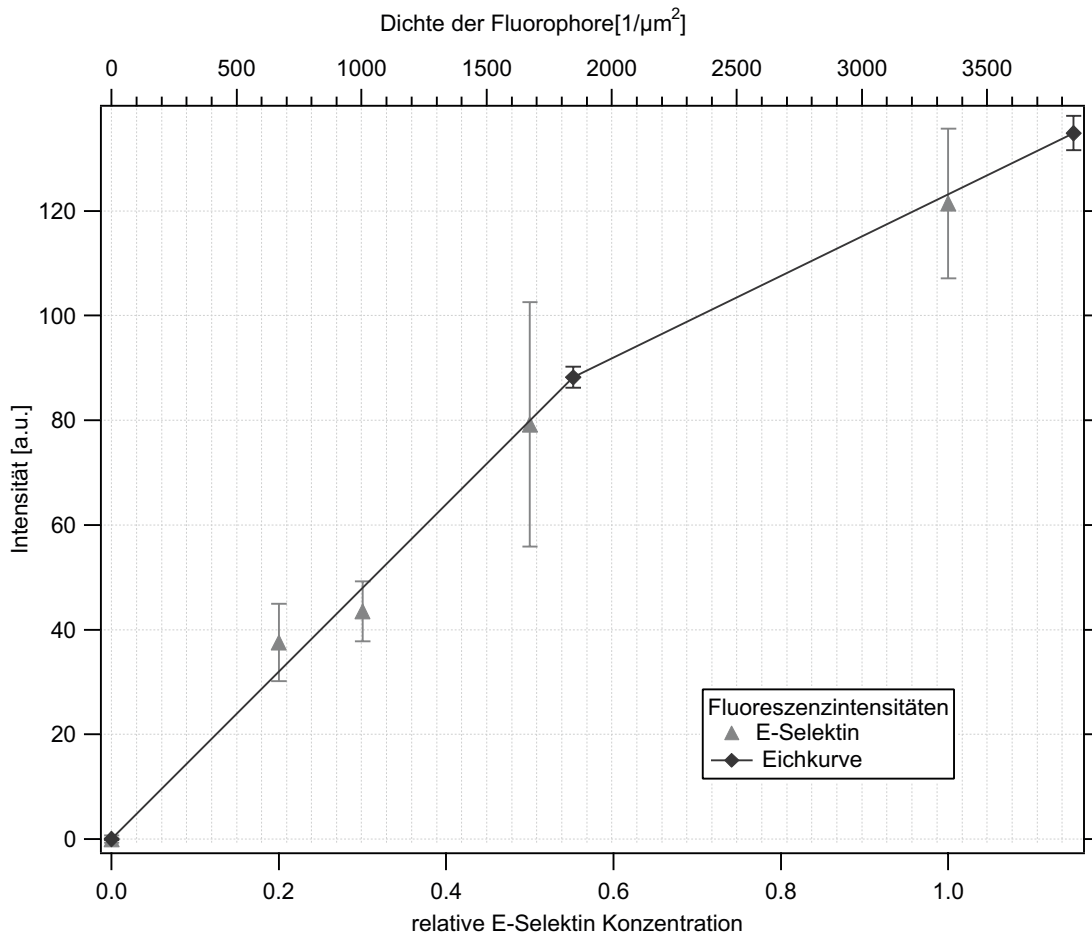


Abbildung 2.10: Graphische Darstellung der Oberflächendichte. Die E-Selektindichte wird am horizontalen Schnittpunkt des Messpunktes mit der Eichkurve abgelesen.

Selektin (mouse anti-human e-selectin (Chemicon, Temecula, USA)) in ausreichender Konzentration (Arbeitskonzentration $5\mu\text{g/ml}$) für eine Stunde inkubiert. Nach vorsichtigem dreimaligen Spülen mit S1-Puffer wird ein zweiter, rhodamin-markierter Antikörper gegen die IgG-Domäne des ersten Antikörpers (Chemicon) ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Dieser Antikörper bindet an den ersten Antikörper wie in Abbildung 2.9b schematisch dargestellt (vgl. ELISA). Es wird erneut gespült und die Fluoreszenzintensität wird sofort gemessen. Dazu werden für alle Proben am Axiovert 200 mit derselben Beleuchtung und Kameraeinstellung Aufnahmen gemacht (vgl. Abbildung 2.9b) und die Fluoreszenzintensität wird über einen gleich großen Ausschnitt gemittelt.

Um den so erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten eine Oberflächendichte zuordnen zu können, wird mit einer Oberfläche bekannter Fluorophorendichte kalibriert. Dazu werden Lipiddoppelschichten aus dem Phos-

pholipid 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (POPC von Avanti Polar Lipids) mit Beimischungen des lipidverankerten Rhodaminderivats N-(6-tetramethylrhodaminethiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (TRITC DHPE von Chemicon) in verschiedenen Konzentrationen (0%, 0,06% und 0,125%) mittels Vesikelfusion hergestellt und ihre Fluoreszenzintensität wird wie oben ermittelt (vgl. Abbildung 2.9d). Dabei bleiben die Mikroskop- und Kameraeinstellungen unverändert. Da die Dichte der Fluorophore in der Doppelschicht gut abgeschätzt werden kann, kann eine Eichkurve erstellt werden (vgl. Abbildung 2.10). Aufgrund des relativ komplexen Verfahrens mit dem die Selektindichte bestimmt wird, und da die stark vereinfachende Annahme, dass alle Antikörper 1:1 an das Substrat bzw. den ersten Antikörper binden, gemacht wird, kann diese Quantifizierung nur als Abschätzung betrachtet werden. Die ermittelte Größenordnung steht im Einklang mit den Ergebnissen z.B. von Greenberg et al. (2000), die für Konzentrationen der Inkubationslösung von 0,5 - 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-Selektin Oberflächendichten von 400-2000 Molekülen pro μm^2 erhalten. Die Ergebnisse, die in Abbildung 2.10 graphisch dargestellt sind, sind in Tabelle 2.1 noch einmal zusammengefasst.

Überprüfung der Passivierung

Um die Qualität der Passivierung durch fettfreie Milch zu überprüfen, werden Vesikel, die 10% sLe^X-GSL und kein PEG-Lipid enthalten, auf einer Oberfläche, die keine E-Selektine, sondern nur fettfreie Milch aufweist, inkubiert. Es wird mit dem Reflexion-Interferenz-Kontrast-Mikroskop (vgl. Kapitel 3.1) keine starke Adhäsion beobachtet, die Vesikel fluktuieren frei über dem Substrat (vgl. Abbildung 2.11a). In einem weiteren Kontrollexperiment werden Vesikel, die 15% sLe^X-GSL enthalten, mittels der magnetischen Pinzette (vgl. Kapitel 6) von einer passivierten Oberfläche, die keine Rezeptoren enthält, abgehoben. Die Vesikel fluktuieren zunächst frei über dem Substrat und zeigen beim Ablösen einzelne Adhäsionspunkte, die vorher nicht zu erkennen waren (vgl. Abbildung 2.11b). Diese Punkte dienen also nicht als Nukleationspunkte für das Anwachsen der Adhäsionsfläche, sondern es handelt sich um isolierte Störstellen in der Passivierung.

Schlussfolgerung

Konzentration der E-Selektin-Inkubationslösung [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	1	1,5	2,5	5
Selektindichte [$1/\mu\text{m}^2$]	800 \pm 150	900 \pm 100	1700 \pm 700	3250 \pm 550

Tabelle 2.1: Oberflächendichte der E-Selektine in Abhängigkeit von der Konzentration der Inkubationslösung

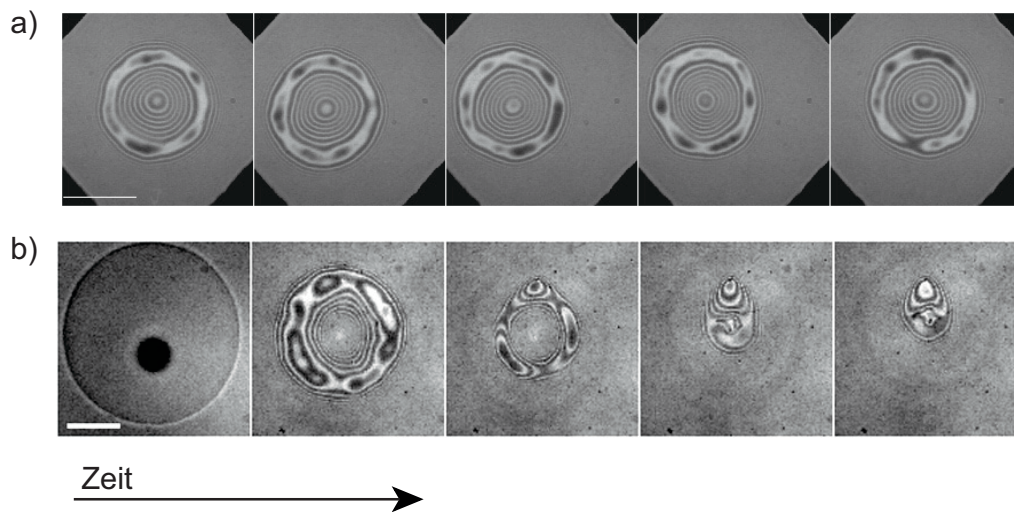


Abbildung 2.11: a) Vesikel, die sLe^X-GSL enthalten, fluktuieren frei über einer Oberfläche, die keine E-Selektine, sondern nur fettfreie Milch enthält.
 b) Mittels der magnetischen Pinzette wird ein Vesikel, der sLe^X-GSL enthält, von einer Oberfläche mit fettfreier Milch abgehoben. Es ist nur ein winziger Adhäsionspunkt zu erkennen (Massstab: 10 μ m).

Als Ergebnis der Charakterisierung lässt sich festhalten, dass die verwendeten Oberflächen sich in ihrer Belegungsdichte an spezifischen Rezeptoren kontrolliert variieren lassen und die gewählte Passivierung sich als ausreichend erweist.

Kapitel 3

Messmethoden

3.1 Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie RIKM

Die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) ist als Interferentechnik besonders gut geeignet, Strukturen in der Nähe eines Substrats genau abzubilden. Die Methode wurde zuerst von Curtis (1964) zur Untersuchung der Zelladhäsion verwendet, und mit der Einführung der Antiflex-Technik durch Ploem (1975) entscheidend verbessert.

Sie findet ihre Anwendung sowohl in der Beobachtung dynamischer Prozesse wie Zellbewegung (Schindl et al. 1995) und Membranfluktuation (Rädler et al. 1995a, Marx et al. 2002), als auch in der Untersuchung von Adhäsionseigenschaften von Modellzellen (Nardi et al. 1998, Kloboucek et al. 1999, Lorz 1999, Guttenberg et al. 2001). Benetzungseigenschaften von Oberflächen bieten ebenso ein Anwendungsgebiet der RIKM-Technik (Rädler et al. 1995b, Wiegand et al. 1997), wie die Bestimmung von Objekt-Substratabständen (Rädler & Sackmann 1993). In der modifizierten Variante als Zwei-Farben-RIKM ist eine absolute Abstandsbestimmung nicht-adhärerter Objekte bis zu einer Höhe von $0,8\mu\text{m}$ über dem Substrat möglich (Schilling et al. 2003).

3.1.1 Aufbau des Mikroskops

Das RIKM ist ein invertiertes Mikroskop, dessen Beleuchtungsstrahlengang aus der Zeiss-Axiomat-Serie (Zeiss, Oberkochen) stammt und dessen Beobachtungsstrahlengang am Lehrstuhl konstruiert wurde. Zunächst sollen der Aufbau des Mikroskops und der optische Pfad kurz skizziert werden. Anschließend wird die Kontrastverbesserung durch die Antiflextechnik diskutiert, da diese Technik besonders für die Betrachtung dünner Schichten, wie zum Beispiel Lipiddoppellagen, unbedingt notwendig ist.

Optischer Weg

Der Aufbau des RIKM ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampfampe hoher Intensität (HBO 103 (Osram, München)), die inkohärentes Licht (vgl. Kapitel 3.1.2) in einem Linienspektrum aussendet. Für das RIKM wird mit einem Interferenzfilter die grüne Linie (546nm) ausgewählt. Das Licht gelangt über eine Köhleroptik (diese sorgt für eine gleichmäßige Ausleuchtung der Objektebene und bildet außerdem die Leuchtfeldblende in diese Ebene ab) und einen dichroitischen Umlenkspiegel in das Objektiv, das nun als Kondensator dient (63x/1,25 Antiflex-Neofluar Ölimmersion (Zeiss, Oberkochen)). An den verschiedenen Grenzflächen der Probe reflektiertes Licht interferiert und wird durch das Objektiv und die abbildende Linse in die CCD-Kamera gelenkt (10-bit, C4880-85 (Hamamatsu, Japan)). Die entstehenden digitalen Bilder können mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware „open BOX“, die am Lehrstuhl entwickelt wurde (Schilling 1999, Keller et al. 2001), direkt und in Echtzeit gespeichert werden.

Kontrastverbesserung durch die Antiflextechnik

Die von Ploem (1975) entwickelte Antiflextechnik trägt vor allem für schwach reflektierende Objekte wie z.B. Lipiddoppelschichten ($I/I_0 \approx 10^{-3}$) wesentlich zur Kontrastverbesserung bei, da sie Streulicht, das in der Mikroskopoptik entsteht, unterdrückt. Wie in Abbildung 3.1 skizziert, wird ein Linearpolarisator in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht (polarisiertes Licht in Abbildung 3.1 ist als gestrichelte Linie dargestellt). Ein dazu senkrecht gekreuzter Analysator wird vor der Kamera bzw. dem Okular positioniert. Zusätzlich befindet sich oberhalb des Objektivs ein $\lambda/4$ -Plättchen, welches linearpolarisiertes Licht in zirkularpolarisiertes umwandelt. Nun werden die speziellen Eigenschaften von zirkularpolarisiertem Licht geschickt genutzt: bei der Reflexion unter kleinen Winkeln an optisch dünneren Medien erhält die Komponente des elektrischen Felds, die parallel zur Einfallsebene liegt, eine Phasenverschiebung π , die Komponente senkrecht zur Einfallsebene bleibt unverändert. Im Falle einer Reflexion an optisch dichteren Medien bleibt die parallele Komponente erhalten, die senkrechte verschiebt ihre Phase um π (Fresnel-Gleichungen; (vgl. z.B. Hecht 1987)). Somit wird bei jeder Reflexion die Richtung der Zirkularpolarisation geändert und beim erneuten Durchgang durch das $\lambda/4$ -Plättchen entsteht Licht, das senkrecht zur ursprünglichen Richtung linearpolarisiert ist. Dieses Licht (in Abbildung 3.1 durch Plus-Symbole gekennzeichnet) kann den Analysator passieren, Streulicht (Stern-Symbole), das nicht oberhalb des Objektivs entstanden ist, wird herausgefiltert.

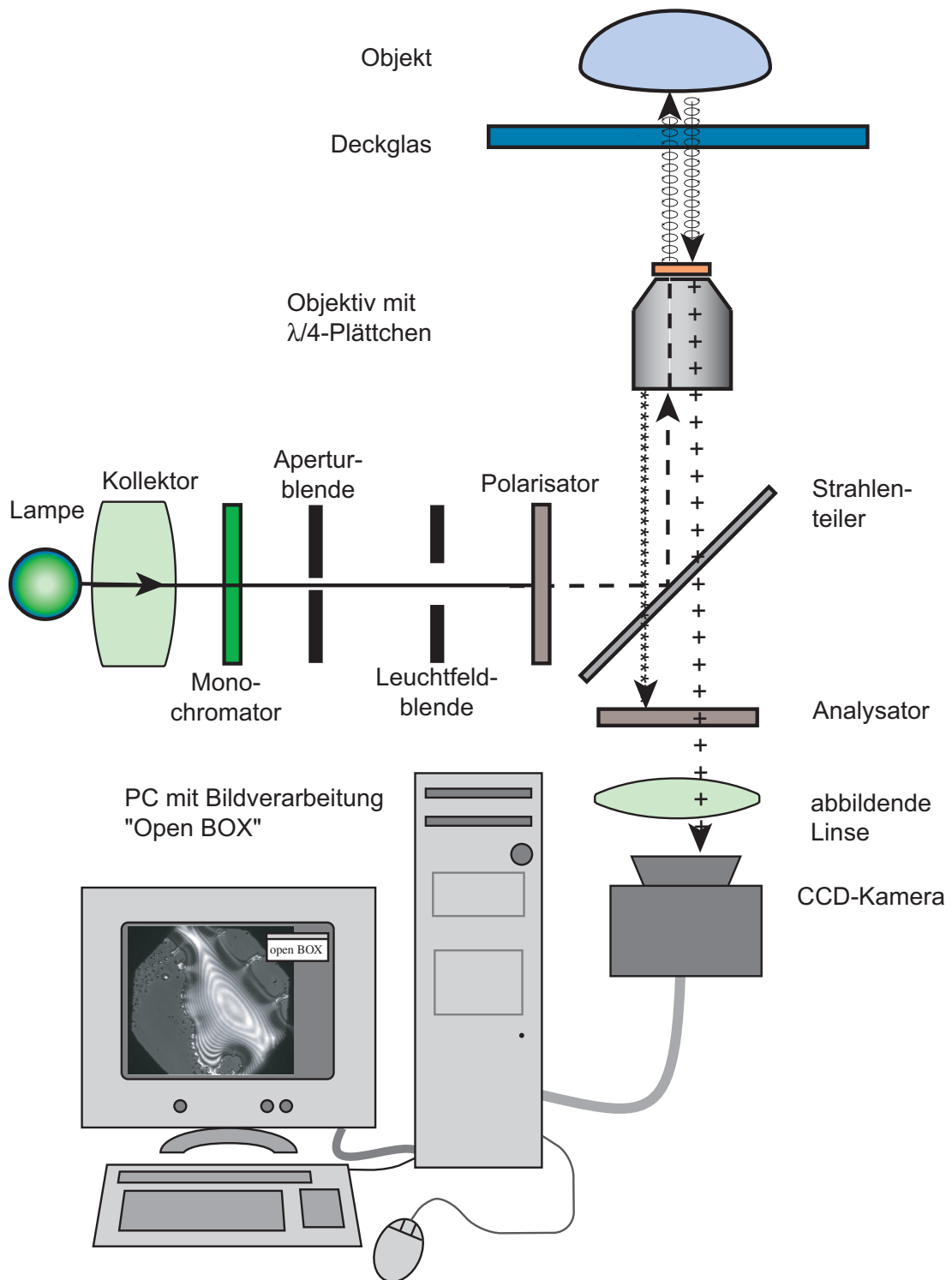


Abbildung 3.1: Optischer Weg im RIKM: Monochromatisches Licht wird durch das Objektiv von unten auf die Probe gelenkt. Licht, das an den Grenzflächen der Probe reflektiert wird, gelangt wiederum durch das Objektiv und eine abbildende Optik in die digitale Kamera.

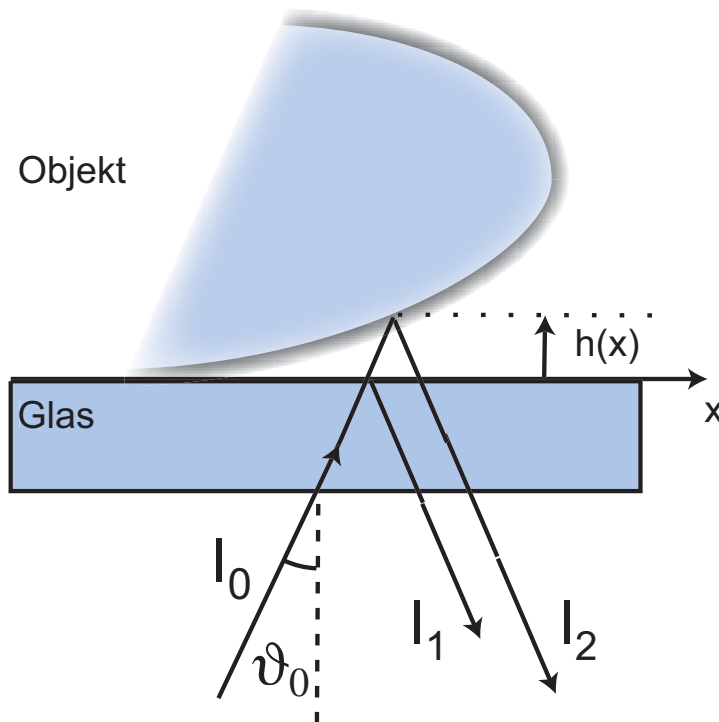


Abbildung 3.2: Strahlenverlauf bei der Reflexion im RIKM. Der optische Wegunterschied hängt von der Höhe $h(x)$ des Objekts über dem Substrat und dem Einfallswinkel ϑ_0 ab.

3.1.2 Theorie der Bildentstehung

Im nächsten Abschnitt soll zuerst auf die Bildentstehung bei der Reflexionsmikroskopie eingegangen werden, wobei besonderes Augenmerk auf die partielle Kohärenz, die für das Auflösungsvermögen von großer Bedeutung ist, gelegt wird. Anschließend werden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Höhe eines Objekts über dem Substrat skizziert und die Rekonstruktion von Objekten in der Nähe der Oberfläche diskutiert.

Partielle Kohärenz als Bedingung für Interferenz

Die unabdingbare Voraussetzung für das Entstehen eines Interferenzbildes ist die Interferenzfähigkeit oder Kohärenz von Wellenzügen. Die Definition von Kohärenz und die daraus entstehenden Bedingungen für interferenzfähige Beleuchtung werden im folgenden kurz umrissen.

Kohärenz ist definiert als die Korrelationsfunktion Γ_{12} einer Welle E_1 zu einem Zeitpunkt $t + \tau$ mit einer Welle E_2 zum Zeitpunkt t .

$$\Gamma_{12} = \langle E_1(t + \tau)E_2(t) \rangle \quad (3.1)$$

$$\gamma_{12} = \frac{\Gamma_{12}}{\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}} \quad (3.2)$$

γ_{12} ist die normierte Form von Γ_{12} und wird als komplexer Kohärenzgrad bezeichnet. Betrachtet man zwei Lichtwellen der allgemeinen Form

$$E_j = E_{0j}(t) \cdot \exp\{i[\Theta_j(t) - \omega_j t]\}, \quad j = 1, 2 \quad (3.3)$$

so resultiert die Überlagerung unter einem Winkel von 0° dieser beiden Wellen in einer Gesamtintensität I , die vom optischen Wegunterschied $2kh(x) + \delta$ und von der Korrelation Γ_{12} der beiden Wellen abhängt ($h(x)$ ist die Höhe über dem Substrat, $k = 2\pi n/\lambda$ der Wellenvektor und δ berücksichtigt eventuelle Phasensprünge bei der Reflexion):

$$I(\vartheta) = E_1^2 + E_2^2 + 2E_1E_2\Gamma_{12} \cos(2kh(x) + \delta) \quad (3.4)$$

Für inkohärente Wellen ($\Gamma_{12} = 0$) verschwindet der Interferenzterm und die resultierende Intensität ist lediglich die Summe der Einzelintensitäten. Sind die beiden Lichtwellen jedoch kohärent, so wird die Gesamtintensität durch den Kohärenzterm moduliert, und zwar in dem Maße, in dem die beiden Wellen korreliert sind. Die Sichtbarkeit der Interferenz S ist dabei ein Maß für den Kontrastunterschied von konstruktiver und destruktiver Interferenz.

$$S = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} = 2|\gamma_{12}| \frac{\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}}{I_1 + I_2} \quad (3.5)$$

Es ist sinnvoll, zwischen zwei Beiträgen zur Kohärenz zu unterscheiden, der zeitlichen und der räumlichen Kohärenz. Die zeitliche Kohärenz beschreibt die Länge eines Wellenzuges, der von einem Molekül ausgesandt wird und legt damit einen maximalen optischen Wegunterschied zwischen zwei reflektierten Wellen fest, der noch zu Interferenz führen kann. Da die Länge eines Wellenzuges für ein Hg-Molekül in einer Hochdrucklampe bei etwa 1 mm liegt, ist dies für die Anwendung in der RIK-Mikroskopie ausreichend und damit ist die zeitliche Kohärenz immer gegeben.

Die räumliche Kohärenz

$$J_{12} = \Gamma_{12}(0) = \langle E_1(t)E_2(t) \rangle \quad (3.6)$$

soll hier etwas eingehender diskutiert werden. Sie beschreibt, wie weit zwei Punkte in einer Ebene voneinander entfernt liegen können, um kohärent beleuchtet werden zu können.

Im *van Cittert-Zernicke*-Theorem (Born & Wolf 1999) wird die Sichtbarkeit der Interferenz als Funktion des lateralen Abstandes zweier beleuchteter Punkte in einer Ebene A entwickelt. Man betrachtet dazu eine ausgedehnte Lichtquelle, die quasimonochromatisches, inkohärentes Licht aussendet und die in einer Ebene σ parallel zu A liegt (vgl. Abbildung 3.3). Die Ausdehnung der Lichtquelle

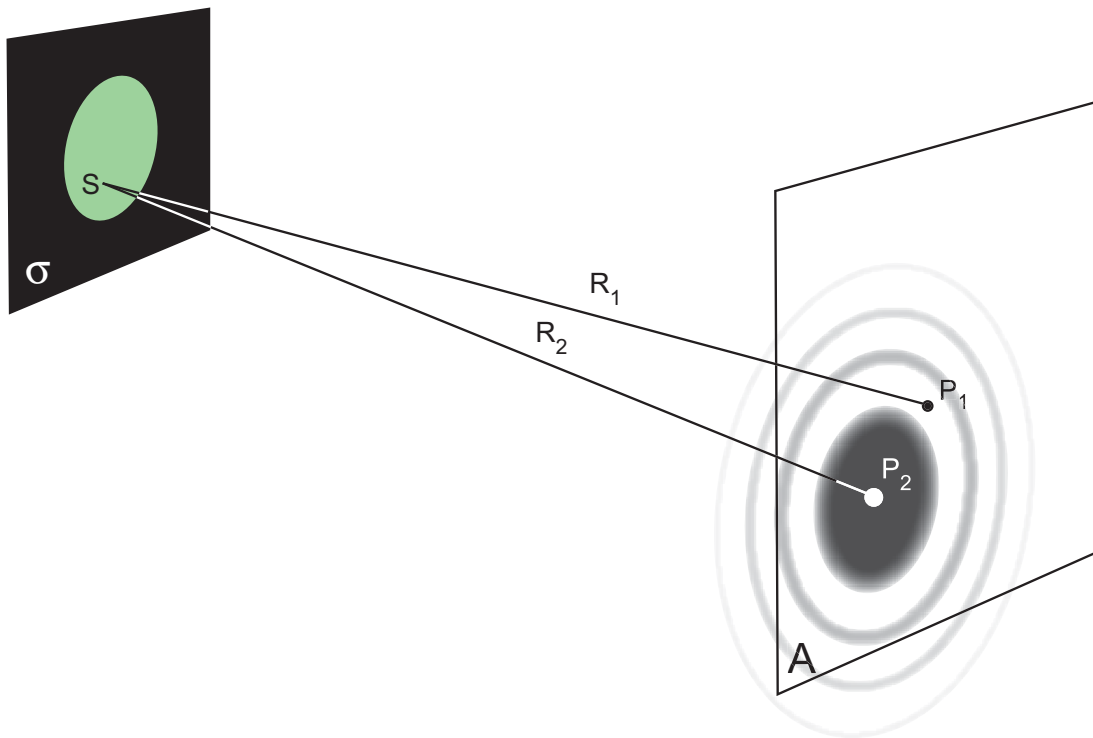


Abbildung 3.3: Für eine kreisförmige, homogene Lichtquelle σ lässt sich die laterale Kohärenz als Beugungsbild einer sphärischen Welle an den Grenzlinien der Lichtquelle beschreiben. Die Form des Beugungsbildes (in der Ebene A in grau angedeutet) entspricht dabei einer Besselfunktion erster Ordnung.

ist klein gegen den Abstand der beiden Ebenen. Daher sind alle Winkel zwischen der Verbindung der Schwerpunkte beider Ebenen und der Linie, die einen Punkt S in der Quelle mit einem Punkt P in der Ebene A verbindet, klein. Nun zerlegt man die Lichtquelle in kleine, statistisch unabhängige Elemente, die jedes für sich kohärentes Licht aussenden. Die Lichtwelle am Punkt P kann dann als Superposition von Wellen verstanden werden, die von diesen Elementen ausgesandt werden. Nachdem man davon ausgeht, dass die Lichtquelle inkohärent ist, sind die Wellenzüge, die von verschiedenen Elementen ausgesendet werden, statistisch unabhängig und damit inkohärent.

Der unter diesen Voraussetzungen entstehende Ausdruck für die Kohärenz eines Punktes P_1 in Bezug auf einen Punkt P_2 hat die Form des Beugungsbildes einer sphärischen Welle, die eine Blende der Größe der Lichtquelle σ passiert (vgl. Abbildung 3.3). Das Beugungsbild, das sich dabei ergibt, hat sein Maximum nullter Ordnung im Punkt P_2 und wird am Punkt P_1 betrachtet, um die Korrelation zwischen P_1 und P_2 festzustellen.

Bei der Anwendung im Mikroskop sind weitere Vereinfachungen möglich (vgl. Abbildung 3.3): die Lichtquelle σ , die durch die Aperturblende und deren Öffnungswinkel beschrieben wird, ist kreisförmig und von homogener Intensität. Da-

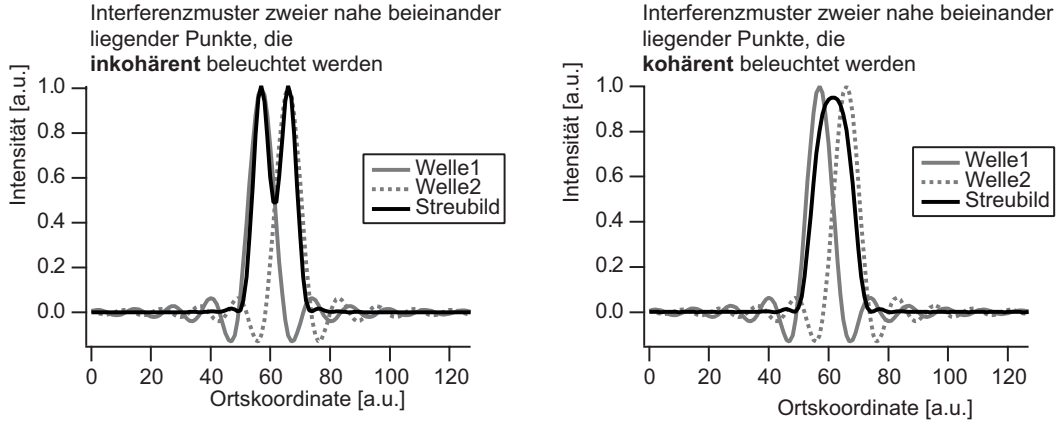


Abbildung 3.4: Das Interferenzmuster zweier Wellen hängt von ihrer lateralen Kohärenz ab. Sie interferieren, wenn sie in einer Kohärenzfläche mit dem Durchmesser $d = d_{coh} \leq \frac{0.16\lambda}{\sin \sigma}$ liegen, ansonsten werden die Einzelintensitäten addiert und es entstehen zwei getrennte Maxima.

mit vereinfacht sich der komplexe Kohärenzgrad γ_{12} zu

$$\gamma_{12}(D) = \frac{2J_1(D)}{D} \quad (3.7)$$

wobei $J_1(D)$ die Besselfunktion erster Ordnung ist. Das Argument $D = \frac{2\pi}{\lambda} d \sin \sigma \approx \frac{2\pi}{\lambda} d \frac{R}{s}$ ist eine Funktion des Abstandes R zwischen der Quelle und der Ebene A , der Größe der Quelle σ , der Wellenlänge λ und des Abstands d der Punkte P_1 und P_2 .

Man spricht von kohärenter Beleuchtung, wenn γ_{12} größer als 0,88 ist ($D=1$). Dadurch wird eine maximale kohärent beleuchtete Fläche mit dem Durchmesser d definiert:

$$d = d_{coh} \leq \frac{0.16\lambda}{\sin \sigma} \quad (3.8)$$

In Abbildung 3.3 ist die Besselfunktion durch Grauwerte in der Ebene A angedeutet. Zwei Punkte können dann kohärent beleuchtet sein, wenn sie beide im Hauptmaximum der Besselfunktion liegen, in den Maxima höherer Ordnung ist nur eine partielle Kohärenz möglich ($\gamma_{12} < 0.88$).

Da im Mikroskop die Größe der Lichtquelle durch die Öffnung der Aperturblende direkt beeinflussbar ist, kann die laterale Kohärenz und damit das laterale Auflösungsvermögen variiert werden (vgl. Abbildung 3.4). Durch die Öffnung der Aperturblende erreicht man eine Erhöhung der lateralen Auflösung, die aber immer mit einem Verlust an Tiefenschärfe Δz verbunden ist ($\Delta z \propto 1/\sigma$ (vgl. z.B. Born & Wolf 1999)).

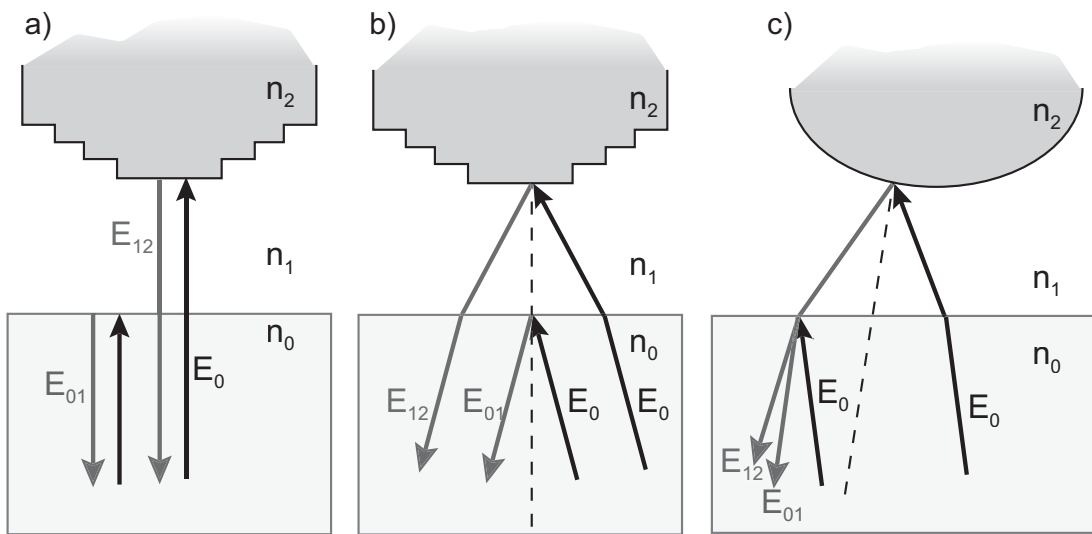


Abbildung 3.5: Die drei Theorien zur Rekonstruktion des Objekt-Substrat-Abstands: Bei der einfachen Theorie (a) wird senkrechter Lichteinfall und Reflexion an Oberflächen, die parallel zur Oberfläche liegen, angenommen. Die *finite-aperture*-Theorie (b) berücksichtigt Lichteinfall unter einem Winkel, reflektiert aber immer noch an oberflächenparallelen Schichten. Die Nicht-lokale Theorie (c) schließlich trägt zusätzlich der Krümmung der betrachteten Objekte und ihrer lokalen Neigung gegen die Bildebene Rechnung.

Resultierende Intensität und Bestimmung der Höhe über dem Substrat

Die Interferenz von Lichtwellen, die durch Reflexion entstanden sind, hängt zum einen von der Reflektivität der beteiligten Objekte ab, zum anderen von deren geometrischen Eigenschaften.

Die Intensitäten der reflektierten Lichtwellen I_1 und I_2 werden durch die Reflexionskoeffizienten $r_{ij} = r_{ij}(\vartheta, n_i, n_j)$ der zu untersuchenden Schichten bestimmt

$$I_1 = r_{01}^2 I_0 \quad I_2 = (1 - r_{01}^2)^2 r_{12}^2 I_0 \quad (3.9)$$

Da für die RIK-Mikroskopie ein Ölimmersionsobjektiv verwendet wird und der Brechungsindex des Öls dem von Glas entspricht, ist die erste reflektierende Schicht die Deckglasoberseite, die damit den Referenzstrahl I_1 bildet.

Zusätzlich spielt die endliche Beleuchtungsapertur und die Krümmung des betrachteten Objekts eine wichtige Rolle, da durch die Winkelerhaltung bei der Reflexion (Einfallswinkel gleich Ausfallswinkel) die Winkelverteilung, die durch die Beleuchtungsapertur entsteht, nach der Reflexion an gekrümmten Oberflächen stark verändert wird (vgl. Abbildung 3.5c).

Zur Bestimmung der Höhe eines Objekts über dem Substrat ist es zweckmäßig, verschiedene Vereinfachungen vorzunehmen, da die exakte Berechnung aufgrund der oben erwähnten Gegebenheiten sehr komplex ist. Es gibt dabei im wesentlichen drei Modelle, die hier nur kurz skizziert werden sollen. Eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Kühner (1996).

Bei der einfachen Theorie des senkrechten Einfalls nimmt man an, dass Licht nur unter einem Winkel von 90° zu den reflektierenden Oberflächen eingestrahlt wird. Außerdem werden alle reflektierenden Oberflächen als parallel zueinander angenommen (vgl. Abbildung 3.5a). Die daraus resultierende Intensität hat die Form

$$I(h) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(2kn_1 h(x)) \quad (3.10)$$

n_1 ist dabei der Brechungsindex des Puffers. Mit dieser stark vereinfachten Beschreibung lassen sich relative Höhenunterschiede bereits gut darstellen, absolute Höhenbestimmungen sind aber nur schlecht möglich. In den Experimenten, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, ist die absolute Höhe dadurch gegeben, dass stets an einem Deckglas adhärierte Objekte betrachtet werden. Somit ist diese einfache Theorie zur Auswertung ausreichend.

In einem zweiten Modell, der Theorie der endlichen Beleuchtungsapertur, wird berücksichtigt, dass Licht unter einem bestimmten Maximalwinkel α , der durch die Beleuchtungsapertur gegeben ist, einfallen kann (vgl. Abbildung 3.5b). Die mögliche Krümmung eines Objekts wird weiterhin vernachlässigt (eine ausführliche Herleitung findet sich bei Rädler (1993)): Die resultierende Intensität hat die folgende Form:

$$I = 4\pi \sin^2 \frac{\alpha}{2} \left[I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \frac{\sin 2kh \sin^2 \frac{\alpha}{2}}{2kh \sin^2 \frac{\alpha}{2}} \cos \left\{ 2kh \left(1 - \sin^2 \frac{\alpha}{2} \right) \right\} + \delta \right] \quad (3.11)$$

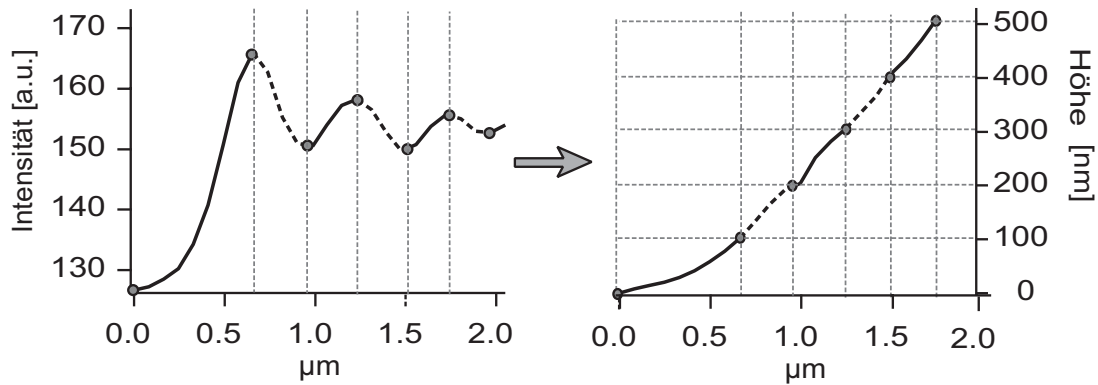


Abbildung 3.6: Bei der Rekonstruktion eines Objekts aus dem Interferenzbild wird jeweils zwischen zwei Extrema eine arccos-Transformation durchgeführt. Um zu entscheiden, wie der neue Zweig an den vorherigen angepasst werden muss, und ob die Steigung eines Abschnitts positiv oder negativ ist, muss man die ungefähre Form des Objekts als bekannt voraussetzen.

Die Abhängigkeit der Intensität in Gleichung (3.11) vom Aperturwinkel hat zur Folge, dass die Sichtbarkeit S (vgl. Gleichung (3.5)) mit zunehmender Höhe über dem Substrat abnimmt und zwar umso schneller, je größer der Aperturwinkel ist. Man kann dieses Verhalten dazu benutzen, durch die Wahl großer Aperturwinkel weiter oben liegende Objektteile auszublenden und sich auf die Kontaktfläche eines Objekts (z.B. einer Zelle) zu beschränken.

Die Nicht-Lokale Theorie (vgl. Abbildung 3.5c) schließlich berücksichtigt Krümmungen des betrachteten Objektes und hat damit eine noch komplexere Form als die Theorie der endlichen Beleuchtungsapertur (vgl. Kühner 1996). Ein Vergleich der beiden zuletzt genannten Theorien wurde von Wiegand et al. (1998) publiziert, dort werden Korrekturfaktoren angegeben, die den Kontaktwinkel für stark geneigte Objekte anpassen. Für die hier betrachteten Objekte ist diese Anpassung allerdings nicht notwendig, da die Kontaktwinkel in der Regel so klein sind, dass sich die Korrektur nicht auswirkt.

Rekonstruktion von Objektkonturen

Die Rekonstruktion eines Objekts in der Nähe des Substrats mit der einfachen Theorie ist eine arccos-Transformation, die stückweise auf das Interferenzmuster angewandt wird. Eine Darstellung der stückweisen Definition findet sich in Abbildung 3.6. Auflösen von Gleichung (3.10) nach $h(x)$ und Ersetzen der reflektierten Intensitäten I_1 und I_2 durch die experimentell zugänglichen Extremalwerte I_{\max} und I_{\min} führt zu einer Gleichung für die Höhe über dem Substrat:

$$h(x) = \frac{\lambda}{4\pi n_1} \arccos \frac{2I(x) - (I_{\max} + I_{\min})}{I_{\max} - I_{\min}} \quad (3.12)$$

Mit $\lambda=546\text{nm}$ und Wasser ($n_1=1.33$) als Medium zwischen Glas und Objekt, ergibt sich für den Höhenunterschied zwischen zwei Extremalwerten $\Delta h=102,7\text{nm}$.

Ein wesentliches Problem der Interferenztechnik besteht darin, dass es aufgrund der Periodizität von $\lambda/4n_1$ nicht möglich ist, ein Objekt zu rekonstruieren, dessen ungefähre Form nicht bekannt ist. Man kann nämlich anhand der Intensitätsverteilung nicht entscheiden, ob die Objektkontur an der Stelle eines Extremalwertes die bisherige Krümmungsrichtung beibehält oder in eine andere Richtung weiterführt. Ebenso kann man ohne einen Referenzpunkt, der z.B. durch eine Adhäsionsfläche gegeben sein kann, nichts über die absolute Höhe, in der sich ein Objekt befindet, aussagen. Um diese Probleme zu umgehen und Höhe und Form exakt bestimmen zu können, kann man eine weitere Wellenlänge einführen, die eine andere Periodizität besitzt, damit die resultierende Periodizität erhöhen und somit eine eindeutige Aussage an den Umkehrpunkten der Intensität ermöglichen (Schilling et al. 2003).

3.2 Die magnetische Pinzette

Mit der magnetischen Pinzette, wie sie in dieser Arbeit verwendet wird, wird eine Kraft nach oben, also senkrecht zur Beobachtungsebene ausgeübt und der Einfluss dieser Kraft auf das Adhäsionsverhalten und die Kontur adhärierter Vesikel wird untersucht. Der dazu verwendete Messaufbau, wie in Abbildung 3.7 dargestellt, wurde am Lehrstuhl entwickelt und ist bei Stefanie Gönnerwein (2003) genau beschrieben.

Er besteht aus einem Spulenpaar mit Weicheisenkern, das oberhalb der Probe angebracht wird. Die Geometrie der Polschuhe garantiert dabei, dass die Feldlinien parallel zur Probenoberfläche verlaufen und sich zu den Polschuhen hin verdichten. Auf einen magnetischen Dipol, der sich in diesem Gradientenfeld befindet, wird also eine Kraft ausgeübt, die genau senkrecht nach oben zeigt. Die Spannung an den beiden Spulen wird so gewählt, dass der Stromfluss durch die Spulen und damit das entstehende Magnetfeld während eines Kraftimpulses konstant ist. Das Spannungssignal wird an einem Widerstand, der zwischen Verstärker und Spule geschaltet wird, abgegriffen und im Computer mit den Bild-daten synchronisiert.

Als Kraftüberträger dienen superparamagnetische Kugeln, hier Polystyrenkugeln mit eingebetteten Eisenoxid-Teilchen (Dynabeads M-450, Dynal, Norwegen) mit einem Durchmesser von $4,5\mu\text{m}$. Sie besitzen eine Tosyl-aktivierte Oberfläche, die es ermöglicht, die Kugeln kovalent an Aminogruppen zu binden. Die immer gleichbleibende Zusammensetzung der Kugeln und die vollständige Magnetisierung schon bei kleinen Magnetfeldern garantieren dabei die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Die Vesikel, die in den Experimenten mit der magnetischen Pinzette verwendet werden, enthalten 1% lipidgekoppeltes Amino-PEG-2000 (1,2-Distearoyl-sn-

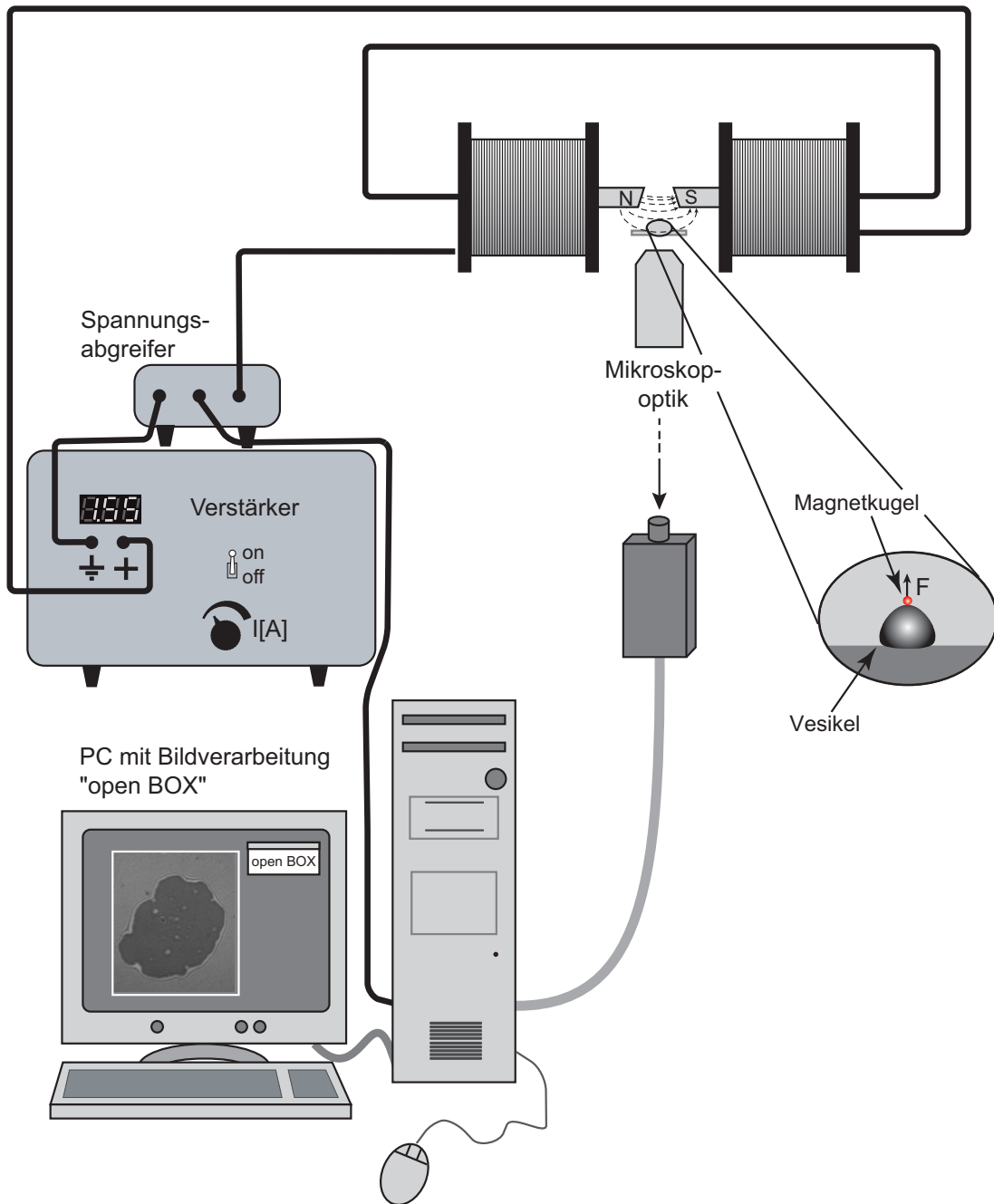


Abbildung 3.7: Schematischer Messaufbau der magnetischen Pinzette: Ein Spulenpaar mit Weicheisenkernen wird so oberhalb der Probe angebracht, dass die Feldlinien des Magnetfelds in der Probe horizontal verlaufen und sich zum Magneten hin verdichten. Dadurch wird ein magnetischer Dipol in Richtung des Gradienten nach oben gezogen. Die Stromstärke, die proportional zur Kraft ist, kann an einem Verstärker variabel gewählt werden. An einem Spannungsabgreifer wird das Spannungssignal in den Computer eingelesen und dort mit den Bilddaten verknüpft.

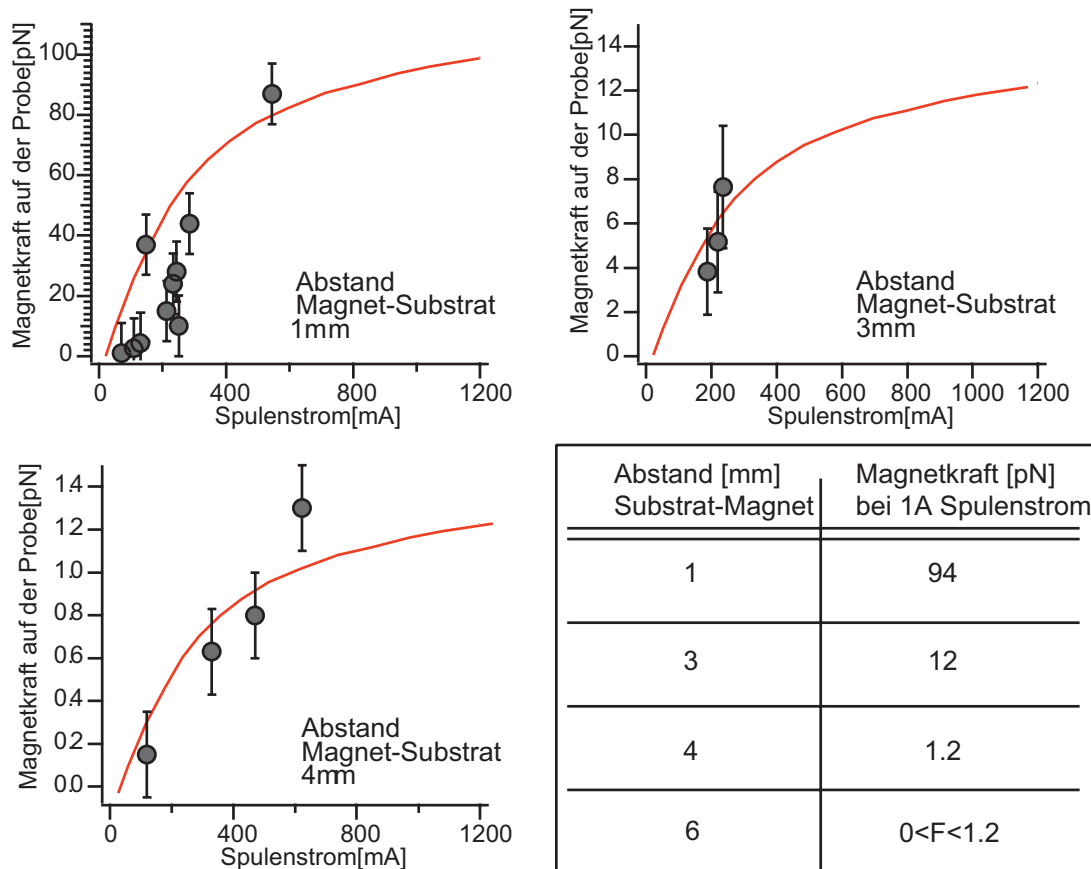


Abbildung 3.8: Kalibration der magnetischen Pinzette: Vesikel werden durch Magnetkraft zum Schweben gebracht und die Gewichtskraft wird der anliegenden Magnetkraft gleichgesetzt. Die Messdaten werden an die Hysteresekurve des Spulenpaares angepasst. Der Wert der Magnetkraft bei 1A Spulenstrom ist angegeben, weil immer mit dieser Stromstärke gemessen wird.

Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Amino(PEG)2000] von Avanti Polar Lipids), an das die Magnetkugeln gebunden werden. Dazu werden eine Suspension der Magnetkugeln ($4 \cdot 10^6$ Kugeln pro ml), Puffer und etwas Wasser im Verhältnis 1:9:1/2 sorgfältig gemischt. In dieser Lösung, die eine etwas geringere Osmolarität als der Quellpuffer besitzt (Unterschied etwa 15mOsm), werden die fertigen, durch die Pufferbedingungen etwas abgeflachten Vesikel mit den Kugeln für eine Stunde unter vorsichtigem Rühren im Rotator gemischt.

Zur Kalibration des Magneten werden nicht-adhärenzte Vesikel so stark angehoben, dass sie in konstanter Höhe über dem Substrat schweben. Die durch den Magneten hervorgerufene stromabhängige Kraft wird der Gewichtskraft ei-

ner Kugel mit dem Vesikelradius r gleichgesetzt:

$$F_{mag}(I) = g\Delta\rho V = g\Delta\rho\frac{4\pi}{3}r^3 \quad (3.13)$$

$\Delta\rho$ ist dabei der Dichteunterschied zwischen der Sucroslösung in den Vesikeln und dem salzhaltigen Puffer im Medium ($\Delta\rho = 50\frac{\mu g}{mm^3}$). Für die verwendeten Abstände von Magnet und Probe wurden jeweils eigene Kalibrationen durchgeführt.

In Abbildung 3.8 sind die Kalibrationskurven dargestellt: aufgetragen ist jeweils die Magnetkraft, die notwendig ist, um einen Vesikel zum Schweben zu bringen gegen den dazugehörigen Spulenstrom. Um die Kalibrationsdaten extrapolieren zu können, wird den Daten die Hystereseurve des Magneten angepasst, wie sie mit einer Hallsonde zwischen den Polschuhen gemessen wurde (Gönnenwein 2003). Diese Kurve wird gewählt, weil sie das Sättigungsverhalten des Magneten korrekt wiedergibt. Es ergeben sich bei einem Spulenstrom von 1A für die Magnet-Substrat-Abstände 1, 3 und 4mm Magnetkräfte von 94, 12 und 1,2pN; die Magnetkraft auf der Probe ist also abstandsabhängig und fällt mit zunehmendem Magnet-Substrat-Abstand stark ab. So können, je nach verwendetem Abstand, Kräfte vom sub-Pico-Newton-Bereich bis ungefähr 100pN aufgebaut werden.

Die hier vorgestellte Kalibration dient zur Abschätzung der anliegenden Kräfte; eine genaue Bestimmung ist problematisch, da durch das reduzierte Volumen der einzelnen Vesikel der Radius und damit die Gewichtskraft in unterschiedlichem Maße fehlergeschätzt wird. Außerdem liefert die Hallsonde ein gemittelttes Magnetfeld, keine lokale Abhängigkeit. Es ist aber mit den verwendeten Magnet-Substrat-Abständen auf alle Fälle möglich, die Kraft auf einen Vesikel um etwa zwei Größenordnungen zu verändern.

3.3 Konfokale Mikroskopie

Eine ausführliche Beschreibung von Mikroskopaufbau und Bildverarbeitungssystem findet sich bei Engelhardt & Knebel (1993) oder Dichtl (1997). Hier soll das Prinzip der konfokalen Mikroskopie nur kurz skizziert werden. Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich, wird in der konfokalen Mikroskopie eine Lochblende, die sich zwischen Objekt und Lichtquelle befindet, auf einen Punkt der Probe abgebildet. Die Fluoreszenzintensität, die von diesem Punkt ausgeht, durchläuft die gleiche optische Anordnung wie das einfallende Licht und trifft auf einen Photomultiplier. Dort, wo sich das Bild des Punktes befindet, wird eine weitere Lochblende angebracht, die Streulicht und solches Licht ausblendet, das außerhalb des Fokalfpunkts entstanden ist. Insgesamt betrachtet man mit dem konfokalen Mikroskop die quadratische Punkttransferfunktion („point-spread function“), die sich gegenüber der einfachen Transferfunktion eines gewöhnlichen Mikroskops dadurch

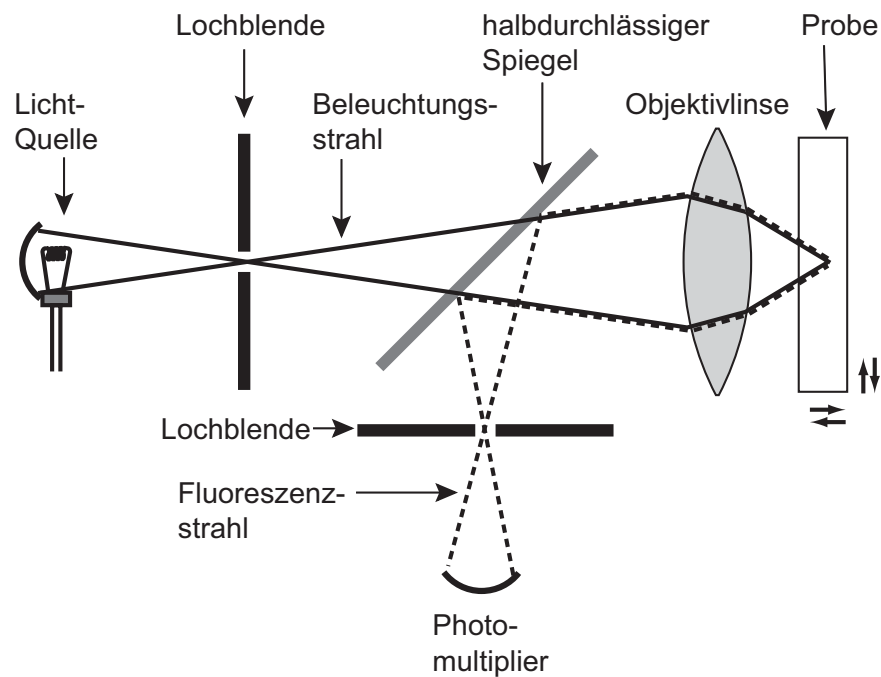


Abbildung 3.9: Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie: Eine Lochblende wird auf die Probe abgebildet. Das von der Probe ausgesandte Licht wird durch die gleiche Optik auf einen Photomultiplier abgebildet, nachdem es erneut eine Lochblende passiert hat. Streulicht, das außerhalb des Fokalfpunkts entsteht, wird so unterdrückt

auszeichnet, dass die Intensität des Airy-Scheibchens, das die Transferfunktion darstellt, wesentlich schneller abfällt und so ein Punkt kontrastreicher abgebildet werden kann. Das Ausblenden von Streulicht aus anderen Ebenen führt zu einer weiteren Kontrasterhöhung. Durch Verschieben der Probe sowohl in der $x - y$ -Ebene als auch in z -Richtung rekonstruiert man ein dreidimensionales Abbild der Fluoreszenzintensität in der Probe.

Der hier verwendete Aufbau besteht aus einer konfokalen Mikroskopeinheit (Noran, Middleton, WI, USA), die an ein invertiertes Mikroskop der Axiovert 100 Serie (Zeiss, Oberkochen) gekoppelt ist. Als Objektiv wird ein Apochromat 63x/1.4 Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Oberkochen) verwendet, die Lichtquelle besteht aus einem Krypton-Argon-Multiline Laser. Zum Durchfahren der Probe wird das Objektiv mit einem Schrittmotor bewegt. Die Speicherung und Weiterverarbeitung der Daten erfolgt mit einer Software der Firma Noran.

Kapitel 4

Betrachtung im Thermodynamischen Gleichgewicht

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit Adhäsionsphänomenen im thermodynamischen Gleichgewicht, das heißt, es werden Systeme betrachtet, deren Adhäsionszustand über einen längeren Zeitraum stabil ist.

Dazu wird zunächst auf die Beiträge zum Wechselwirkungspotential zwischen einem Vesikel und einer Oberfläche eingegangen, die ohne spezifische Rezeptor-Ligand-Bindungen auftreten. Das resultierende Gesamtpotential wird diskutiert und um den Beitrag der spezifischen Wechselwirkung erweitert. In einem nächsten Schritt werden die am besten zugänglichen Modelle zur Datenauswertung vorgestellt und zu einer neuen Auswerterroutine verknüpft.

Im experimentellen Abschnitt wird ein Phasendiagramm der Adhäsionsstärke in Abhängigkeit von Rezeptor-, Ligand- und Repellerkonzentration entwickelt und diskutiert.

4.1 Theoretische Grundlagen

Mit der theoretischen Beschreibung der Adhäsion von Vesikeln als Modellzellen haben sich in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Gruppen theoretischer Physiker beschäftigt. Es entstanden mehrere Modellansätze, die jeweils unterschiedliche Schwerpunkte in der Berücksichtigung der Beiträge zum Gesamtpotential setzen. So geht Bell (1978) in seinem ersten lokalen Modell der Zelladhäsion zunächst nur von direkter Wechselwirkung zwischen Schlüssel-Schloss-Paaren aus, er erweitert dieses Modell später um den Beitrag unspezifischer Abstoßung zwischen den Zellen (Bell et al. 1984, Torney et al. 1986). Dabei wird jeweils die Anzahl der entstehenden Bindungen als Messparameter angegeben, d.h., es wird betrachtet, unter welchen Gegebenheiten sich wie viele Schlüssel-Schloss-

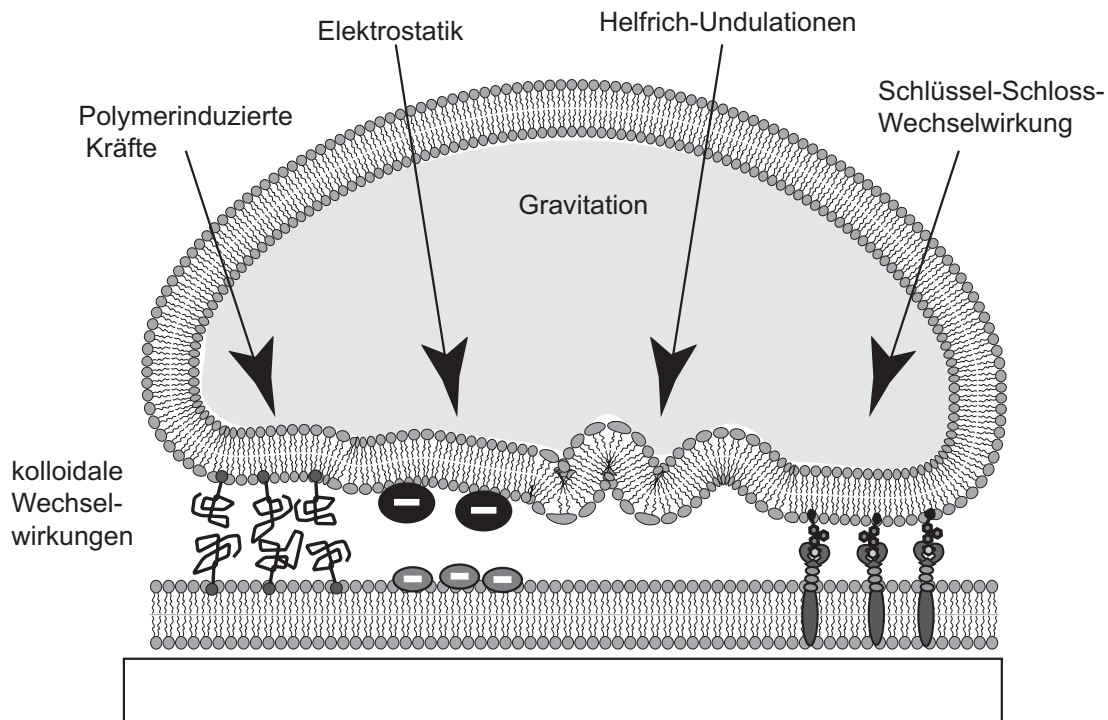


Abbildung 4.1: Die verschiedenen Beiträge zum Wechselwirkungspotential zwischen einer (Modell-)Zelle und einer Oberfläche überlagern sich zu einem komplexen Gesamtpotential.

Bindungen in der vorgegebenen Kontaktzone bilden. Einen anderen, globalen Ansatz wählten Seifert & Lipowsky (1990) in ihrem Modell, das die gesamte Form eines Vesikels in einem Wandpotential theoretisch modelliert. Da die globale Form mit Mitteln der Lichtmikroskopie kaum zugänglich ist, haben Bruinsma (Bruinsma 1995, Bruinsma et al. 2000) und Guttenberg et al. (2001) das Modell auf seine Randbedingungen reduziert und betrachten insbesondere den Kontaktwinkel zum Substrat und die Größe der Adhäsionsfläche als Messparameter. Dies ist möglich unter der Voraussetzung, dass die freie Energie der Adhäsion durch die elastischen Randbedingungen, also die große Krümmung der Membran an der Kontaktlinie, dominiert wird. Da das Gesamtpotential für die Adhäsion von sehr vielen Beiträgen abhängt und deshalb eine komplizierte Struktur aufweist (vgl. Abbildung 4.1), sollen hier zunächst die Einzelbeiträge kurz diskutiert werden.

4.1.1 Wechselwirkungspotential der unspezifischen Adhäsion

Zur unspezifischen Adhäsion tragen kolloidale Kräfte, entropische Wechselwirkungen und die Gravitation bei.

Kolloidale Wechselwirkung

Als kolloidale Wechselwirkung bezeichnet man die Art von Kräften, die grundsätzlich dann entstehen, wenn sich zwei Oberflächen aneinander annähern. Da die in dieser Arbeit diskutierten Abläufe immer unter Wasser stattfinden, wird auch die Hydratationskraft zu dieser Kategorie von Wechselwirkungen gezählt (vgl. zu diesem Abschnitt Israelachvili 1991, Rädler 1993).

Van der Waals Wechselwirkung

Das van der Waals-Potential beschreibt die Wechselwirkung zwischen Dipolen. Dabei tragen sowohl permanente, als auch induzierte Dipolmomente von Molekülen zur van der Waals-Kraft bei, wobei beide Beiträge eine Abstandsabhängigkeit von r^{-6} für zwei Einzelmoleküle zeigen. Die van der Waals-Wechselwirkung ist in der Regel anziehend und kurzreichweitig. Betrachtet man eine unendlich ausgedehnte Ebene, über der sich im Abstand h eine Membran der Dicke d befindet, so hat das van der Waals-Potential folgende Form:

$$V_{vdW}(h) = -\frac{A_H}{12\pi h^2} \quad (4.1)$$

Die in die Gleichung eingehende Hamaker-Konstante A_H ist abhängig von den Brechungsindizes der betrachteten Moleküle, kann aber wegen des großen Dipolmoments der Wassermoleküle in wässrigen Lösungen mit

$$A_H \approx \frac{3}{4}k_B T \quad (4.2)$$

abgeschätzt werden (Rädler 1993).

Aus dem van der Waals-Potential ergibt sich durch Gradientenbildung die van der Waals-Kraft

$$f_{vdW}(h) = -\frac{A_H}{6\pi} \left(\frac{1}{h^3} - \frac{1}{(h+d)^3} \right) \quad (4.3)$$

Befinden sich Ionen in der Lösung, wird die van der Waals-Kraft analog zur elektrostatischen Abschirmung zusätzlich abgeschwächt. In dem hier betrachteten System beträgt die Abschirmlänge der van der Waals-Kraft in etwa 0,5nm, das heisst, in 1nm Entfernung von der Oberfläche ist die Anziehungskraft auf ein Zehntel des Maximalwerts abgefallen.

Elektrostatik

In dem untersuchten System befinden sich zahlreiche Ladungsträger, die sowohl an Oberflächen gebunden sind, als auch in der elektrolytischen Pufferlösung als gelöste Salze vorliegen. Die Konzentration des verwendeten Elektrolyten liegt dabei bei über 0,1M, was zu einer Debye-Abschirmlänge von unter 1nm führt. Die elektrostatische Wechselwirkung kann also vernachlässigt werden; die einzige

Ausnahme bildet die spezifische Adhäsion, bei der Kalzium in der Bindungstasche des Adhäsionsproteins E-Selektin eine entscheidende Rolle für die Bindung des Glykolipids Sialyl-Lewis^X spielt (vgl. hierzu auch 2.1.1).

Hydratation

Die Hydratationskraft ist eine abstoßende, sehr kurzreichweitige Kraft, die zwischen zwei Oberflächen auftritt. Ihr Ursprung liegt in der starken Dipolstruktur des Wassers, das sich an hydrophile Strukturen anlagert und bei sehr geringem Abstand zwischen zwei Oberflächen verdrängt wird oder sich umorientieren muss. Hydrophobe Oberflächen, an die sich Wassermoleküle nicht anlagern können, werden aus dem Wasser verdrängt (hydrophober Effekt). Die Reichweite der Hydratationskraft beträgt wenige Moleküllagen, also in etwa 1nm. Da sich im hier betrachteten System die beiden Oberflächen durch eingelagerte Proteine und Polymere nicht bis auf diesen Abstand annähern können, ist der Einfluss der Hydratation zu vernachlässigen.

Entropische Beiträge

Eine zweite Gruppe von Beiträgen zum Gesamtpotential bilden die entropischen Wechselwirkungen. Dabei handelt es sich um durch Fluktuationen der Membran hervorgerufene, repulsive Kräfte (Helfrich-Abstoßung) und um abstoßende Wechselwirkungen, die durch Polymere in der Membran erzeugt werden.

Helfrich-Abstoßung

Fluide Membranen zeigen Fluktuationen um ihre Gleichgewichtsebene, die von der Membranspannung und der Biegesteifigkeit abhängen (Rädler et al. 1995a, Häckl et al. 1997). Für eine freie Membran der Fläche A lassen sich nach Helfrich & Servuss (1984) die Membranfluktuationen in einzelne Moden zerlegen. Durch die Berechnung der Biege-Energie (Biegemodul κ) einer einzelnen Mode, unter Berücksichtigung der durch die Fluktuation hervorgerufenen Membranspannung σ und durch die Anwendung des Äquipartitionstheorems (Deformationsenergie pro Mode = $1/2k_B T$), lässt sich die mittlere quadratische Amplitude $\langle |u_q|^2 \rangle$ einer Schwingungsmode angeben.

$$\langle |u_q|^2 \rangle = \frac{k_B T}{A(\kappa q^4 - \sigma q^2)} \quad (4.4)$$

Integration über q in physikalisch sinnvollen Grenzen ($q_{min} = \pi/\sqrt{A}$, $q_{max} = \pi/a$ mit a = Molekülabstand) führt zu einer mittleren quadratischen Amplitude $\langle u_q^2 \rangle$ des Gesamtsystems

$$\langle u_q^2 \rangle = \frac{k_B T}{4\pi\kappa} \frac{A}{\pi^2} \quad \text{für } \sigma = 0 \quad (4.5)$$

$$\langle u_q^2 \rangle = \frac{k_B T}{4\pi\sigma} \ln\left(1 + \frac{\sigma}{\kappa q_{min}^2}\right) \quad \text{für } \sigma \neq 0 \quad (4.6)$$

Sperrt man eine Membran zwischen zwei starre Platten, so erzeugen diese Undulationen eine repulsive Kraft, da die Amplituden durch den Abstand $2d$ beider Platten begrenzt werden. Der Druck, bzw. die repulsive Wechselwirkung, die daraus entsteht, soll im folgenden abgeschätzt werden:

Die Restriktion der Undulationen auf eine Amplitude $\pm d$ führt zu einer mittleren quadratischen Amplitude $\langle u_q^2 \rangle$

$$\langle u_q^2 \rangle = \frac{d^2}{6} \quad (4.7)$$

Einsetzen von Gleichung (4.7) in Gleichung (4.5) definiert eine charakteristische, vom Abstand der beiden Membranen abhängige Fläche A_{sq} . Flächenstücke der Größe A_{sq} können unabhängig voneinander betrachtet werden, da ihre Schwingungen voneinander entkoppelt sind.

$$A_{sq} = \frac{2\pi^3}{3} \frac{\kappa d^2}{k_B T} \quad (4.8)$$

Jedes dieser Membranstücke wird als ein Teilchen eines idealen Gases betrachtet und übt deshalb einen Druck $P = kT/2dA_{sq}$ auf jede der Platten aus. Insgesamt ergibt sich für den Druck und – durch Integration über den Abstand der Membranen d , für das Wechselwirkungspotential pro Fläche

$$P = \frac{3}{4\pi^3} \frac{(k_B T)^2}{\kappa d^3} \quad (4.9)$$

$$\frac{V_{st}}{A} = \frac{3}{8\pi^3} \frac{(k_B T)^2}{\kappa d^2} \approx \frac{(k_B T)^2}{\kappa d^2} \quad (4.10)$$

Die grobe Abschätzung der Vorfaktoren des Potentials in Gleichung (4.10) ist ein Resultat der oben abgeschätzten Dichte der unabhängigen Membranabschnitte.

Polymerinduzierte Abstoßung

Der Beitrag zum Wechselwirkungspotential durch Polymere mit einem Gyrationradius R_G und einer lateralen Ausdehnung Ω , die in die Membran eingebaut sind, wird z.B. bei Bruinsma et al. (2000) diskutiert. Dabei wird von einem konstanten chemischen Potential der Repellermoleküle ausgegangen, das durch deren Konzentration σ_0 weit weg von der Adhäsionsfläche bestimmt wird. In der Adhäsionsfläche liegen die Repeller in einer geringeren Konzentration $\sigma(h)$ vor und werden zusätzlich vertikal komprimiert. Es gilt:

$$k_B T \ln \Omega \sigma_0 = k_B T \ln \Omega \sigma(h) + \frac{\pi^2}{6} k_B T \left(\frac{R_G}{h}\right)^2 \exp\{-1,5 (h/R_G)^2\} \quad (4.11)$$

Aus Gleichung (4.11) wird deutlich, dass die Polymerdichte vom Abstand der Membran vom Substrat abhängt und bei sehr geringem Abstand $h \ll R_G$ stark abnimmt. Durch Multiplikation mit der Anzahl der Polymere ergibt sich die freie Energie $G(\sigma)$ und aus der Differenz $G(\sigma(h)) - G(\sigma_0)$ das repulsive Potential V_{rep} :

$$V_{rep} = k_B T \sigma_0 \left[1 - \exp \left\{ -\frac{\pi^2}{6} \left(\frac{R_G}{h} \right)^2 \exp \left\{ -1,5 (h/R_G)^2 \right\} \right\} \right] \quad (4.12)$$

Im Grenzfall für $h \ll R_G$ ergibt sich der zweidimensionale osmotische Druck $\Pi = k_B T \sigma_0$, im Grenzfall $h \gg R_G$ ein Verhalten wie für konstante Repellerkonzentration.

Gravitation

Die Gravitation f_G kann für die hier vorgestellten Experimente als einfach kontrollierbare Größe eingestellt werden. Sie wird bestimmt durch den Dichteunterschied $\Delta\rho$ der Medien innerhalb und außerhalb der geschlossenen Vesikelmembran (Volumen V_{Ves}).

$$f_G = \Delta\rho g V_{Ves} \quad (4.13)$$

Mit den verwendeten Medien Sucroslösung und S1-Hepespuffer liegt der Dichteunterschied $\Delta\rho$ bei $50\mu\text{g}/\text{mm}^3$.

Gesamtpotential der unspezifischen Adhäsion

Das Gesamtpotential der nicht-spezifischen Adhäsion wie es durch Superposition der Beiträge Gravitation und kolloidale Wechselwirkungen entsteht, besitzt eine Doppelminimum-Struktur (vgl. Abbildung 4.2). Das erste, nahe der Oberfläche liegende Minimum ist sehr eng und durch einen Potentialwall vom zweiten, weiter entfernten Minimum, das sehr flach ist, getrennt. Welches der beiden Minima das globale Minimum ist und wie steil der Potentialverlauf ist, hängt von den thermodynamischen Kontrollgrößen, u.a. den Helfrich-Undulationen und der Polymerabstoßung ab (Bruinsma et al. 2000).

Der Phasenübergang zwischen den beiden Minima wird von Lipowsky & Leibler (1986) in einer Renormalisierungsgruppentheorie als Übergang zweiter Ordnung vorhergesagt. Eine einfache Superposition der einzelnen Beiträge liefert jedoch einen Übergang erster Ordnung. Dieser Widerspruch wurde von Milner & Roux (1992) aufgegriffen; sie entwickelten ein Potential, bei dem die kurzreichweitige Wechselwirkung harter Schalen als Virial zur Helfrich-Wechselwirkung addiert wird. Dieser Ansatz liefert einen Übergang zweiter Ordnung.

4.1.2 Zusätzliches Potential der spezifischen Adhäsion

Der nicht-spezifischen Adhäsion wird in der vorliegenden Arbeit ein spezifisches Wechselwirkungspotential überlagert. Die durch die Schlüssel-Schloss-

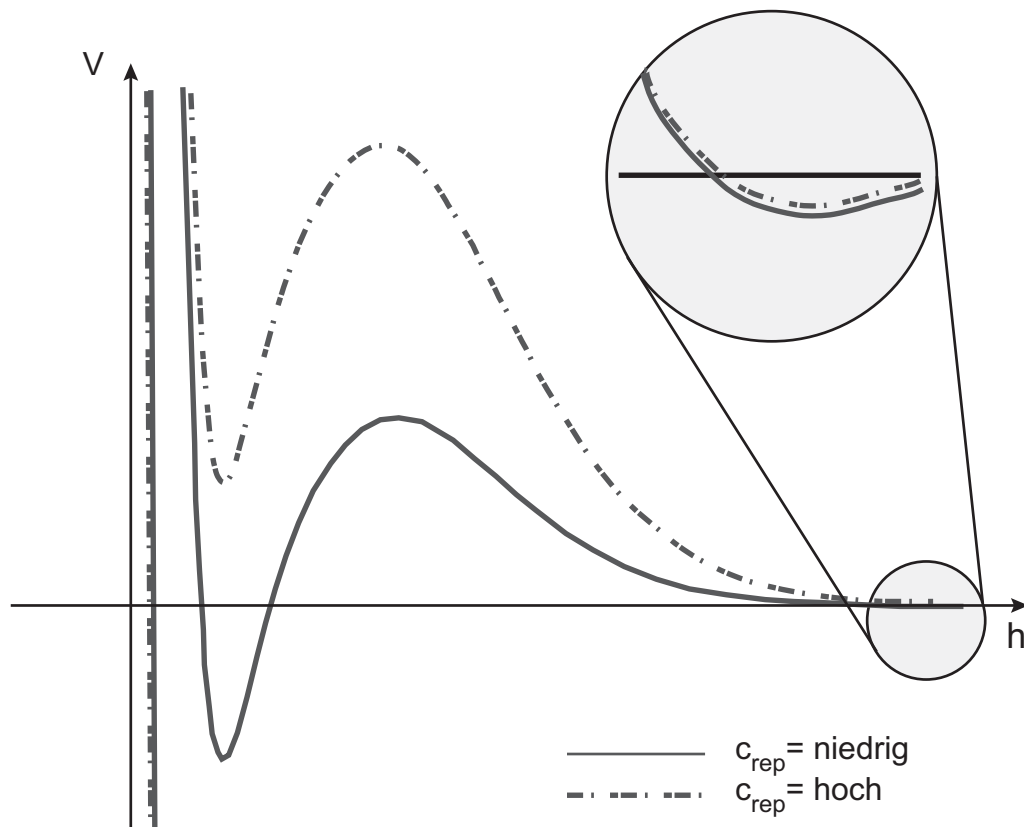


Abbildung 4.2: Gesamtpotential der nicht-spezifischen Adhäsion, wie es durch Superposition von Gravitation und kolloidalen Beiträgen entsteht (nach Bruinsma et al. 2000).

Wechselwirkung vermittelte zusätzliche lokale Wechselwirkung hat weitreichende Konsequenzen für das ganze System. Zum einen muss die Membran verformt werden, um spezifische Bindungen eingehen zu können, es entsteht dadurch eine Randspannung um die Adhäsionsfläche. Außerdem werden Repellermoleküle aus der Adhäsionsfläche verdrängt und bauen so einen lateralen osmotischen Druck auf, der der Adhäsion entgegenwirkt.

Spezifische Schlüssel-Schloss-Wechselwirkung

Die spezifische Wechselwirkung von Makromolekülen setzt sich zusammen aus vielen schwachen, kurzreichweitigen Wechselwirkungen, die durch die hochkomplexe Struktur der Bindungspartner eine stabile Bindung aufbauen (Alberts et al. 2002). Dieses Konzept der Bindung stellt sicher, dass Bindungen, die gebildet werden, auch wieder lösbar sind (im Gegensatz zur kovalenten Bindung) und garantiert außerdem eine hohe Spezifität, da Bindungen nur dann stabil gegen thermische Fluktuationen sind, wenn die sterischen Konformationen der Bin-

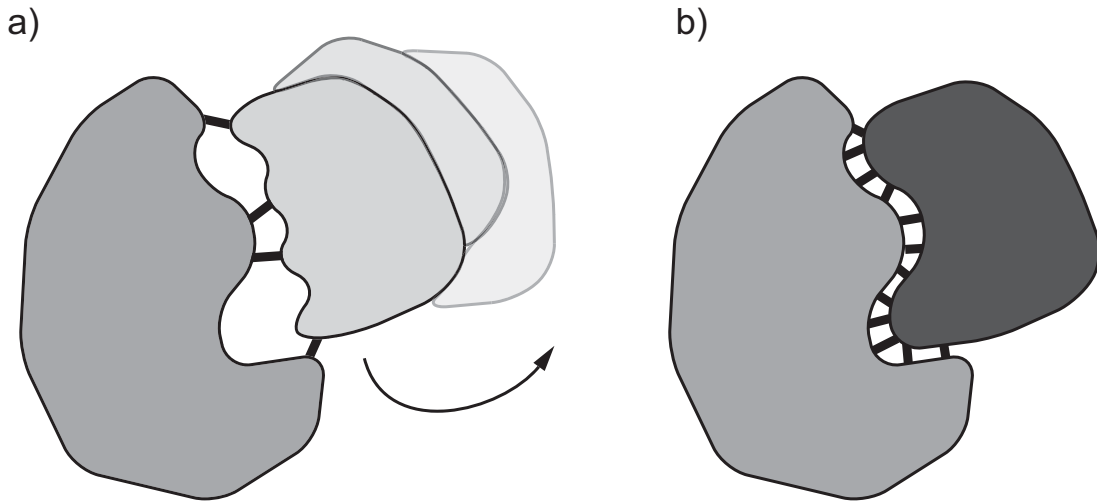


Abbildung 4.3: Eine stabile spezifische Bindung kann nur dann zustande kommen, wenn die Bindungspartner sterisch so gut zusammenpassen, dass sie schwache Wechselwirkungen an ausreichend vielen Stellen aufbauen können: a) ungeeignete sterische Konformation führt zu einer thermisch instabilen Bindung; b) stabile Konformation.

Bindungspartner ausreichend gut aufeinander abgestimmt sind (vgl. Abbildung 4.3). Die beteiligten Wechselwirkungen (10–20 pro spezifischer Bindung) sind u.a. die ionische Bindung mit einer Reichweite von 0,25nm in physiologischer Umgebung und einer Bindungsenthalpie von ca. $4k_B T$, die Bildung von Wasserstoff-Brücken (0,3nm; $1 - 2k_B T$), van der Waals-Wechselwirkung (0,35nm; $0,2k_B T$) und hydrophober Effekt (1nm; ca. $4k_B T$) (vgl. zu diesen Beiträgen auch Nguyen-Duong (2002)).

Biegung und Dehnung der Membran bei der Adhäsion

Um eine Adhäsionsfläche bilden zu können, muss sich die Membran in der Kontaktzone abflachen. Dabei wird sie sowohl gebogen, als auch gedehnt. Der Beitrag zum Gesamtpotential kann lokal in der Nähe der Kontaktfläche ermittelt werden (Verbiegen einer dünnen Platte, (vgl. Landau & Lifschitz 1989)) und liefert dann einen Beitrag F_{BD} zur freien Energie (Bruinsma 1995):

$$\Delta F_{BD} = \gamma \Delta A + \iint_{\text{Oberfl.}} d^2 s \left(\frac{1}{2} \lambda \epsilon_{ii}^2 + \mu \epsilon_{ij}^2 \right) + \frac{1}{2} \kappa \iint_{\text{Oberfl.}} d^2 s \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 \quad (4.14)$$

Dabei beschreiben die ersten beiden Terme den Energiebeitrag der Dehnung und Scherung der Membran.

$$\epsilon_{ij} = \frac{1}{2} (\partial_i u_j + \partial_j u_i) + \frac{1}{2} \partial_i h \partial_j h \quad (4.15)$$

ΔA ist die Flächenänderung im Vergleich zum freien Zustand und ϵ_{ij} ist der Verzerrungstensor der Membran, der sich zusammensetzt aus einem Anteil in der Membranebene (erster Term in Gleichung (4.15)) und einem Anteil senkrecht zur Membranebene (zweiter Term in Gleichung (4.15)). Die beiden Konstanten λ und μ heissen Lamé-Konstanten, wobei μ der Schermodul ist und $E = \lambda + \mu$ der Elastizitätsmodul. Der dritte Term in Gleichung (4.14) heisst Helfrich-Biege-Energie und beschreibt die Biegung einer Oberfläche mit den Hauptkrümmungsradien R_1 und R_2 .

Einen anderen, globalen Ansatz für den Beitrag zur freien Energie durch Biegen und Dehnen der Membran liefert die Theorie von Seifert & Lipowsky (1990). Dort ergibt sich

$$F_{\text{BD}} = \frac{\kappa}{2} \oint dA (C_1 + C_2 - C_0)^2 + \Sigma \oint dA \quad (4.16)$$

Dabei ist κ der Biegemodul, C_1 und C_2 sind die Hauptkrümmungen ($C_i = 1/R_i$ mit einem Krümmungsradius R_i), C_0 ist die spontane Krümmung, die durch Membraneigenschaften entstehen kann und Σ ist mit der lateralen Spannung verknüpft.

Je nach Art des betrachteten Problems kann es ausreichend sein, die lokalen Bedingungen aus der Landau-Theorie, wie sie z.B. bei Bruinsma verwendet werden, anzuwenden, oder die globale Theorie von Seifert und Lipowsky zu betrachten.

Einfluss des lateralen osmotischen Drucks auf die Adhäsion

Betrachtet man einen nicht-adhären Vesikel, so sind alle in die Membran eingebauten Rezeptor- und Repellermoleküle über die gesamte Oberfläche verteilt (vgl. Abbildung 4.4a). Durch die Adhäsion werden die Repellermoleküle nun aus der Kontaktfläche verdrängt und ein Konzentrationsgradient in der Membran bildet sich. Damit entsteht ein Gradient des chemischen Potentials $\mu = k_B T \ln c$ an der Oberfläche (vgl. Abbildung 4.4b). Das System ist bestrebt, diese Differenz der chemischen Potentiale auszugleichen, indem ein lateraler osmotischer Druck in Richtung der Kontaktfläche ausgebildet wird. Diese Tendenz wirkt der Bildung bzw. einer Vergrößerung der Kontaktfläche entgegen.

Analog dazu reichern sich die Rezeptormoleküle in der Adhäsionsfläche an und ein lateraler osmotischer Druck bewegt die Moleküle aus der Kontaktfläche. Auch diese Tendenz verringert die Adhäsionsstärke des Vesikels. Insgesamt wird die Adhäsionsenergie W_{adh} um die chemischen Potentiale μ_i der gebundenen Rezeptoren ($g\text{Rez}$) und der aus der Kontaktfläche verdrängten Repeller ($v\text{Rep}$) erniedrigt (Guttenberg et al. 2001). Damit ergibt sich für die Gibbsche freie Energie ΔG_{adh} :

$$\Delta G_{\text{adh}} = W_{\text{adh}} - \mu_{v\text{Rep}} N_{v\text{Rep}} - \mu_{g\text{Rez}} N_{g\text{Rez}} \quad (4.17)$$

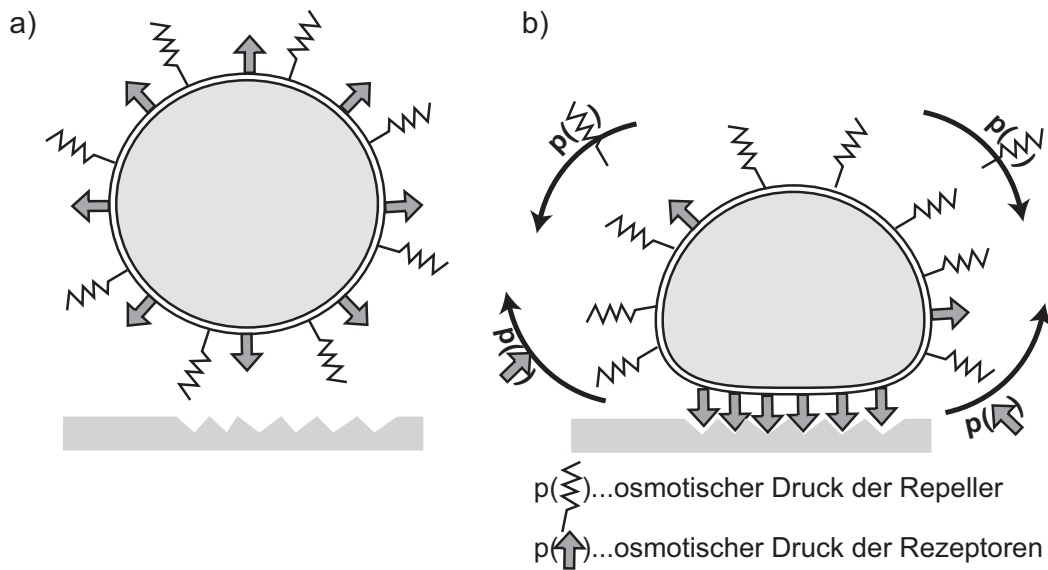


Abbildung 4.4: Aufbau eines lateralen osmotischen Drucks durch die Umverteilung der Repeller- und Rezeptormoleküle bei der Adhäsion: a) freier Vesikel mit gleichverteilten Molekülen. b) Repeller werden aus der Kontaktfläche verdrängt, Rezeptoren lagern sich dort an; es bilden sich Konzentrationsgradienten.

Gesamtpotential der spezifischen Adhäsion

Das Potential der spezifischen Wechselwirkung kann als harmonisch approximiert werden. Dazu wird es parabolisch um den Gleichgewichtsbindungsabstand der Bindung h_{GG} entwickelt (vgl. z.B. Bruinsma et al. 2000).

$$V(h) = V_0 + \frac{V''}{2}(h - h_{GG})^2 \quad (4.18)$$

Das Potential der nicht-spezifischen Adhäsion überlagert sich mit dem der spezifischen Wechselwirkung zu einem Gesamtpotential, wobei die spezifische Wechselwirkung das Minimum, das näher am Substrat liegt, soweit vertiefen kann, dass dort das globale Minimum zu finden ist.

4.1.3 Anwendung der lokalen Theorie zur Datenauswertung

Die für die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Messdaten am besten zugängliche lokale Theorie zur Datenauswertung ist die von Bruinsma (1995) entwickelte Konturanalyse, die auf den elastischen Randbedingungen der Vesikeladhäsion basiert. Dort wird ein quasisphärischer Vesikel, dessen Radius durch die Adhäsion auf den Wert R' anwächst, betrachtet. Durch die Abflachung des Vesikels während

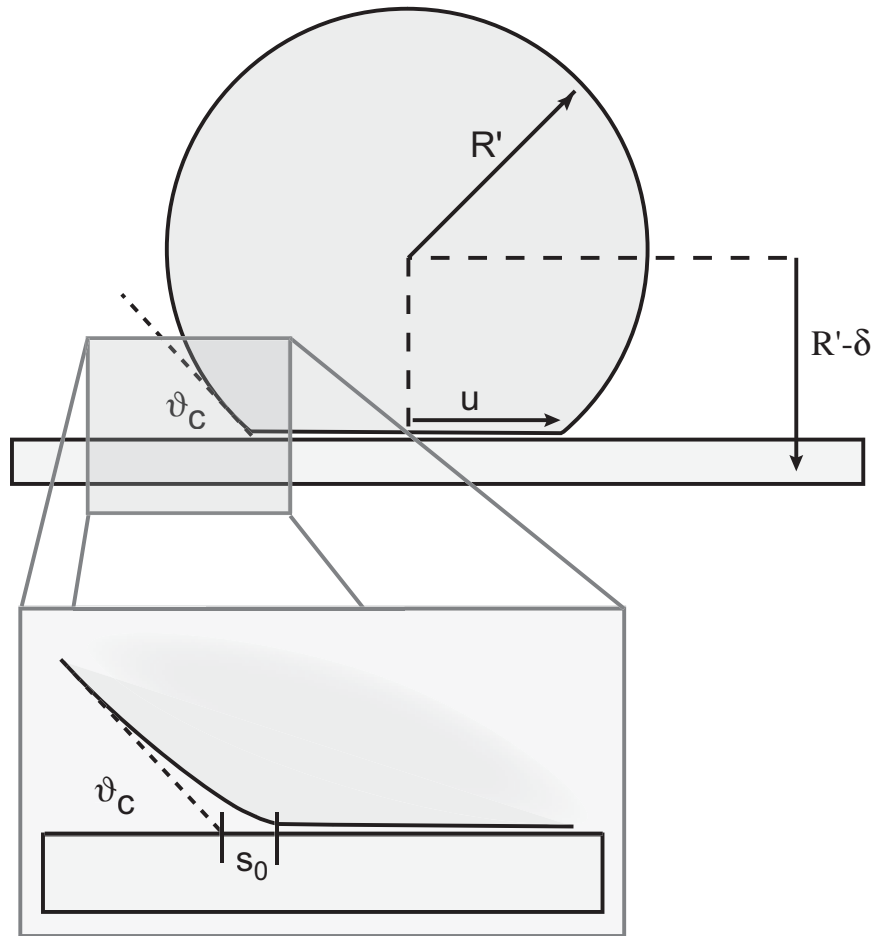


Abbildung 4.5: Im Bruinsma-Modell wird die Kontur des Vesikels in der Nähe des Kontaktpunkts analysiert. Durch Anpassen einer Geraden werden der makroskopische Kontaktwinkel ϑ_C und die Spannung des Vesikels bestimmt.

der Adhäsion (vgl. Abbildung 4.5) senkt sich dessen Schwerpunkt ab. Die betrachtete Wechselwirkung zwischen Vesikel und Oberfläche ist dabei so schwach, dass diese Absenkung des Schwerpunkts δ klein ist gegen den Radius. Außerdem wird angenommen, dass die Adhäsion durch kurzreichweitige Kräfte vermittelt wird und deshalb die Membrankontur $h(s)$ weit weg vom Kontaktpunkt durch eine Gerade angenähert werden kann (vgl. Abbildung 4.5). s ist dabei die Bogenlänge der Vesikelkontur gemessen vom Kontaktpunkt aus. In der Kontaktfläche selbst gilt $h(s) = 0$. Da weiche Schalen mit Biegeenergie ungleich Null keine Kanten ausbilden können, es also keine Unstetigkeiten in der Steigung der Kontur geben kann, muss der Übergang in die Kontaktfläche unter einem mikroskopischen Kontaktwinkel Null erfolgen. Dieses Verhalten erfordert die Existenz einer Übergangsregion der Breite s_0 zwischen der Kontaktfläche und dem linearen Verlauf

der Kontur.

Im dem hier diskutierten Fall kurzreichweitiger Wechselwirkungen lässt sich die freie Energie harmonisch nähern.

$$\Delta F \approx 2\pi u \left[\int_{-\infty}^{s_0} ds \left\{ \frac{1}{2} \kappa \left(\frac{d^2 h}{ds^2} \right)^2 + \frac{1}{2} \gamma \left(\frac{dh}{ds} \right)^2 \right\} - \int_{s_0}^{\infty} G \right] \quad (4.19)$$

u ist dabei der Radius der Adhäsionsfläche, κ das Biegemodul, γ die Membranspannung und G die freie Energie der Adhäsion. Um das Höhenprofil eines adhärennten Vesikels im thermodynamischen Gleichgewicht zu erhalten, wird Gleichung (4.19) minimiert.

$$\gamma \frac{d^2 h}{ds^2} - \kappa \frac{d^4 h}{ds^4} = 0$$

Die charakteristische Länge dieser Gleichung ist $\lambda = \sqrt{\kappa/\gamma}$.

$$\begin{aligned} h(s) &= -\vartheta_c s + \vartheta_c \lambda \exp\left(\frac{s-\lambda}{\lambda}\right) & s < \lambda \\ h(s) &= 0 & s > \lambda \end{aligned} \quad (4.20)$$

Diese Lösung impliziert, dass die Kapillarlänge λ ungefähr s_0 und damit die Breite der Übergangsregion ist.

Experimentell wird der makroskopische Kontaktwinkel ϑ_c durch Anpassung einer Geraden an das Höhenprofil möglichst weit weg vom Kontaktpunkt bestimmt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Substratebene legt λ fest und damit bei bekannter Biegesteifigkeit κ die Spannung γ . Für eine äquimolare Mischung von DMPC und Cholesterol ist die Biegesteifigkeit $\kappa = 100k_B T$.

Physikalisch bedeutet die Adhäsion eines Vesikels im Gleichgewichtszustand, dass sich alle Biegemomente und Spannung an der Kontaktlinie aufheben und damit sowohl die Gleichung für die Biegemomente

$$W_{\text{adh}} = \frac{\kappa}{2} \frac{\partial^2 h}{\partial s^2} \quad (4.21)$$

auch die Young-Gleichung

$$W_{\text{adh}} = \gamma(1 - \cos \vartheta_c) \quad (4.22)$$

erfüllt ist. Diese beiden Gleichungen sind über die Kapillarlänge λ verknüpft. λ trennt dabei den Bereich, der durch die Spannung dominiert wird, von dem Teil der Membran, in dem die Biegeenergie den hauptsächlichen Beitrag zur freien Energie liefert. Da mit den Mitteln der Interferenzmikroskopie der makroskopische Kontaktwinkel experimentell leichter zugänglich ist als die Krümmung am Kontaktpunkt, wird in dieser Arbeit die Adhäsionsstärke über die Young-Gleichung bestimmt.

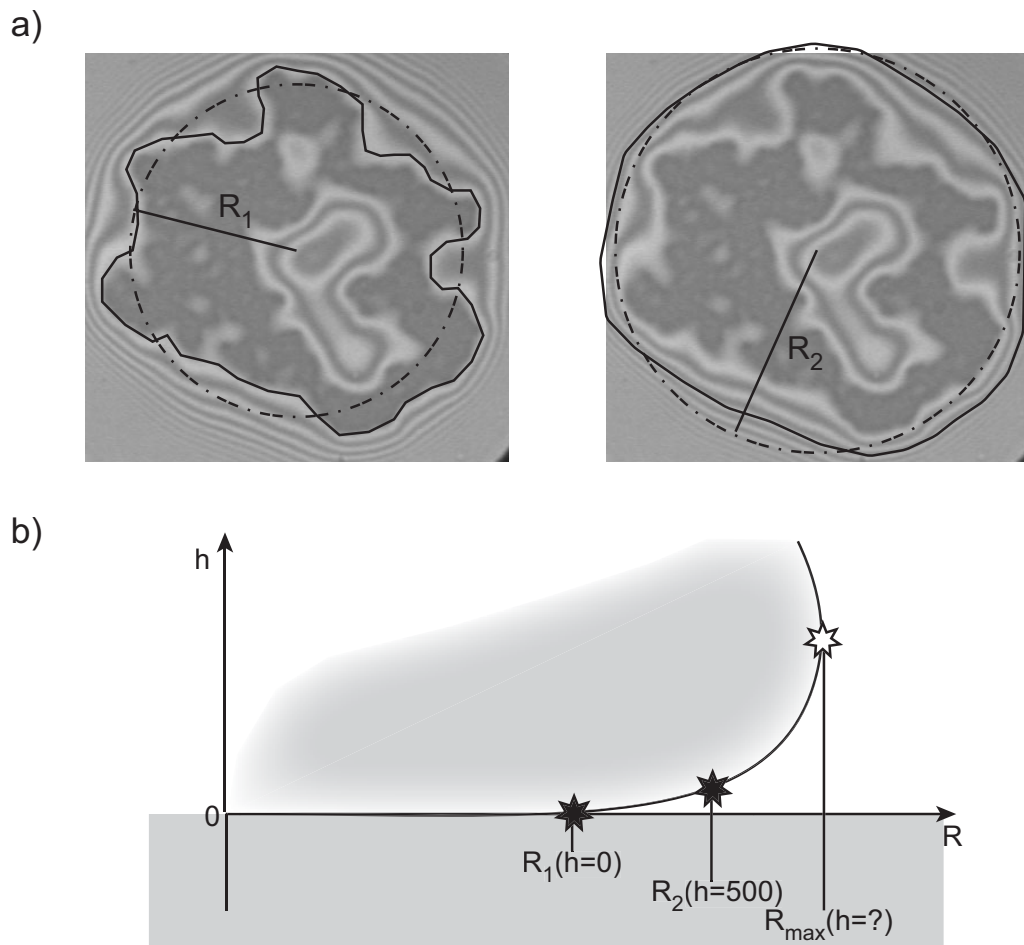


Abbildung 4.6: Anpassung der RIKM-Daten an das dreidimensionale Modell adhärerter Vesikel. a) Der Adhäsionsfläche und der 500nm-Höhenlinie werden Kreise gleicher Fläche mit Radien R_1 und R_2 zugeordnet (gestrichelte Linien). b) Die Punkte, die durch ausgefüllte Sterne gekennzeichnet sind, sind durch diese Konstruktion vollständig bestimmt. Von dem zu R_{max} gehörenden Punkt fehlt die Höheninformation. Durch Vergleich dieser Punkte mit den aus dem theoretischen Modell resultierenden Konturen kann einem Vesikel eindeutig ein reduziertes Volumen und eine Adhäsionsstärke zugeordnet werden.

4.1.4 Anwendung der globalen Theorie zur Datenauswertung

Ein auf die Arbeiten von Seifert & Lipowsky (1990) basierendes Modell zur Beschreibung der globalen Form von Vesikeln, das von Ana Smith et al. (2003) am Lehrstuhl entwickelt wurde, wird ebenfalls zur Auswertung genutzt. Eine Beschreibung des Modells findet sich in Kapitel 6, hier soll geschildert werden, wie die Interferenzdaten des RIKMs mit den dreidimensionalen Konturen verknüpft

werden. Dazu werden, wie in Abbildung 4.6a skizziert, die Adhäsionsfläche und die 500nm-Höhenlinie eines adhärennten Vesikels durch Kreise gleicher Fläche angenähert und deren Radien R_1 und R_2 berechnet. Der Gesamtradius des Vesikels wird durch Hellfeldmikroskopie gesondert bestimmt.

Die aus dem theoretischen Modell ermittelten Trajektorien der Vesikelform für verschiedene Werte des reduzierten Volumens v und der Wechselwirkungsstärke w werden mit den experimentell erhaltenen Datenpunkten verglichen und diejenige Kurve wird ausgewählt, die der experimentellen Form am besten entspricht. Dabei wird dem Umstand, dass im Modell die Gravitation vernachlässigt wird, insoweit Rechnung getragen, als im Zweifelsfall die Kurve ausgewählt wird, die oberhalb der gemessenen Werte liegt, also weniger abgeflacht ist. Auf diese Weise wird jedem Vesikel ein reduziertes Volumen und eine Wechselwirkungsstärke zugeordnet.

Das reduzierte Volumen v eines Vesikels beschreibt dabei das Verhältnis des tatsächlichen Volumens des Vesikels zu einer idealen Kugel gleicher Oberfläche. Das reduzierte Volumen ist damit ein Maß für die Abflachung eines Vesikels. Dabei gilt: je kleiner das reduzierte Volumen ist, desto weniger kugelförmig ist ein Vesikel und desto mehr Fläche steht ihm zur Adhäsion zur Verfügung (Sackmann 1994). Diese zusätzliche Fläche wird im folgenden auch als Überschussfläche bezeichnet.

Da für die theoretische Beschreibung ein einfaches Kontaktpotential für die Wechselwirkung mit dem Substrat gewählt wurde, können die so erhaltenen Werte für w nur als grobe Anhaltspunkte dienen, die Werte für v werden zur Auswertung verwendet.

4.1.5 Verbindung beider Theorien

Für die Datenauswertung wird eine Verknüpfung der beiden zuvor beschriebenen Ansätze gewählt. Die Bestimmung der Adhäsionsstärke erfolgt über den makroskopischen Kontaktwinkel aus der Bruinsma-Theorie und die Anwendung der Young-Gleichung. Gleichzeitig wird durch eine Analyse der globalen Form des Vesikels durch das Modell von Smith das reduzierte Volumen bestimmt.

Diese Verbindung ist notwendig, da in der lokalen Theorie von Bruinsma das reduzierte Volumen und damit auch die Überschussfläche eines Vesikels nicht als Parameter eingeht. Deshalb ist die Bestimmung der Spannung über die Kapillarlänge problematisch, da unterschiedliche reduzierte Volumina nicht zu den gleichen Spannungswerten und damit zu unterschiedlichen Adhäsionsstärken führen. Mit der zusätzlichen Bestimmung des reduzierten Volumens kann sichergestellt werden, dass Wechselwirkungsstärken nur für Vesikel mit gleichem reduziertem Volumen verglichen werden, bzw., dass das reduzierte Volumen in alle Betrachtungen miteinbezogen wird.

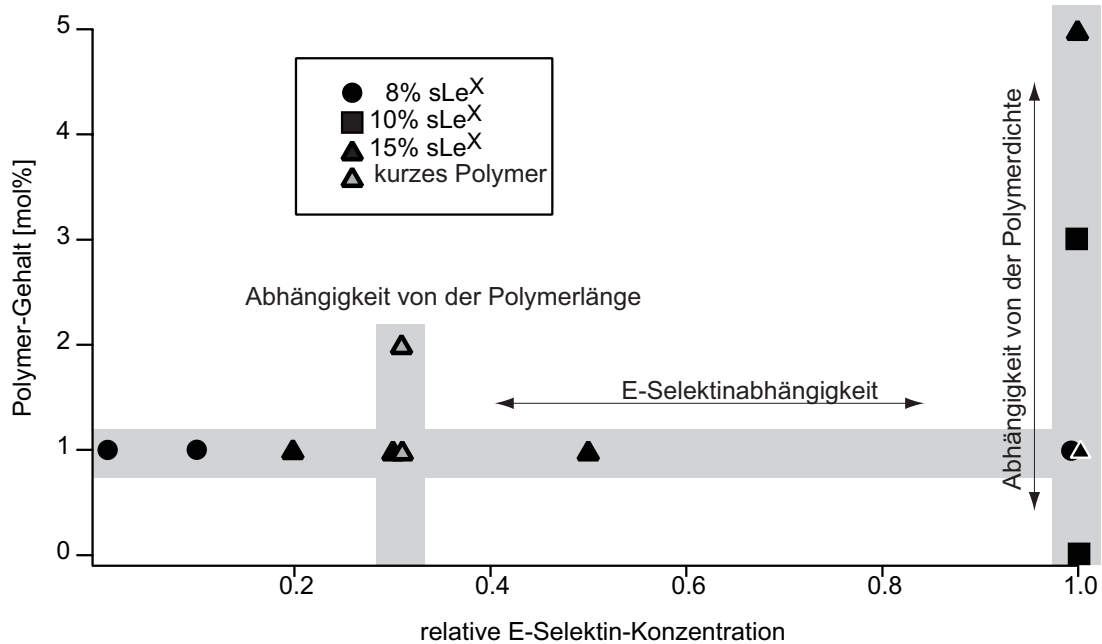


Abbildung 4.7: Veranschaulichung der Parameter, die zur Erstellung eines Phasendiagramms variiert werden. Es werden sowohl die Repeller-, als auch die Rezeptor- und Ligandkonzentrationen verändert. Die Pfade, deren Verlauf im folgenden genauer beschrieben wird, sind grau unterlegt.

4.2 Phasendiagramm der Adhäsionsstärke

Im folgenden Abschnitt wird ein Phasendiagramm der Adhäsionsstärke erstellt. Es werden die Konzentrationen aller beteiligten Adhäsions- und Repellermoleküle variiert und so deren Einfluss auf die Stärke der Adhäsion bestimmt (vgl. Abbildung 4.7). Eine Studie dieser Art wurde bereits von Guttenberg et al. (2001) für ein ähnliches System mit größeren Bindungsstärken durchgeführt und die dort gewonnenen Erkenntnisse sollen in die Diskussion mit eingehen.

Zunächst wird ein Kriterium für die Abgrenzung schwacher und starker Adhäsion festgelegt und für das betrachtete System die starke mit der spezifischen Adhäsion identifiziert. Dann werden die Einflüsse der Proteinkonzentration auf der Oberfläche, der Glykolipid- und der Polymerkonzentration und der Polymerlänge im Vesikel untersucht und diskutiert.

4.2.1 Kriterien starker Adhäsion

Als stark adhärert wird im folgenden eine Membran bezeichnet, deren thermische Undulationen im Rahmen der Messgenauigkeit vollständig unterdrückt werden. Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, ist dieser Effekt deutlich zu erkennen: Im linken

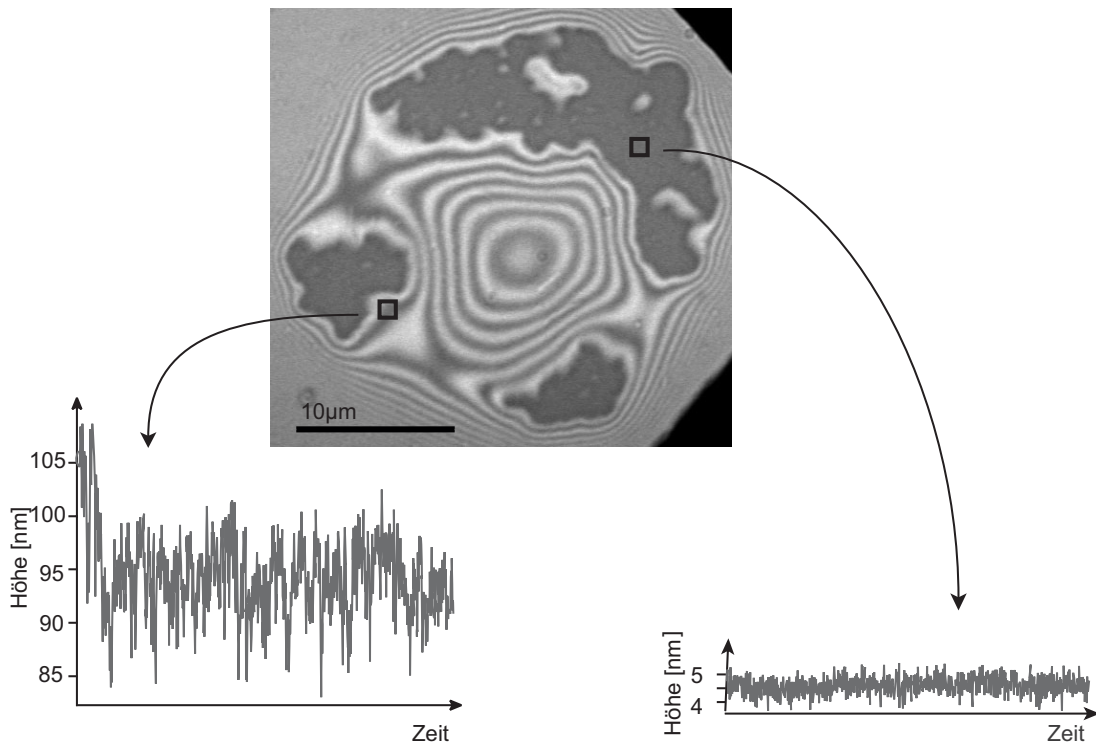


Abbildung 4.8: Ein Kriterium starker Adhäsion ist durch die Unterdrückung thermischer Undulationen gegeben. Links ist die Höhenentwicklung eines schwach adhärennten Membranstücks zu sehen, rechts ist ein stark adhärenntes Feld zu sehen.

Bildteil ist die Höhenentwicklung eines schwach adhärennten Membranstücks dargestellt, die Membran befindet sich in einer Höhe von knapp 100nm und fluktuiert stark um den Gleichgewichtsabstand. Dies ist ein Indiz für ein flaches Wechselwirkungspotential. Im rechten Bildteil dagegen ist ein Membranstück dargestellt, das sich wesentlich näher am Substrat befindet und nur sehr schwach mit einer Amplitude von etwa 1nm fluktuiert, was der Messgenauigkeit entspricht. Die thermischen Undulationen sind also vollständig unterdrückt, die Membran ist in einem starken Wechselwirkungspotential gebunden.

Um die starke Adhäsion mit der spezifischen Wechselwirkung zu identifizieren, werden verschiedene Kontrollmessungen durchgeführt. Es werden dazu Vesikel, die keine Glykolipide enthalten, auf einer Oberfläche, die mit E-Selektin funktionalisiert ist, inkubiert und die Adhäsion beobachtet. Das analoge Experiment mit funktionalisierten Vesikeln und nicht-funktionalisierten Oberflächen ist bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Beide Varianten des Kontrollexperimentes führen zu keiner starken Adhäsion, die Vesikel schweben über dem Substrat und fluktuieren (vgl. Abbildung 2.11a).

Als weiterer Beweis dafür, dass spezifische und starke Adhäsion in den hier

vorgestellten Experimenten identisch sind, dient die Tatsache, dass Vesikel, die mithilfe einer magnetischen Pinzette vom funktionalisierten Substrat abgelöst werden, nach dem Abschalten der Kraft reversibel und mit der gleichen Kinetik wie zuvor an die Oberfläche anbinden (vgl. Kapitel 6). Unspezifische starke Adhäsion ist weder durch eine externe Kraft auflösbar, noch wäre ein Wiederanbinden in der gleichen Kinetik wie zuvor wahrscheinlich.

Im folgenden wird mit Adhäsionsfläche grundsätzlich die Fläche starker Adhäsion bezeichnet.

4.2.2 Einfluss des reduzierten Volumens auf die Adhäsionsstärke

Um zu untersuchen, ob die experimentell nach der Bruinsma-Methode (vgl. Kapitel 4.1.3) ermittelte Adhäsionsstärke vom reduzierten Volumen abhängt, werden Vesikel gleicher Zusammensetzung miteinander verglichen, die auf identischen Oberflächen adhärirt sind und unterschiedliche reduzierte Volumina besitzen. Die Adhäsionsstärke wird für jeden Vesikel mit der Bruinsma-Methode an mehreren Linienprofilen berechnet und um die gesamte Kontur gemittelt. Die so erhaltenen Werte werden gegen das reduzierte Volumen aufgetragen, welches durch den Vergleich mit den theoretisch im globalen Modell vorhergesagten Vesikelformen ermittelt wird. Die sich daraus ergebende Abhängigkeit der Adhäsionsstärke vom reduzierten Volumen wird für verschiedene Kombinationen von Proteindichte auf der Oberfläche und Rezeptor- bzw. Repelliergehalt im Vesikel durchgeführt.

Es ergibt sich bei allen betrachteten Experimenten ein vergleichbares Verhalten: im Bereich des reduzierten Volumens von $v=0,7$ bis $0,95$ steigen die Adhäsionsstärken mit wachsendem v an. Oberhalb von $v=0,95$ sinkt die Adhäsionsstärke mit steigendem v . Einige repräsentative Beispiele sind in Abbildung 4.9a dargestellt. Dort ist sowohl gut zu erkennen, dass sich die Steigung der Graphen bei großen reduzierten Volumina umkehrt, als auch, dass für die vorhandenen Daten keine einheitliche positive Steigung für kleinere reduzierte Volumina angegeben werden kann.

Um herauszufinden, ob die beobachtete Abhängigkeit auf die Membranspannung zurückzuführen ist, die für die Adhäsionsstärke eine entscheidende Rolle spielt (vgl. Gleichung (4.22)), wird für die selben Punkte die Membranspannung gegen das reduzierte Volumen aufgetragen (Abbildung 4.9b). Es ergibt sich für die Membranspannung die gleiche Form der Abhängigkeit vom reduzierten Volumen wie für die Adhäsionsstärke. Die beobachteten Abhängigkeiten sind dabei so stark, dass sie nicht vernachlässigt werden können. Auf der Basis der vorhandenen Daten lässt sich keine einheitliche Steigung, sondern nur eine Tendenz feststellen, da in ihren Konzentrationen unterschiedlich zusammengesetzte Adhäsionssysteme unterschiedliche Abhängigkeiten vom reduzierten Volumen zeigen. Deshalb wird auf eine Normierung auf ein bestimmtes reduziertes Volumen verzichtet

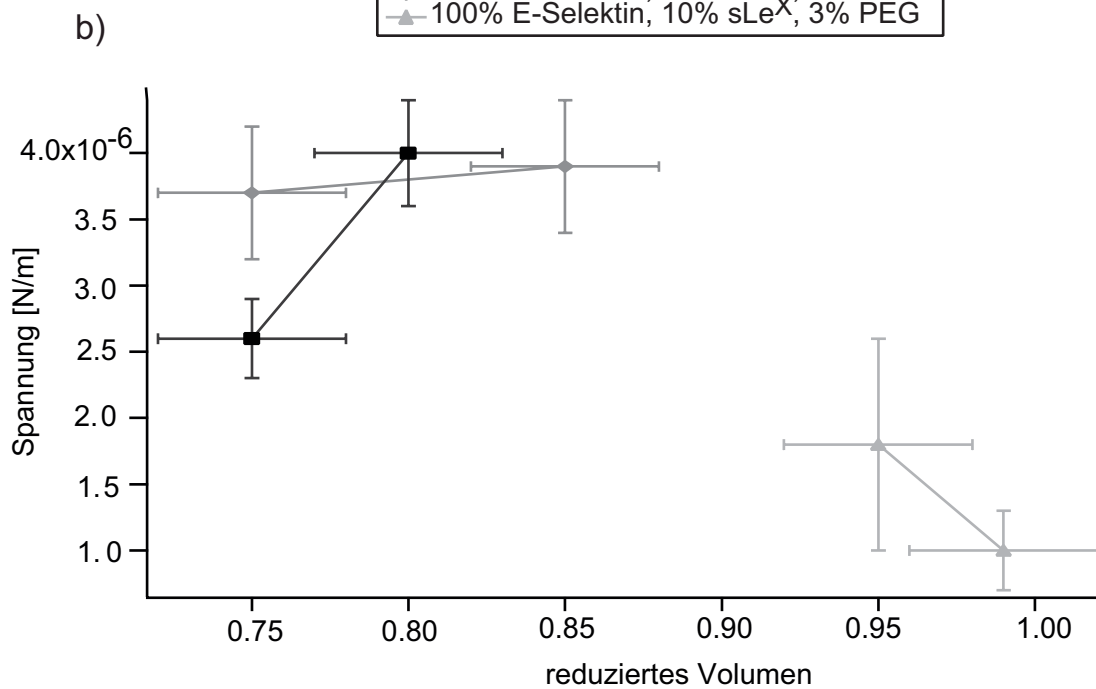
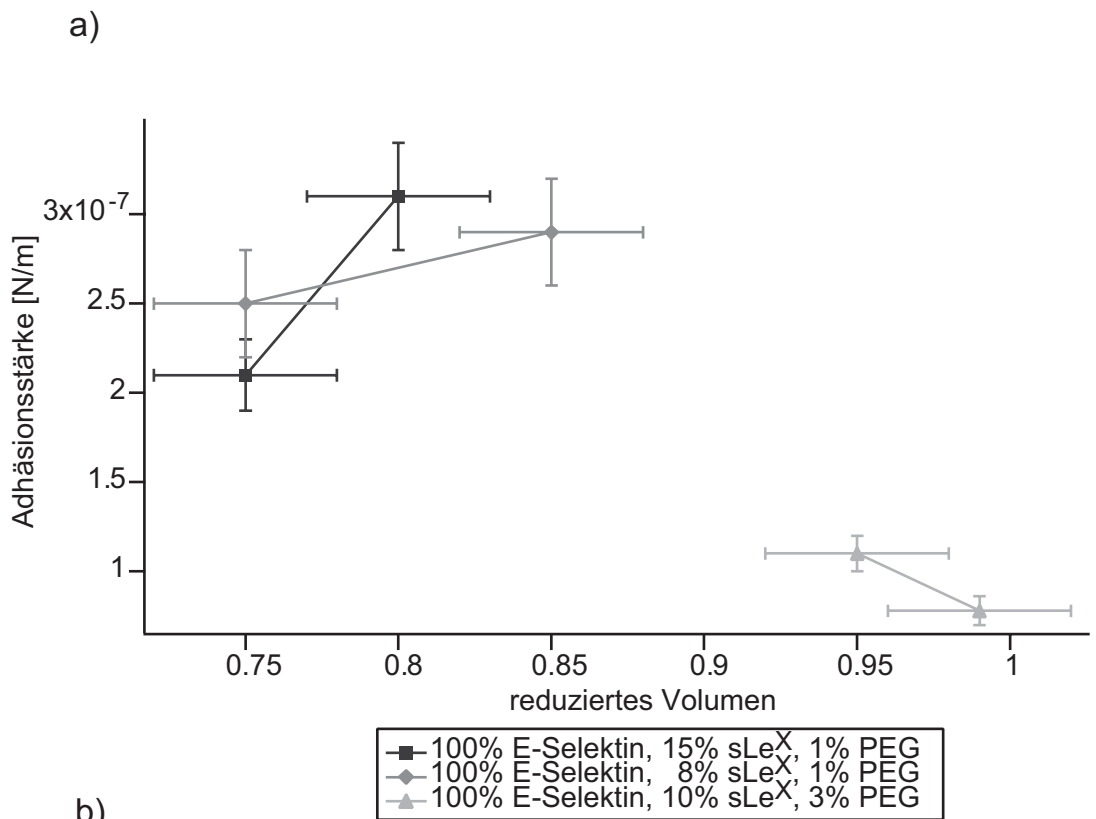


Abbildung 4.9: a) Abhängigkeit der nach der Bruinsma-Methode gemessenen Adhäsionsstärke vom reduzierten Volumen. Es ist eine klare Tendenz zu steigenden Adhäsionsstärken mit wachsendem reduziertem Volumen zu erkennen. Für $v > 0,95$ ändert die Abhängigkeit ihr Vorzeichen und die Adhäsionsstärke sinkt mit wachsendem reduziertem Volumen. b) Die gemessene Membranspannung γ zeigt die gleichen Tendenzen wie die Adhäsionsstärke.

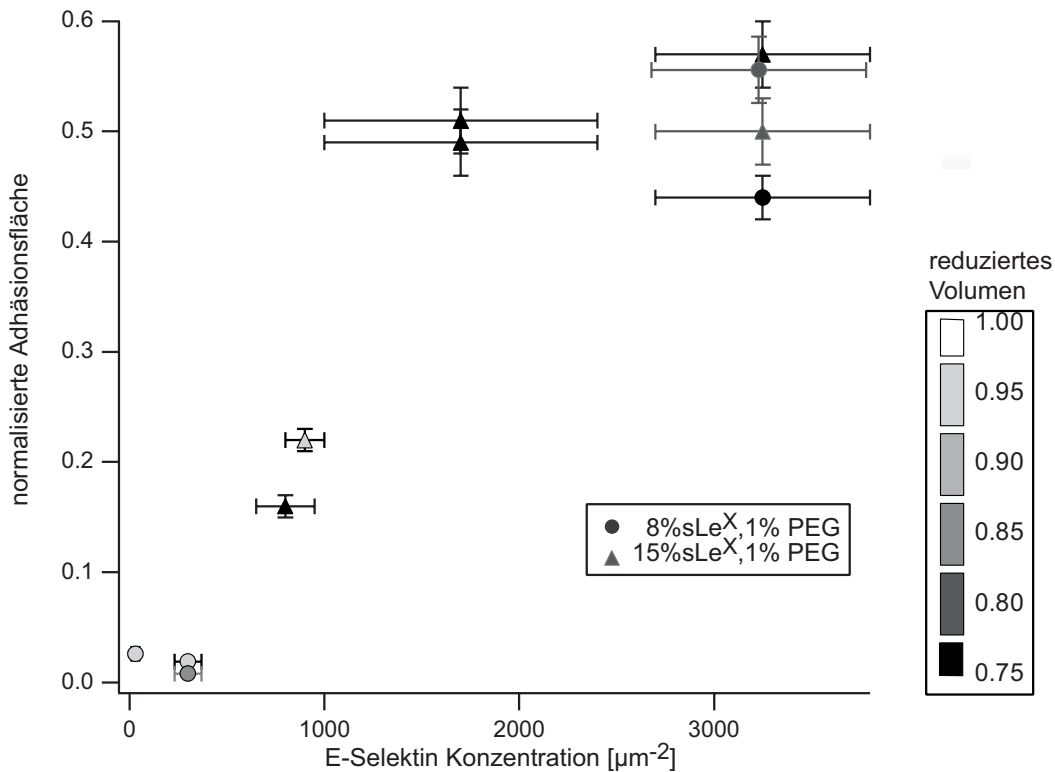


Abbildung 4.10: Einfluss der E-Selektindichte auf die Größe der Adhäsionsfläche: mit steigender Proteindichte wächst das Verhältnis der Adhäsionsfläche zur Gesamtfläche (Projektion, die durch den Radius des Vesikels aufgespannt wird) des Vesikels an, die Kurve geht für große Proteindichten in eine Sättigung über.

und es werden nur Vesikel mit gleichem v miteinander verglichen, bzw. die v -Abhängigkeit wird explizit dargestellt.

4.2.3 Einfluss der Konzentrationen von Rezeptor und Ligand

Der Einfluss der E-Selektindichte auf das Bindungsverhalten wird durch eine Verdünnungsreihe der adsorbierten Proteine untersucht. Es werden Oberflächen mit 0,01-, 0,1-, 0,2-, 0,3-, 0,5- und 1-facher Konzentration der Proteinlösung hergestellt. Die Oberflächen werden daraufhin mit fettfreier Milch passiviert und Vesikel mit 8 bzw. 15% Sialyl-Lewis^X-Lipid und 1% PEG-Lipid werden auf den Oberflächen inkubiert.

Bei der Betrachtung der Daten wird deutlich, dass sich unter veränderten Adhäsionsbedingungen nicht nur die Adhäsionsstärke, sondern auch die Größe der Adhäsionsfläche ändert. Deshalb wird zur Auswertung auch die Adhäsionsfläche bestimmt. Dabei ist es notwendig, eine geeignete Normierung zu wählen, da die

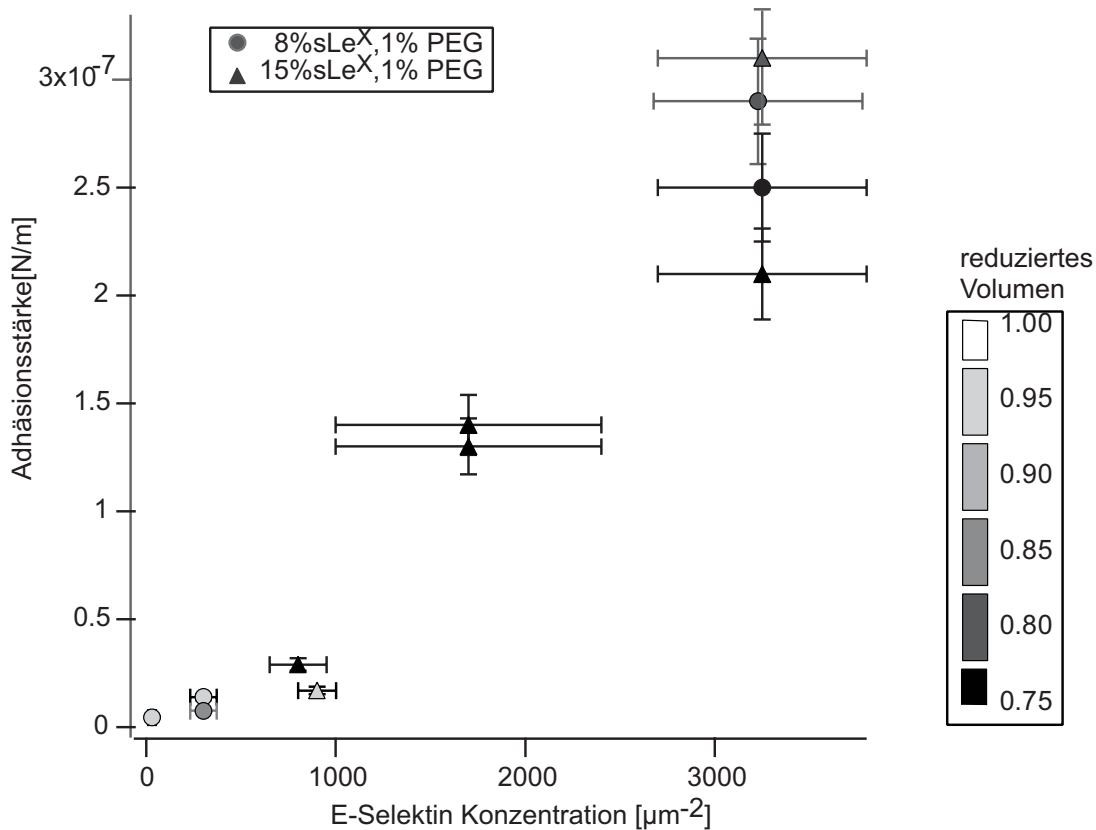


Abbildung 4.11: Einfluss der E-Selektindichte auf die Adhäsionsstärke: die Adhäsionsstärke wächst mit steigender Proteindichte linear an.

beobachteten Vesikel unterschiedlich groß sind. Die in Abbildung 4.10 angegebene normalisierte Adhäsionsfläche bezeichnet das Verhältnis der Adhäsionsfläche zu einer Scheibe, deren Radius der im Hellfeldmikroskop ermittelte Vesikelradius ist.

In Abbildung 4.10 ist diese normalisierte Adhäsionsfläche gegen die E-Selektindichte auf der Oberfläche aufgetragen. Verschiedene Glykolipidanteile sind durch Symbole voneinander zu unterscheiden, die unterschiedlichen reduzierten Volumina sind als Graustufen wiedergegeben und bewirken eine vertikale Aufspaltung der Kurve für einzelne Messpunkte. Insgesamt ist deutlich erkennbar, dass die relative Größe der Adhäsionsfläche mit steigender Proteinkonzentration anwächst. Es entsteht eine Sättigungskurve, deren Asymptote durch die maximal zur Verfügung stehende Überschussfläche gegeben ist.

In einem weiteren Schritt wird eine Auswertung mit dem Bruinsma-Modell unter Berücksichtigung des reduzierten Volumens durchgeführt. In Abbildung 4.11 dargestellt ist die Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von der Selektindichte für die gleichen Vesikel wie zuvor. Der Verlauf der Adhäsionsstärke mit steigender E-Selektinkonzentration zeigt eine nahezu lineare Abhängigkeit, die keine Sättigung

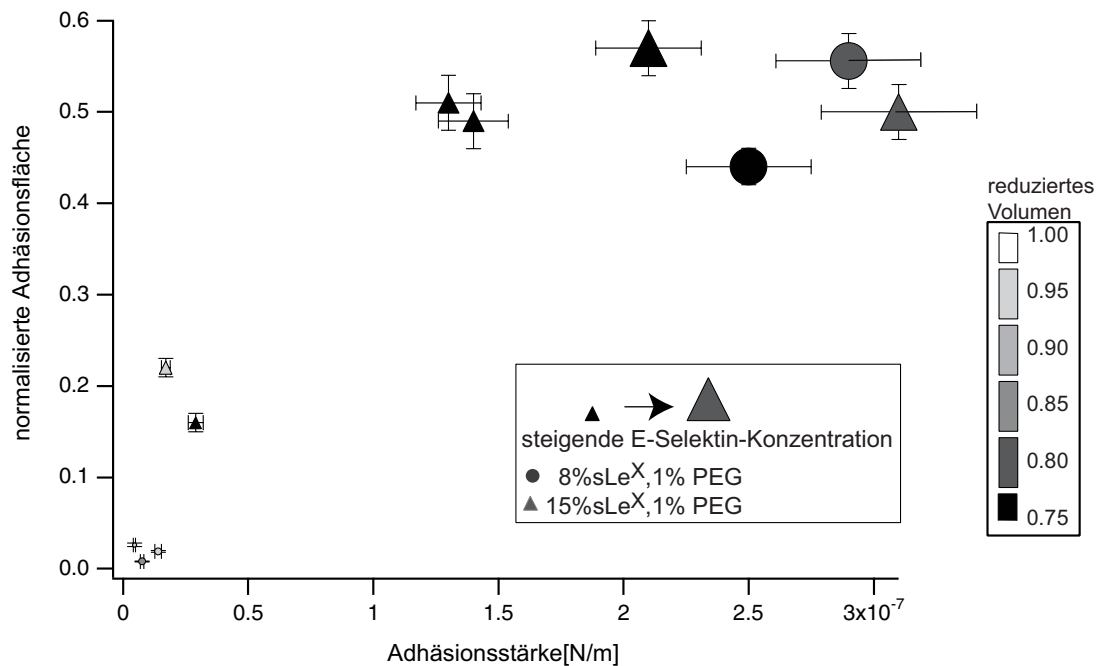


Abbildung 4.12: Für steigende Proteindichten (dargestellt durch die Größe des Datenpunkts) bilden die normalisierte Adhäsionsfläche und die Adhäsionsstärke eine Sättigungskurve.

erkennen lässt.

Zur genaueren Untersuchung des Adhäsionsverhaltens bietet es sich an, die normalisierte Adhäsionsfläche gegen die Adhäsionsstärke (nach Bruinsma) aufzutragen. Es ergibt sich eine Sättigungskurve, bei der größere E-Selektinkonzentrationen im Bereich größerer Werte der Adhäsionsstärke liegen. Es existiert also ein Bereich, in dem die Größe der Adhäsionsfläche über die Dichte der E-Selektine auf der Oberfläche eingestellt werden kann. Überschreitet man eine Oberflächenkonzentration von ca. 2000 Selektin-Molekülen pro μm^2 , so bleibt die Größe der Adhäsionsfläche bei wachsender Adhäsionsstärke unverändert.

Sowohl bei der Adhäsionsstärke als auch bei der normierten Adhäsionsfläche fällt auf, dass die Werte für unterschiedliche Glykolipidanteile identisch sind und keinerlei Abhängigkeit von der Glykolipidkonzentration festgestellt werden kann. Deshalb werden im folgenden unterschiedliche Sialyl-Lewis^X-Anteile zwar dargestellt, aber nicht gesondert diskutiert.

4.2.4 Einfluss der Polymer-Konzentration

Der Einfluss der Polymerkonzentration auf das Adhäsionsverhalten wird mit Vesikeln überprüft, die zwischen 8 und 15% Sialyl-Lewis^X-Lipid und zwischen 0 und 5% des bisher verwendeten PEG-Lipids PEG-2000 enthalten. Diese Vesikel

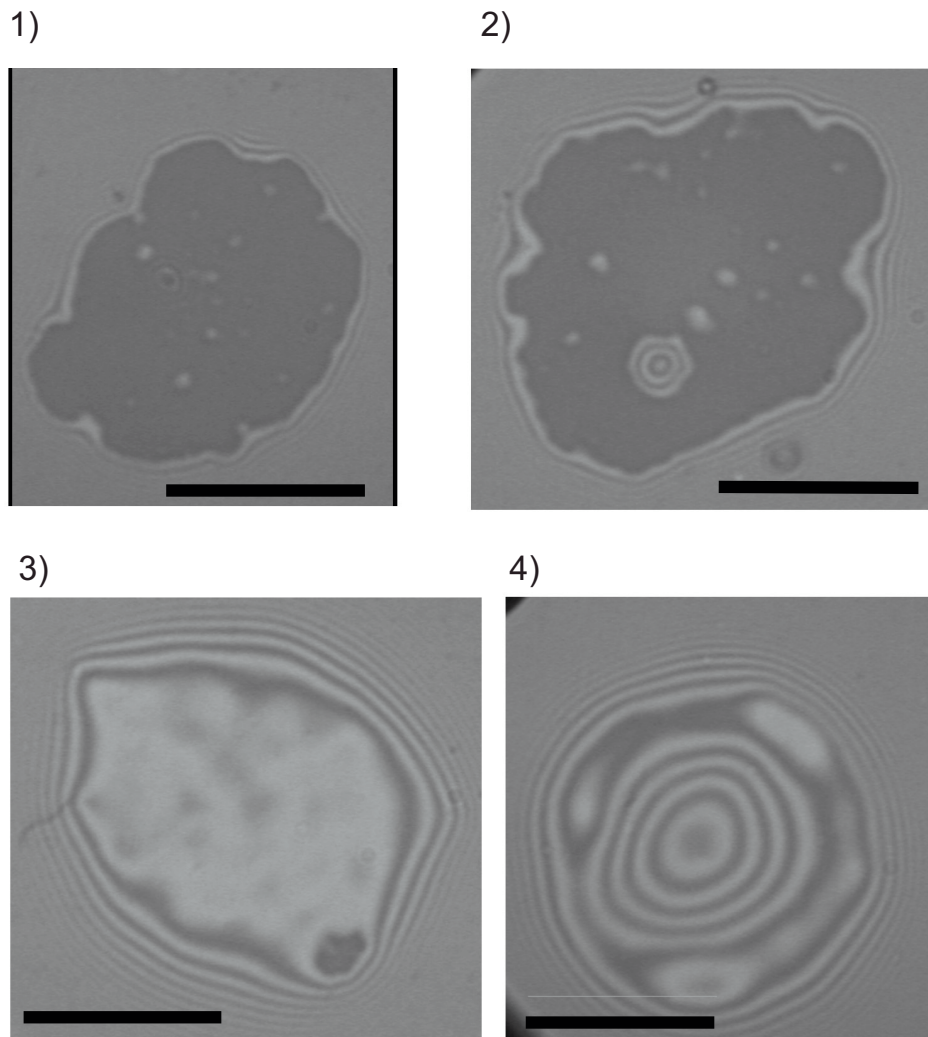


Abbildung 4.13: Einfluss des Polymeranteils. Dargestellt sind adhärierte Vesikel auf identischen Oberflächen mit vergleichbarem Sialyl-Lewis^X-Gehalt und unterschiedlichem Polymeranteil (PEG-2000). Die Größe der dunklen Kontaktfläche ändert sich mit steigendem Polymergehalt dramatisch: 1) 0% PEG; 2) 1% PEG; 3) 3% PEG; 4) 5% PEG (Maßstab=10 μ m)

werden auf einer Oberfläche mit 3250 ± 500 E-Selektin-Molekülen pro μm^2 (Maximalkonzentration) inkubiert. Da sich, wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, aus den unterschiedlichen Glykolipidanteilen bei gleicher Polymerkonzentration kein Unterschied im Adhäsionsverhalten ergibt, werden die Vesikel miteinander verglichen, auch wenn sie unterschiedliche Sialyl-Lewis^X-Anteile besitzen.

Zunächst wird die Abhängigkeit der Größe der Adhäsionsfläche von der Polymerkonzentration untersucht. Maximale Adhäsionsflächen sind dabei im Experiment ohne Repellermoleküle zu beobachten (Abbildung 4.13-1) wobei eine

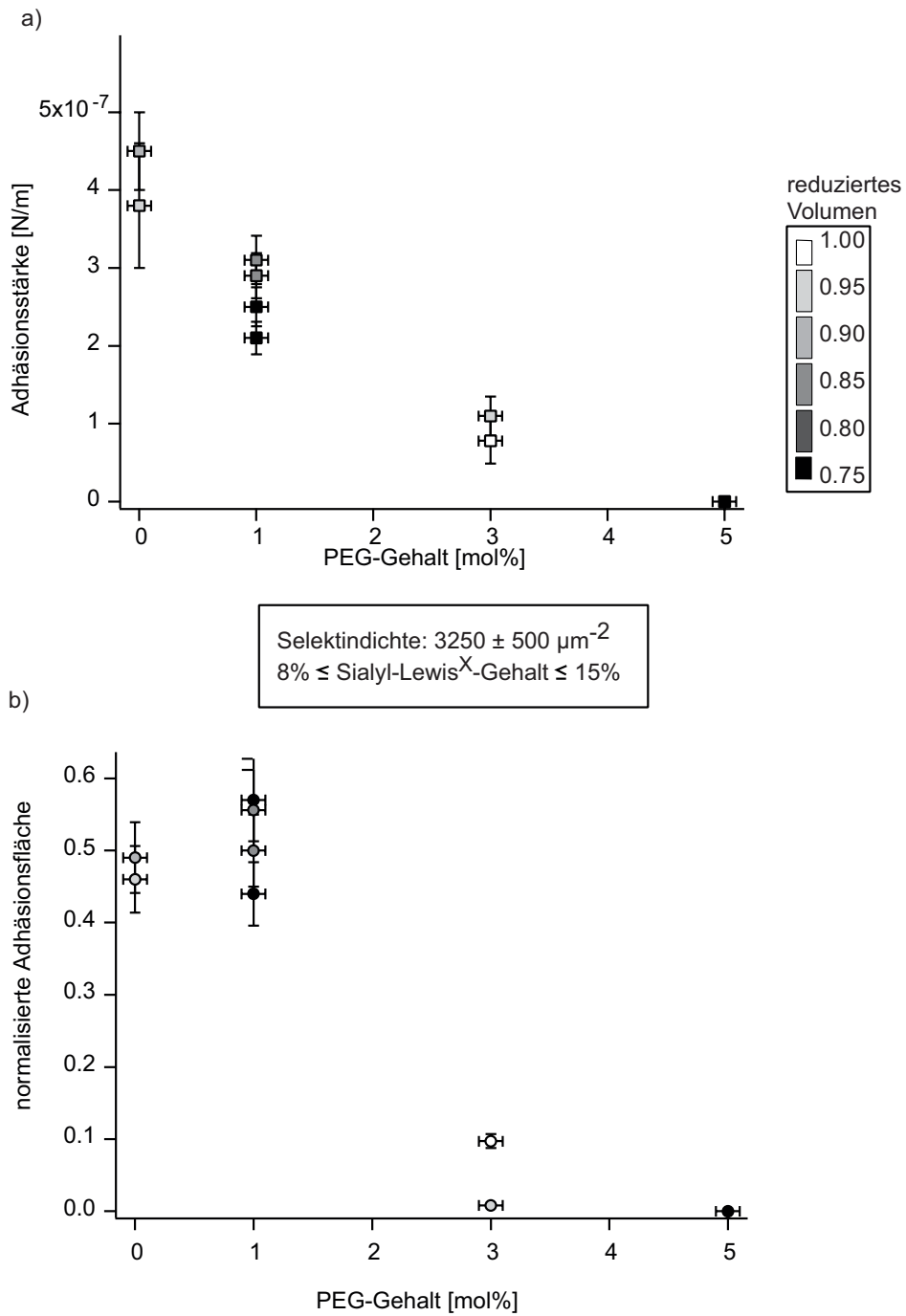


Abbildung 4.14: Einfluss des Polymeranteils.

a) Für steigenden Polymeranteil (PEG-2000) fällt die Adhäsionsstärke linear ab.

b) Die normalisierte Adhäsionsfläche bleibt dagegen zunächst konstant und verringert sich nur für große Polymerdichten.

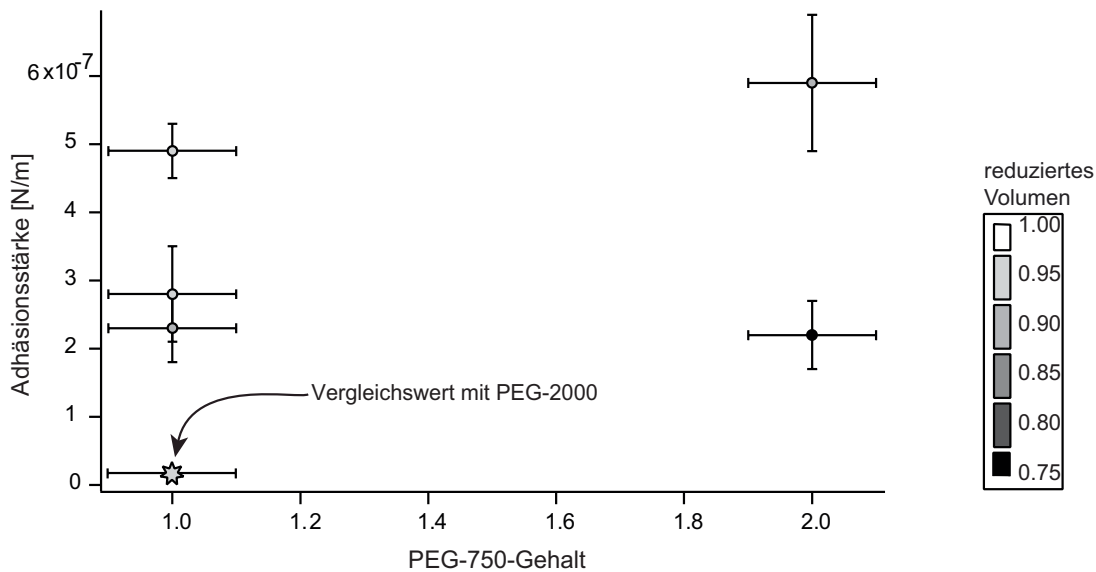


Abbildung 4.15: Einfluss des Polymerlänge. Verwendet man das kürzere Polymer PEG-750 als Repeller, so ist im Bereich zwischen 1% und 2% Polymeranteil kein Abfall der Adhäsionsstärke zu beobachten. Mit einem Stern gekennzeichnet ist die Adhäsionsstärke bei gleichen Bedingungen für das längere Polymer PEG-2000.

Erhöhung des Polymeranteils auf 1% , die Größe der Adhäsionsflächen nicht beeinflusst (Abbildung 4.13-2). Diese Tendenz verändert sich jedoch drastisch, wenn der Polymeranteil weiter auf 3% erhöht wird (Abbildung 4.13-3). Hier können bei einem Sialyl-Lewis^X-Anteil von 10% nur noch kleine Adhäsionsflächen beobachtet werden Für die Vesikel mit 5% Polymeranteil und 15% Sialyl-Lewis^X-Lipid in der Membran kann schließlich keine starke Adhäsion mehr festgestellt werden, die Vesikel schweben über dem Substrat (vgl. Abbildung 4.13-4). In Abbildung 4.14b ist die normalisierte Adhäsionsfläche gegen den Polymeranteil aufgetragen und das fast stufenförmige Profil ist gut zu erkennen.

Anders verhält sich die nach der Bruinsma-Methode gemessene Adhäsionsstärke: Dort ist, wie in Abbildung 4.14a dargestellt, für die oben beschriebenen Vesikel ein linearer Abfall mit steigender Polymerkonzentration zu beobachten. Dieser Verlauf deckt sich mit dem, der schon bei veränderter E-Selektinkonzentration beobachtet wurde. Auch hier wird bei ungünstigeren Bedingungen für die Adhäsion zunächst die Bindungsstärke reduziert und erst dann die Adhäsionsfläche verkleinert.

4.2.5 Einfluss der Polymer-Länge

Es ist in dem betrachteten System möglich, nicht nur die Konzentration, sondern auch die Länge der verwendeten Polymere zu verändern. Der Einfluss der Poly-

merlänge auf die Adhäsion ist dabei deshalb interessant, weil damit neben der lateralen Konzentration auch die Schichtdicke der Polymere variiert wird, was zu einem besseren Verständnis des Adhäsionsverhaltens führen kann.

Die für die Adhäsionsexperimente normalerweise verwendeten Polymere (PEG-2000) haben eine Länge von 45 Monomereinheiten und besitzen damit unter den gegebenen Konzentrationen eine Schichtdicke von ca. 3,44nm, was der Länge des Rezeptors entspricht. Die in dieser Serie von Experimenten verwendeten Polymere PEG-750 weisen nur 16 Monomereinheiten auf und bilden somit eine Schicht der Dicke 1,78nm. Es werden Oberflächen mit 900 ± 100 E-Selektinmolekülen pro μm^2 verwendet, auf denen Vesikel mit 15% Sialyl-Lewis^X-Lipid und 1 bzw. 2% kurzer Polymere adhäreren. Die Auswirkungen auf das Adhäsionsverhalten sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Gegensatz zum längeren Polymer PEG-2000 kein Abfall der Adhäsionsstärke mit steigendem Polymergehalt zu beobachten ist. Die Adhäsionsstärke ist insgesamt größer als im Fall von PEG-2000 und sie bleibt zumindest im beobachteten Konzentrationsbereich konstant.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Mit dem untersuchten Komponenten ist es möglich, ein System aufzubauen, das in seinem Adhäsionsverhalten sehr sensitiv auf Änderungen von Rezeptor-, Ligand- und Repellerdichte reagiert. Als ein neuer Aspekt wird das reduzierte Volumen in die Auswertung miteingebracht und dessen Einfluss auf das System abgeschätzt.

Das reduzierte Volumen als Feinstruktur

In dieser Arbeit ist es durch die Verfügbarkeit einer globalen, theoretischen Rekonstruktion der Vesikelform erstmals möglich, das reduzierte Volumen der Vesikel direkt aus den Interferenzaufnahmen zu bestimmen. Dies stellt eine Erweiterung der bisherigen Möglichkeiten dar (Nardi 1998, Guttenberg 2001), die darin bestanden, das reduzierte Volumen über die Osmolalitäten von Quellmedium und umgebendem Medium einzustellen, die Vesikelform gesondert, z.B. durch konfokale Mikroskopie zu bestimmen und dann als konstant anzunehmen. Die durch die Präparation entstehende Bandbreite reduzierter Volumina konnte damit in diesen früheren Arbeiten nicht berücksichtigt werden. Wie aus den in Kapitel 4.2.2 gezeigten Graphen hervorgeht, ist die mit der Bruinsma-Methode gemessene Adhäsionsstärke vom reduzierten Volumen abhängig, einzelne Messpunkte der Adhäsionsstärke werden in einer Art Feinstruktur-Aufspaltung voneinander getrennt, deren mögliche Ursachen im folgenden erörtert werden sollen:

Die Abhängigkeit der Membranfluktuationen – und damit auch des repulsiven Potentials, das durch diese hervorgerufen wird – von der Membranspannung ist bereits bei Helfrich & Servuss (1984) beschrieben. Dort wird dargelegt, dass

Fluktuationen durch Spannung in der Membran unterdrückt werden und damit die Adhäsionsstärke erhöht wird.

In einem Modell von Seifert (1995) wird das Konzept der Berechnung der globalen Form eines Vesikels mit dem Einfluss von Membranundulationen verknüpft. Das Gesamtpotential setzt sich dann aus einem Ruhepotential und einem repulsiven Anteil der Fluktuationen zusammen. Der Anteil der Fluktuationen verschwindet mit steigender Spannung und das System relaxiert in ein tieferes Ruhepotential.

Da nach dem Modell von Smith et al. (2003) Vesikel mit einem reduzierten Volumen kleiner als 0,85 bei kleinen Wechselwirkungsstärken an ihrer Oberseite eine diskozyte Form aufweisen und damit genug Überschussfläche besitzen, um Undulationen ausführen zu können, ist die oben beschriebene Ursache für die Abhängigkeit der Adhäsionsstärke durchaus denkbar. Fluktuationen adhärerter Vesikel werden im Experiment auch beobachtet, es konnte aber kein geeignetes Mittel zur Quantifizierung dieser speziellen Undulationen gefunden werden.

Eine andere mögliche Ursache für die Abhängigkeit der Adhäsionsstärke vom reduzierten Volumen könnte auch darin begründet sein, dass in die Spannungsbestimmung der Vesikel mit der Bruinsma-Methode veränderte reduzierte Volumina nicht als Parameter eingehen. Dies könnte sich in einer Fehleinschätzung der durch die Adhäsion induzierten Spannung auswirken und somit einen systematischer Fehler in der Auswertung verursachen.

Insgesamt ist zu bemerken, dass die Aufspaltung der Adhäsionsstärke durch verschiedene reduzierte Volumina kleiner ist als die Unterschiede zwischen verschiedenen Punkten des Phasendiagramms, so dass die hier erhaltenen Ergebnisse trotzdem mit früheren Experimenten verglichen werden können.

Das Adhäsionsverhalten eines schwach adhätierenden Systems

Das in dieser Arbeit untersuchte Adhäsionssystem besitzt ein Rezeptor-Ligand-Paar niedriger Affinität, was dazu führt, dass das System sehr sensitiv auf Änderungen in der Zusammensetzung der an der Adhäsion beteiligten Moleküle reagiert.

Eine Variation der E-Selektin-Dichte auf dem Substrat ergibt eine lineare Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von der Proteindichte und eine Sättigungskurve in der Adhäsionsfläche, die ihre Asymptote bei einer Proteindichte von ca. 2000 Molekülen pro μm^2 erreicht (vgl. Abbildungen 4.11 und 4.10). Es wäre auch eine sigmoidale Abhängigkeit der Adhäsionsfläche von der Oberflächenkonzentration der E-Selektine denkbar: dies würde auf ein kooperatives Verhalten der Proteine hinweisen, die dann erst ab einer bestimmten Belegungsdichte Adhäsion vermitteln würden. Da weder die Feinstruktur der Oberfläche bekannt ist, noch eine Methode verwendet wird, die für die Messung eines solchen Effekts empfindlich genug ist, können diese beiden möglichen Szenarien nicht voneinander unterschieden werden. Die Form dieser Abhängigkeiten lässt den Schluss zu, dass auch für

kleinere E-Selektindichten immer eine möglichst große Adhäsionsfläche gebildet wird und so, wenn möglich, die gesamte Überschussfläche des Vesikels verbraucht wird. Durch den großen fixierten Flächenanteil des Vesikels können Undulationen unterdrückt werden und es wird – wie oben diskutiert – ein energetisch günstiger Zustand erreicht. Ist die maximale Fläche erreicht, wird bei steigender Proteinkonzentration die Dichte der Bindungen erhöht und damit die Adhäsionsstärke weiter vergrößert. Die Bedeutung dieses Aspekts wird auch bei der Betrachtung dynamischer Vorgänge bei der Vesikeladhäsion untersucht werden (vgl. Kapitel 5).

Anders verhält sich das System bei einer Variation des Liganden, des Sialyl-Lewis^X-Moleküls. Eine Änderung der Glykolipid-Konzentration von 8% auf 15% spielt in der statischen Betrachtung der Adhäsionszustände keine Rolle, die verschiedenen Zusammensetzungen können nicht unterschieden werden (vgl. Abbildung 4.10 und 4.11, bei maximaler E-Selektinkonzentration) Dieses Verhalten kann durch die Polyvalenz der Sialyl-Lewis^X-Moleküle erklärt werden (Mammen et al. 1998, Gege 2001): es wird nur dann starke Adhäsion vermittelt, wenn die Konzentration der Liganden so groß ist, dass eine simultane Bindung mehrerer Liganden innerhalb einer kleinen Fläche möglich ist. Es ist also immer so viel Sialyl-Lewis^X vorhanden, d.h., die Konzentration freier Liganden bleibt während der Adhäsion so groß, dass der limitierende Faktor für die Adhäsion entweder in der E-Selektin-Dichte oder in der Repellerkonzentration zu finden ist. Dabei sollte auch erwähnt werden, dass die hier verwendete Konzentration – in der Größenordnung – der Konzentration von Sialyl-Lewis^X im Leukozyten entspricht (Konzentration im Leukozyten $\approx 50.000 \mu\text{m}^{-2}$ (Symington et al. 1985), Konzentration im Vesikel bei 10% Sialyl-Lewis^X $\approx 100.000 \mu\text{m}^{-2}$).

Eine sehr starke Veränderung des Adhäsionsverhaltens zeigt sich bei der Variation der Polymerkonzentration (PEG-2000) in der Vesikelmembran. Mit auf maximal 5% steigender Polymerkonzentration sinkt die Adhäsionsstärke linear ab, bis keine starke Adhäsion mehr zu beobachten ist. Die Adhäsionsfläche bleibt dabei zunächst konstant und fällt bei 3% Polymeranteil stufenförmig auf punktweise Adhäsion ab (vgl. Abbildung 4.14). Die Bildung von einzelnen Punkten starker Adhäsion innerhalb einer größeren Fläche schwacher Wechselwirkung, die bei einem Polymeranteil von 3% beobachtet wird, kann mit dem Phänomen der Ostwald-Reifung in Verbindung gebracht werden. Dort wird das Wachstum großer Domänen einer Phase auf Kosten kleinerer Domänen beobachtet (vgl. z.B. Yao et al. 1993). Die analoge Entwicklung kann auch in der Kontaktfläche eines Vesikels möglich sein: kleine, mit dem Lichtmikroskop nicht sichtbare Punkte starker Adhäsion werden zugunsten von größeren Adhäsionsflächen aufgelöst. Dafür spricht auch die von Bruinsma et al. (2000) diskutierte laterale Anziehung zwischen zwei Adhäsionspunkten. Diese ist in der starken Krümmung begründet, die die Membran zur Bildung einer Bindung eingehen muss. Verbinden sich zwei Adhäsionspunkte, so vergrößert sich zum einen dieser Krümmungsradius, zum anderen muss die Membran nur an einer Stelle deformiert werden und nicht mehr

an zweien. Die Randspannung der so gebildeten Adhäsionspunkte wird umso unbedeutender, je größer ein solcher Adhäsionsfleck wird. Dabei muss bemerkt werden, dass die E-Selektinmoleküle auf dem Substrat immobilisiert sind und ein Verschieben von gebundenen Rezeptor-Ligand-Paaren somit hier nicht möglich ist.

Der Einfluss der Polymere, die einen bestimmten, von ihrer Länge abhängigen Membran-Substrat-Abstand erzeugen, lässt sich besonders gut erkennen, wenn die Zahl der Monomere und damit die Schichtdicke der Polymere verändert wird. Wie in Abbildung 4.15 dargestellt, wird die Adhäsion stärker, wenn ein kürzeres Polymer (PEG-750) verwendet wird. Die Abhängigkeit von der Polymerdichte verändert sich dahingehend, dass im beobachteten Bereich (bis 2% PEG-750) keine Abnahme von Adhäsionsfläche und -stärke beobachtet werden kann, während die Adhäsionsstärke des längeren Polymers PEG-2000 in diesem Bereich linear abnimmt. Dies lässt den Schluss zu, dass der Ligand in dem Experiment mit den kurzen Polymeren sterisch wesentlich leichter zugänglich ist und die Repeller weniger stark verdrängt bzw. zusammengedrückt werden müssen. Dies verringert auch die Tendenz zur Bildung eines osmotischen Drucks der verdrängten Polymere auf die Kontaktfläche, da der Konzentrationsgradient zwischen Bereichen innerhalb und außerhalb der Kontaktfläche kleiner ist als bei längeren Polymeren. Deshalb können mehr Bindungen eingegangen werden, als dies bei gleicher Repellerdichte mit längeren Polymeren der Fall ist. Mit weiter steigender PEG-750 Konzentration würde der Effekt der sinkenden Adhäsionsstärke und der schrumpfenden Adhäsionsfläche auch für das kurze Polymer PEG-750 auftreten, aber durch die kleinere Schichtdicke erst bei höheren Konzentrationen als das bei PEG-2000 der Fall ist.

Vergleich mit anderen Systemen

Vergleicht man das in dieser Arbeit vorgestellte System mit anderen Vesikeladhäsionsexperimenten, so lassen sich Parallelen, aber auch qualitativ verschiedenes Verhalten feststellen. So zeigt das bei Guttenberg (2001) diskutierte System bei konstanter Dichte fixierter Integrine auf dem Substrat und variierenden Liganden- und Repellerkonzentrationen im Vesikel entweder gleichbleibende, starke Adhäsion oder nur schwache Adhäsion ohne die nennenswerte Ausbildung von Adhäsionsflächen. Der Übergang ist scharf abgegrenzt und verschiebt sich mit steigender Repellerkonzentration zu höheren Ligandkonzentrationen. Ein über einen Bereich einstellbarer Übergang wie im hier untersuchten System ist dort nicht erreichbar. Dies ist vor allem auf die höhere Affinität des Liganden zum Rezeptor zurückzuführen (das Integrin-RGD-System bindet circa fünfmal stärker als das E-Selektin-Sialyl-Lewis^X-System), aber auch die Größe des RGD-Rezeptors dürfte eine Rolle spielen, da dieser aufgrund eines langen Abstandhalters aus der Polymerschicht herausragt und leicht zugänglich ist.

In den Experimenten von Kloboucek et al. (1999) und Bruinsma et al.

(2000) wurde ein homophiles Protein (csA) als Rezeptor und Ligand verwendet. Dort konnte, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, eine Abhängigkeit der Adhäsionsfläche von der Konzentration des Liganden im Vesikel festgestellt werden, wenn dieser zwischen 1 und 20-facher Konzentration variiert wurde. Vermutlich ist in dem großen Bereich der Variation, in dem noch Adhäsion stattfindet, die Ursache für die Beobachtbarkeit dieser Abhängigkeit zu sehen. Auch die mittlere Adhäsionsstärke wächst in diesem System mit steigender Ligandendichte. Allerdings muss man bei einem Vergleich beachten, dass in dem csA-System sowohl der Ligand als auch der Rezeptor in eine fluide Matrix eingebettet waren, was die Adhäsionseigenschaften verändern könnte.

Die oben gezogenen Vergleiche können nur Teilaspekte der jeweiligen Arbeiten wiedergeben, da die Art der Experimente sehr unterschiedlich ist. Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit liegt darin, dass für ein System ein Phasendiagramm der Adhäsionsstärke und -fläche in den drei Dimensionen Rezeptor-, Ligand und Repellerdichte mit zusätzlicher Variation der Repellerlänge erstellt wurde. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse können dadurch besser eingeordnet werden, da zusätzliche Informationen – wie zum Beispiel die Längen- und Konzentrationsverhältnisse von Ligand und Repeller – mit in die Betrachtung eingehen können.

Kapitel 5

Adhäsions- und Entbindungsdynamik spezifisch adhärierter Vesikel

Die Dynamik, mit welcher ein Vesikel spezifisch an ein Substrat adhäriert, ist, ebenso wie der im vorangegangenen Kapitel diskutierte Zustand im thermodynamischen Gleichgewicht, abhängig von der Art des Wechselwirkungspotentials. So ist in einer früheren Studie die Adhäsionsgeschwindigkeit für ein System mit größeren Bindungsaffinitäten untersucht worden (Guttenberg 2001), um Erkenntnisse über die Anzahl der geschlossenen Bindungen pro Zeiteinheit als Funktion der Konzentrationen von Adhäsions- und Repellermolekülen zu erlangen. Daraus lassen sich Rückschlüsse über die zeitlimitierenden Faktoren des Adhäsionsprozesses ziehen, die zum Beispiel durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle gegeben sein können. Bei größeren Polymerdichten kann zusätzlich die Reibung der Polymerketten deren Diffusion verlangsamen.

In einer anderen Studie, bei der Modellzellen in einem Scherfluss rollen, ist die Konzentration der Adhäsionsmoleküle für die Rollgeschwindigkeit entscheidend, d.h., die Dynamik von Bindung und Ablösung wird auch hier durch die Dichte der Rezeptoren und Liganden bestimmt (experimentell: Brunk & Hammer (1997), Simulation: Bhatia et al. (2003))

Es soll im folgenden Kapitel zum einen gezeigt werden, wie die Zusammensetzung des Adhäsionssystems die Geschwindigkeit und vor allem die Charakteristik der Adhäsionszustände beeinflusst, zum anderen wird untersucht, wie das System auf eine Störung von außen reagiert, die die chemische Zusammensetzung verändert und dadurch Gleichgewichte verschieben kann.

Zunächst wird der Einfluss der Polymerlänge auf die Adhäsionsdynamik untersucht. Die längeren Polymere (PEG-2000 Lipopolymer) besitzen den gleichen Durchmesser wie der verwendete Rezeptor und bilden somit einen starken repulsiven Gegenspieler bei der Adhäsion. Zum Vergleich werden Experimente mit einem wesentlich kürzeren Polymer herangezogen. Der Einfluss der E-Selektindichte auf

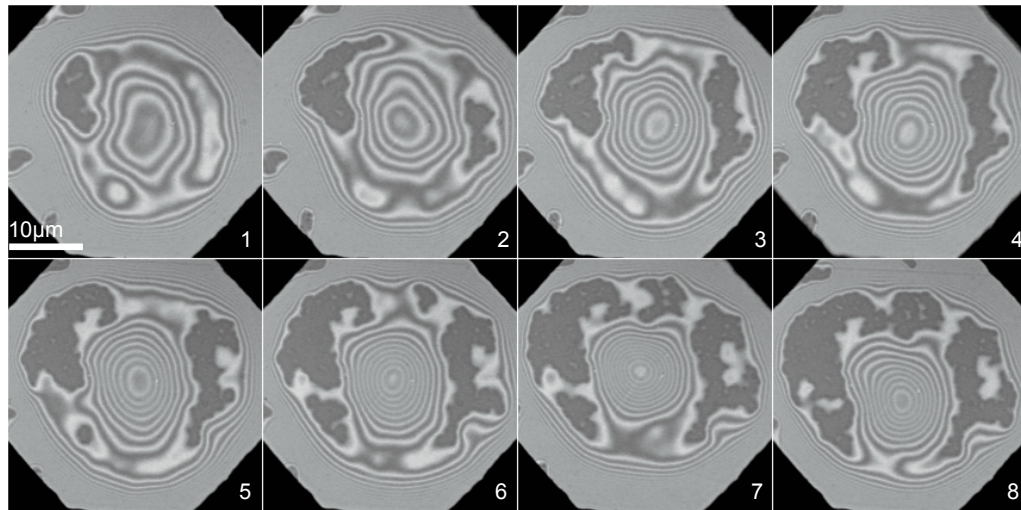


Abbildung 5.1: Entwicklung der Adhäsion bei der Verwendung langer Polymere. Es bilden sich mehrere Nukleationszentren, von denen aus die Adhäsionsfläche dendritisch anwächst. Der Zeitraum zwischen zwei Bildern beträgt 4 Minuten.

der Oberfläche auf die Struktur der Adhäsion wird in einem weiteren Abschnitt beleuchtet.

In einem zweiten Teil des Kapitels wird der Einfluss von Antagonisten auf den Bindungszustand eines Vesikels untersucht. Diese besetzen die freien Rezeptoren auf der Oberfläche reversibel und konkurrieren so mit den Liganden um Bindungsplätze. Dabei werden sowohl Moleküle niedriger Affinität (lösliches Sialyl-Lewis^X) als auch Antikörper mit großer Bindungsaffinität verwendet.

5.1 Experimente zur Adhäsionsdynamik

5.1.1 Einfluss der Systemzusammensetzung auf die globale Form des Flächenwachstums

Die Adhäsionsdynamik zeigt in den hier betrachteten Systemen mit langen Polymeren (PEG-2000 Lipopolymer) ein charakteristisches Verhalten, das grundsätzlich unabhängig von der sonstigen Zusammensetzung des Adhäsionssystems ist: Die Vesikel binden zunächst schwach an das Substrat und bilden dabei zumeist eine ringförmige Kontaktfläche aus, wie das erste Bild in Abbildung 5.1 zeigt. In dieser Fläche schwacher Adhäsion bilden sich zeitlich versetzt *mehrere* Nukleationszentren starker Adhäsion. Von diesen Zentren aus wächst die Adhäsionsfläche dendritenförmig an, d.h., es bildet sich eine unregelmäßige, stark gekrümmte Kontaktlinie. Zusätzlich wachsen die Adhäsionsflächen mit sehr unregelmäßiger Geschwindigkeit, auf schnelles Wachstum an einer Stelle kann ein zeitweiliger

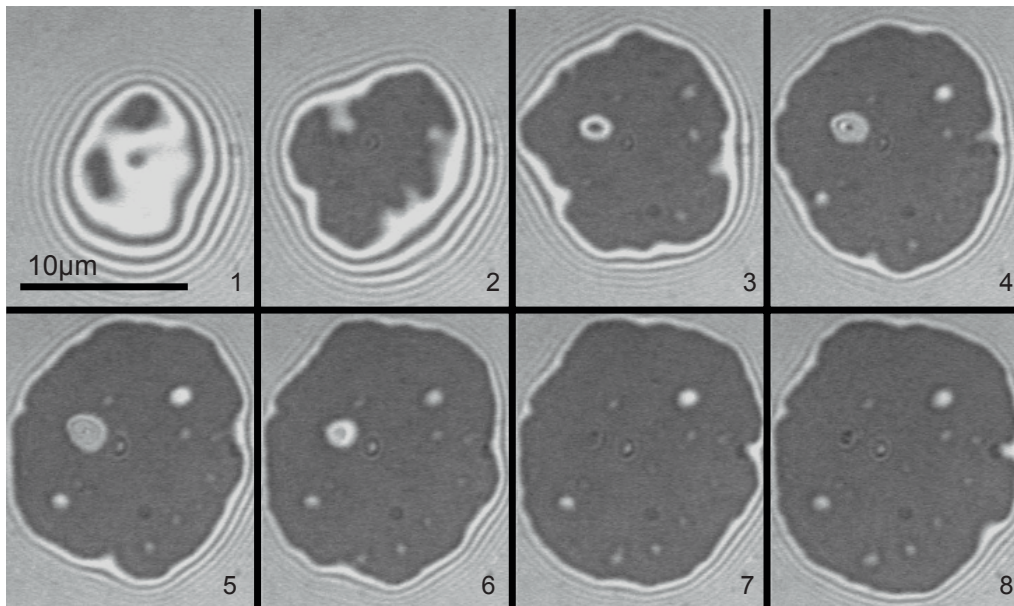


Abbildung 5.2: Entwicklung der Adhäsion bei der Verwendung kurzer Polymere. Von zwei getrennten Nukleationszentren ausgehend, wächst die Adhäsionsfläche gleichmäßig nach allen Seiten. Der Zeitraum zwischen zwei Bildern beträgt 50 Sekunden.

Stillstand und anschließend ein Anwachsen mit anderer Vorzugsrichtung folgen. Mit sinkender E-Selektindichte auf der Oberfläche wird die Kontaktlinie weiter aufgeraut und die sich bildende Adhäsionsfläche erscheint weniger homogen.

Völlig anders sieht das Wachstum einer Adhäsionsfläche in einem System mit kurzen Polymeren (PEG-750 Lipopolymere) und hoher E-Selektindichte aus (vgl. Abbildung 5.2). Dort breitet sich die Adhäsion von zwei gleichzeitig entstehenden Nukleationszentren ausgehend rasch und gleichmäßig nach allen Seiten aus und bildet eine relativ runde, homogene Adhäsionsfläche (vgl. Abbildung 5.2). Bei niedrigen E-Selektindichten ist auch hier das dendritische Wachstum aus mehreren Nukleationszentren zu beobachten, das in einer komplex strukturierten Adhäsionsfläche resultiert.

Sowohl das fingerartige Anwachsen der Adhäsionsfläche als auch die unregelmäßige Wachstumsgeschwindigkeit erschweren eine quantitative Analyse der Geschwindigkeit eines Punktes auf der Kontaktlinie, wie sie z.B. bei Guttenberg (2001) durchgeführt wurde; daher wird in den im folgenden dargestellten Experimenten außer der Angabe der Größe der Adhäsionsfläche eine qualitative Analyse des Wachstums durchgeführt.

In Abbildung 5.3 ist die Zeitabhängigkeit der Adhäsionsfläche während des Adhäsionsprozesses für verschiedene Systeme wiedergegeben. Im oberen Bildteil wird für das lange Polymer (PEG-2000) die E-Selektindichte variiert. Es ist klar zu erkennen, dass sich die Gleichgewichtsadhäsionsflächen (also der Sättigungs-

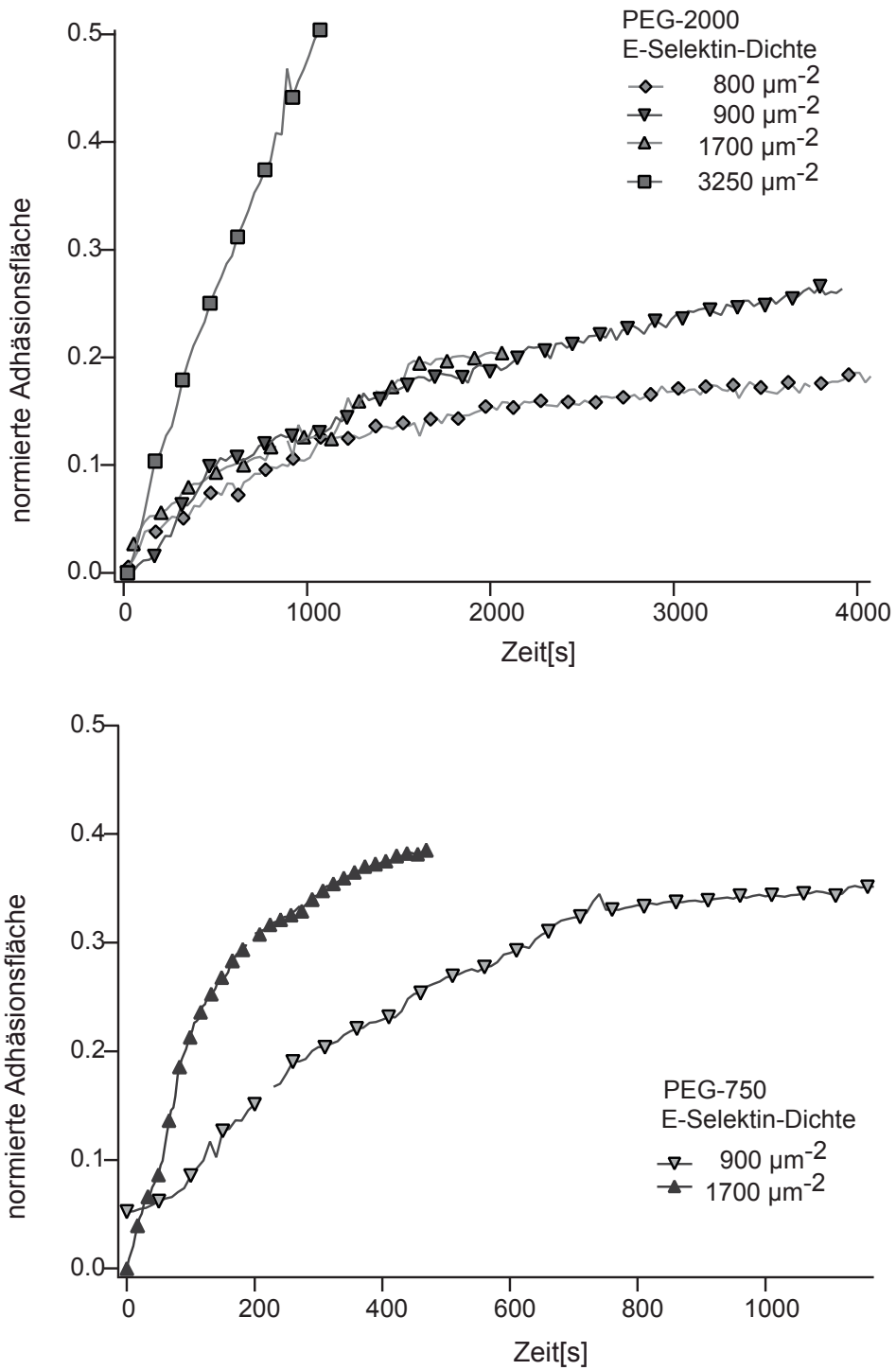


Abbildung 5.3: Zeitabhängige Entwicklung der Adhäsionsfläche. Es ist die Zunahme der Adhäsionsfläche (auf die Gesamtoberfläche normiert) für verschiedene E-Selektindichten aufgetragen. Im oberen Bildteil sind Adhäsionskurven für das längere Polymer PEG-2000 dargestellt, im unteren Teil für das kurze Polymer PEG-750.

wert der Adhäsionskurve) vergrößern, je größer die E-Selektindichte auf dem Substrat ist. Dies entspricht den in Kapitel 4 gewonnenen Erkenntnissen über die relative Größe der Adhäsionsfläche, die sich bei gleichbleibender Vesikelzusammensetzung durch Variation der E-Selektinkonzentration auf dem Substrat einstellen lässt.

Außerdem wird deutlich, dass die drei Adhäsionskurven für die Fälle mit niedrigerer E-Selektindichte anfänglich unabhängig von der genauen Dichte an Proteinen parallel verlaufen. Lediglich der Adhäsionsprozess für die höchste E-Selektindichte verläuft schneller als die übrigen. Es ist dabei zu beachten, dass im Diagramm normierte Flächen dargestellt sind, es ist der Anteil der Adhäsionsfläche an der Gesamtfläche angegeben, nicht die absolute Adhäsionsfläche. Damit ist der Begriff der Geschwindigkeit nicht direkt auf die Anzahl geschlossener Bindungen pro Zeiteinheit übertragbar, da die betrachteten Vesikel nicht gleich groß sind.

Im unteren Bildteil von Abbildung 5.3 sind Adhäsionskurven für Systeme mit kurzen Polymeren dargestellt. Hier wächst die Adhäsionsfläche für die höhere E-Selektindichte signifikant schneller als für die niedrigere Proteindichte. Ein direkter Vergleich der Experimente mit unterschiedlichen Polymerlängen ist nicht sinnvoll, da zwei verschiedene Proteinchargen verwendet werden, von denen diejenige, die für die kurzen Polymere verwendet wird, grundsätzlich zu höheren Adhäsionsgeschwindigkeiten führt als die andere.

Bei der Betrachtung der Adhäsionskurven ist vor allem auffällig, dass sich alle untersuchten Systeme qualitativ nicht voneinander unterscheiden. Die globale Form der Adhäsionskurve erfährt durch eine Änderung der Polymerlänge und der Proteindichte lediglich eine Modifikation in ihrem Sättigungsniveau bzw. der Adhäsionsgeschwindigkeit, nicht in ihrer Form, die durch eine einfache Wachstumskurve beschrieben wird. Ob dies auch für das Kurzzeitverhalten der Adhäsion gilt, soll in einem nächsten Schritt untersucht werden.

5.1.2 Einfluss der E-Selektindichte auf das Kurzzeitverhalten der Adhäsionsdynamik

Um aufzuklären, wie sich die Dynamik der Adhäsion ändert, wenn die Zusammensetzung des Systems geändert wird, wird das Kurzzeitverhalten der anwachsenden Adhäsionsfläche beobachtet. Dazu werden Flächen, die aus *einzelnen* Nukleationspunkten entstehen, vermessen. In den Abbildungen 5.4 und 5.5 sind die zeitlichen Entwicklungen dieser Flächen für verschiedene Proteindichten und gleichbleibende Vesikelzusammensetzung in Form von Messkurven und als Mikroskopiebilder dargestellt. Die Mikroskopiebilder unterhalb des Graphen gehören zu den durch Pfeile markierten Zeitpunkten (es ist zu beachten, dass die Zeitachsen in den Darstellungen nicht einheitlich sind). Die betrachteten Vesikel enthalten jeweils 15% sLe^X-GSL und 1% PEG-2000 Lipopolymer.

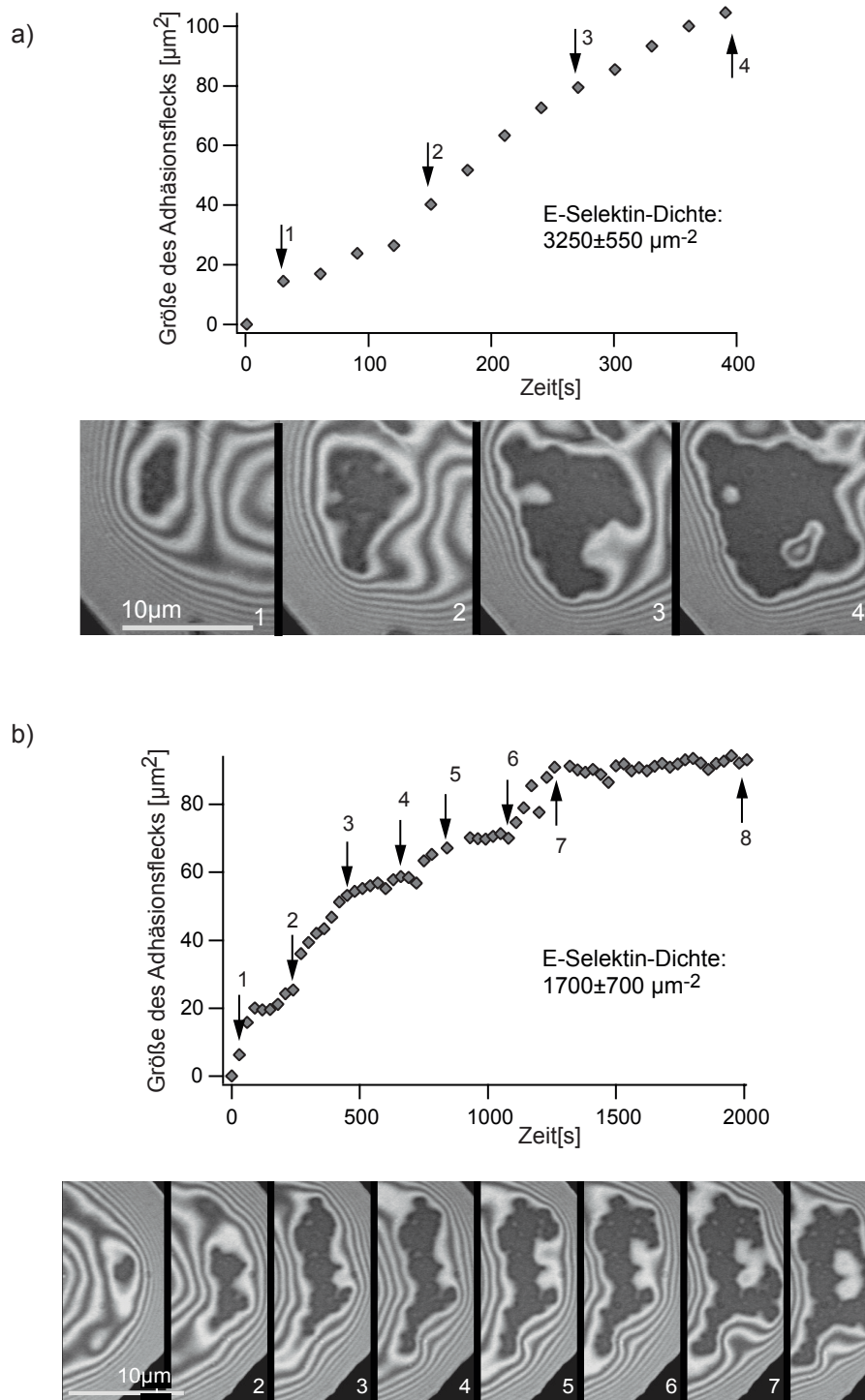


Abbildung 5.4: Flächenwachstum eines einzelnen Adhäsionsflecks. Ein Vesikel mit 15% sLe^X-GSL und 1% PEG2000-Lipopolymer adhärert auf einer Oberfläche mit einer E-Selektindichte von a) $3250 \mu\text{m}^{-2}$ und b) $1770 \mu\text{m}^{-2}$. Die Mikroskopiebilder gehören zu den durch Pfeile angezeigten Punkten.

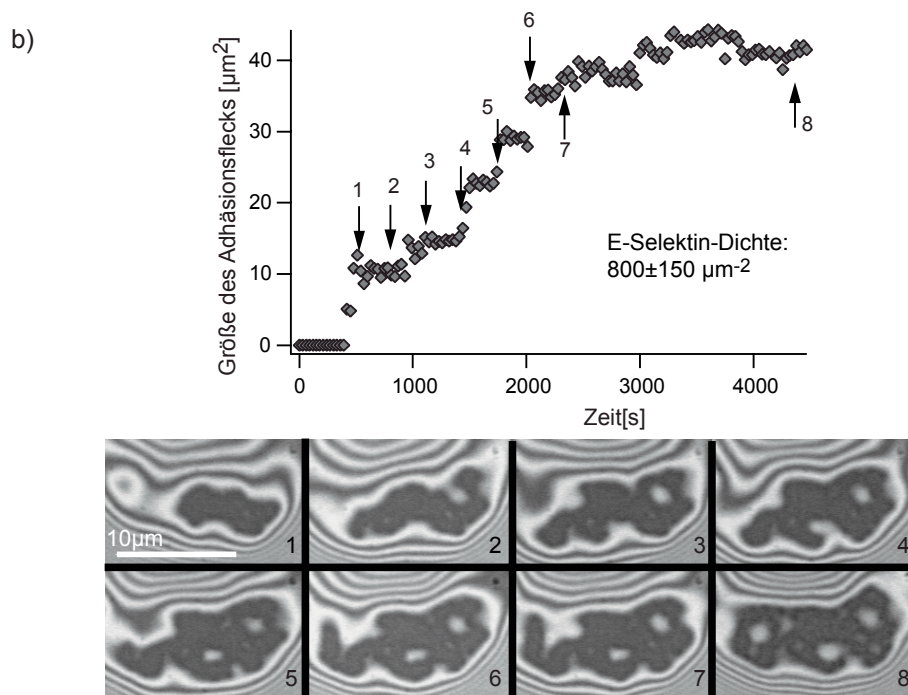
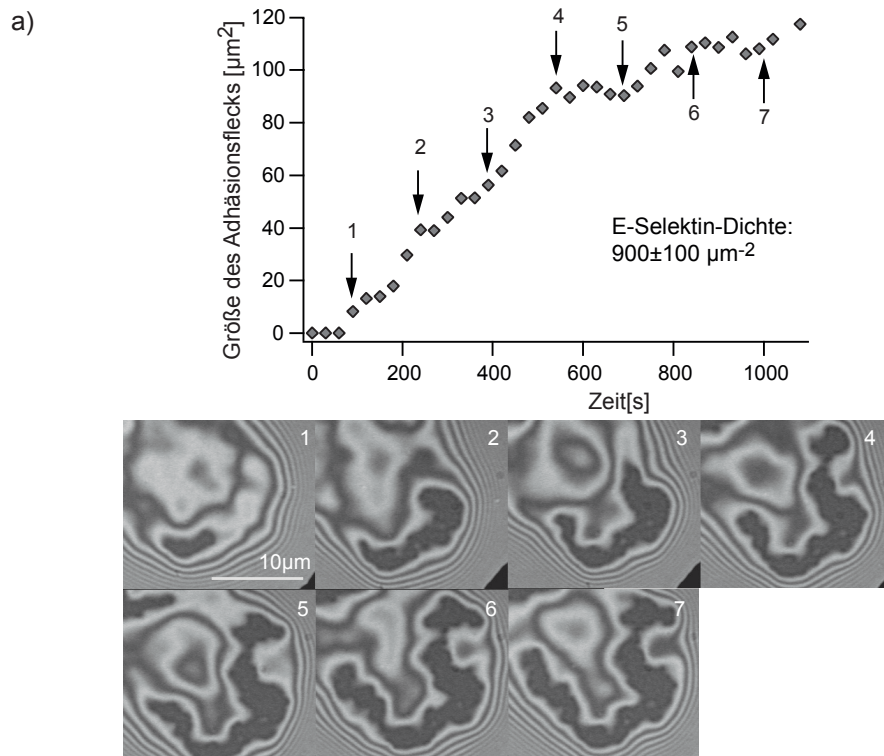


Abbildung 5.5: Gleiche Darstellung wie in Abbildung 5.4 mit einer E-Selektindichte von a) $900 \mu\text{m}^{-2}$ und b) $800 \mu\text{m}^{-2}$.

Abbildung 5.4a zeigt den Verlauf für die maximale E-Selektinkonzentration von $3250 \pm 550 \mu\text{m}^{-2}$. Die Adhäsionskurve verläuft glatt, die Mikroskopiebilder zeigen zwar eine mehrfach gekrümmte Kontaktlinie, die Adhäsionsfläche ist aber relativ homogen (dies ist an dem einheitlichen Grauwert in den Mikroskopiebildern abzulesen).

In Abbildung 5.4b ist die E-Selektindichte auf die Hälfte reduziert ($1700 \pm 700 \mu\text{m}^{-2}$). Die Flächenentwicklung im Diagramm zeigt einige Rauigkeiten, das Wachstum ist durch eine stark gekrümmte Kontaktlinie gekennzeichnet und die Adhäsionsfläche selbst ist weniger homogen als dies für die Maximalkonzentration an Proteinen auf der Oberfläche der Fall ist (es zeigen sich helle, nicht stark adhärierte Stellen innerhalb der Adhäsionsfläche).

Erniedrigt man die Proteindichte weiter, so wird, wie in Abbildung 5.5a zu erkennen ist, das Wachstum der Adhäsionsfläche noch ungleichmäßiger, es entstehen erste deutliche Stufen in der zeitabhängigen Darstellung. Diese Stufenform bedeutet, dass es Zeitintervalle gibt, in denen das Wachstum des Adhäsionsflecks völlig zum Erliegen kommt. Die Inhomogenität und die dendritische Form der Adhäsionsfläche sind deutlich zu erkennen.

Bei der niedrigsten beobachteten E-Selektindichte von $800 \pm 100 \mu\text{m}^{-2}$ wird das Wachstum der Adhäsionsfläche durch eine stufenförmige Kurve dargestellt. Während eines schnellen Adhäsionsschritts kann die Adhäsionsfläche um bis zu $10 \mu\text{m}^2$ wachsen, danach folgt eine Phase konstanter Fläche. Die Adhäsionsfläche ist sehr inhomogen, der Rand mäanderförmig.

Vor allem bei den niedrigen E-Selektindichten ist oft zu beobachten, dass sich die Vesikelmembran während des Adhäsionszustände mehrmals an das Substrat annähert und dann durch thermische Fluktuationen wieder entfernt, bis schließlich eine starke Bindung an das Substrat stattfindet.

Zum Vergleich wird die Adhäsionsdynamik für Vesikel derselben Zusammensetzung wie oben, allerdings nun mit kurzem Lipopolymer (PEG-750) betrachtet. Abbildung 5.6a zeigt die zeitabhängige Adhäsionsfläche eines Vesikels auf einer Oberfläche mit 1700 E-Selektinen pro μm^2 . Die Kurve verläuft völlig glatt und es entsteht, wie oben bereits beschrieben, eine runde, fast homogene Adhäsionsfläche. Erniedrigt man die E-Selektindichte auf $900 \mu\text{m}^{-2}$ (vgl. Abbildung 5.6b), so ist zwar wiederum ein dendritisches Wachstum zu erkennen, die Kurve ist aber trotzdem weit weniger rau als die vergleichbare Darstellung für das lange Polymer.

5.2 Ablösen der Vesikel durch Verschiebung des chemischen Potentials

Eine weitere Möglichkeit, die Adhäsionseigenschaften eines Systems zu verändern, bietet die Verschiebung des chemischen Gleichgewichts durch die Zugabe von

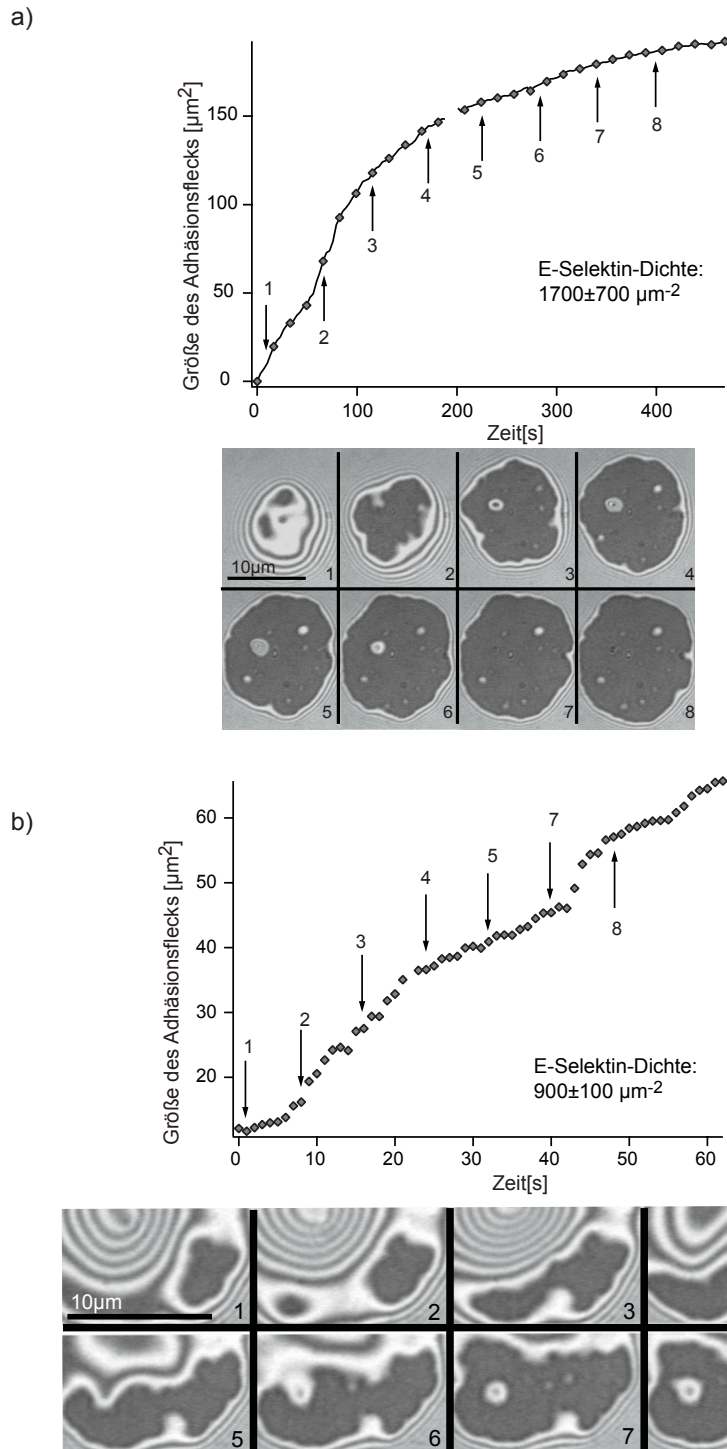


Abbildung 5.6: Gleiche Darstellung wie in Abbildung 5.4, allerdings mit kurzen Lipopolymeren (PEG-750) mit einer E-Selektindichte von a) $1700 \mu\text{m}^{-2}$ und b) $900 \mu\text{m}^{-2}$.

Antagonisten. Die hier verwendeten Moleküle besetzen die Bindungsstelle des E-Selektins reversibel und mit unterschiedlichen Affinitäten. Durch diese kompetitive Inhibition wird die Anzahl der für die Vesikeladhäsion zur Verfügung stehenden Rezeptoren je nach Antagonist in unterschiedlichem Maße verringert und damit die Gleichgewichtskonstante der Reaktion verändert (vgl. Kapitel 6). Im folgenden sollen die Auswirkungen zweier verschiedener Antagonisten auf das Adhäsionssystem untersucht werden:

5.2.1 Verwendung von löslichem Sialyl-Lewis^X als Antagonist

Lösliches Sialyl-Lewis^X hat ebenso wie das membrangebundene Oligosaccharid eine relativ geringe Bindungsaffinität zu E-Selektin ($K_D \approx 10^{-4}M$). Im Experiment werden jeweils 50 μ l einer Lösung mit 1,2nmol/ml löslichem Sialyl-Lewis^X in die Probenkammer pipettiert. Obwohl der Vorgang mehrfach wiederholt wird (vgl. Abbildung 5.7), kann keine Verkleinerung der Adhäsionsfläche beobachtet werden. Einmal wird der Vesikel durch die Störung beim Zugeben des Saccharids vom Substrat abgerissen (vgl. Bild 8 in Abbildung 5.7), er adhärert aber sofort wieder vollständig. Mit einem Antagonisten niedriger Affinität ist es also nicht möglich, die Vesikeladhäsion merklich zu beeinflussen.

5.2.2 Verwendung von Anti-E-Selektin als Antagonist

In Abbildung 5.8 ist die Auswirkung einer Zugabe von Anti-E-Selektin in die Probenkammer dargestellt. Antikörper haben im Vergleich zu dem vorher verwendeten löslichen Oligosaccharid zu ihren spezifischen Antigenen eine hohe Bindungsaffinität ($K_D < 10^{-5}M$, Alberts et al. 2002). Es werden dreimal je 50 μ l einer Lösung mit 5 μ g/100 μ l Antikörper zutitriert. Dies ergibt eine Arbeitskonzentration in der Größenordnung von 5 μ g/ml, die aus der Literatur als geeignet für die durchgeführten Experimente bekannt ist (z.B. Hansen et al. 1995). Sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Zugabe von Antikörper verkleinert sich die Adhäsionsfläche ein wenig, stabilisiert sich aber auf einem neuen Niveau. Wird die Konzentration an Antikörper weiter erhöht, so löst sich der Vesikel langsam vollständig von der Oberfläche ab. Dabei baut der Vesikel seine, durch das Ablösen vom Substrat gewonnene Überschussfläche durch die Abschnürung kleiner Vesikel (engl.: buds, vgl. Kapitel 6) ab. Mit einem Antagonisten hoher Affinität kann sowohl die Größe der Adhäsionsfläche verändert, als auch ein Vesikel vollständig vom Substrat abgelöst werden.

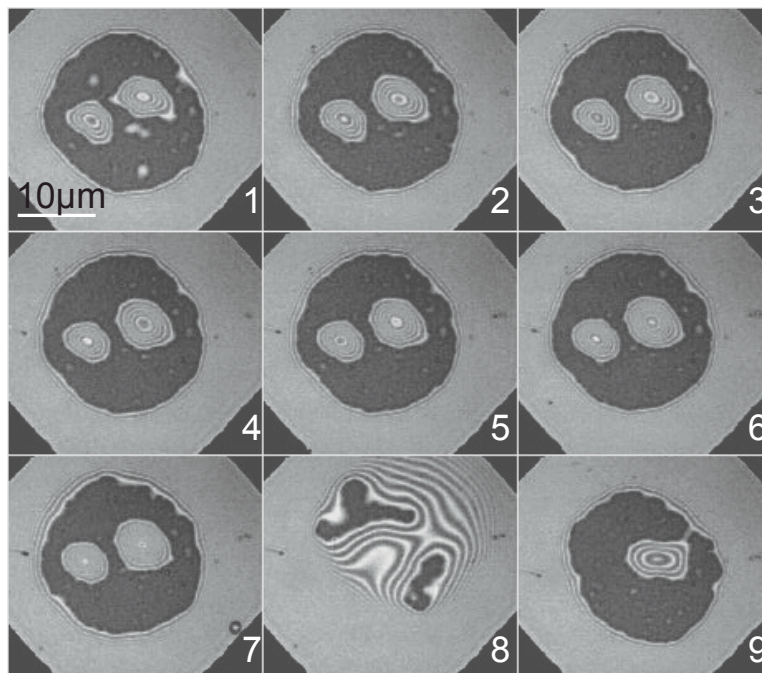
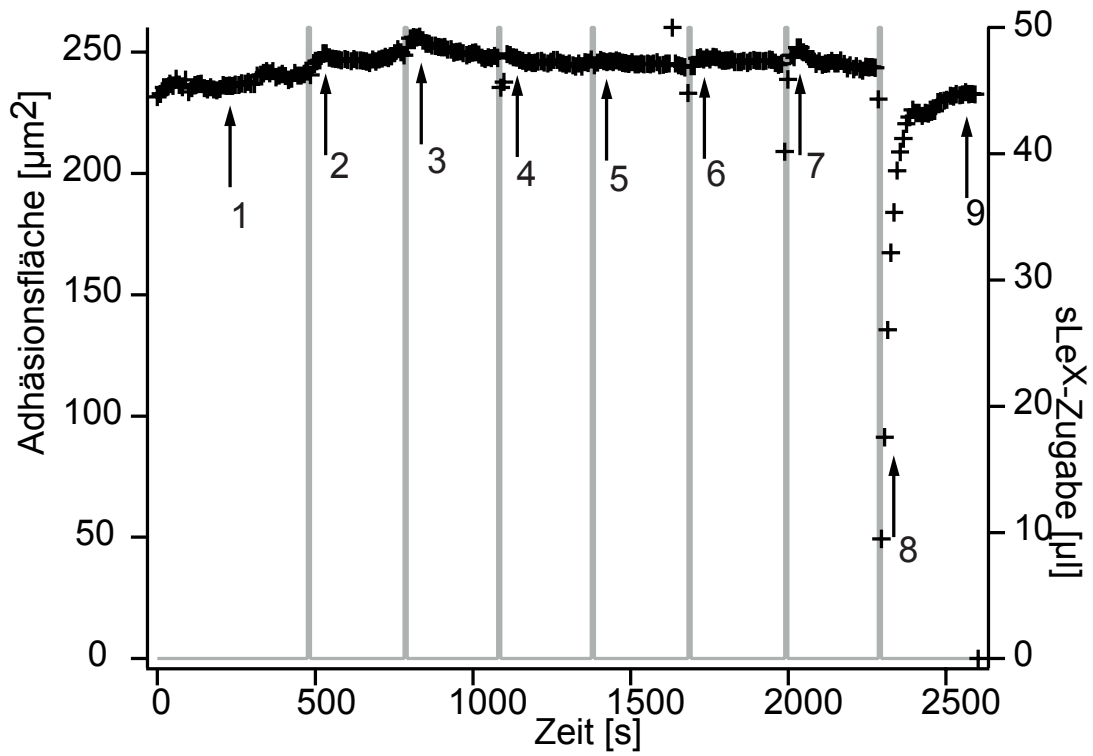


Abbildung 5.7: Titration von löslichem Sialyl-Lewis^X. Es ist kein Einfluss auf die Größe der Adhäsionsfläche festzustellen. Bei Bild 8 wird der Vesikel durch die Zugabe des Antagonisten abgerissen, er adhärirt aber sofort wieder.

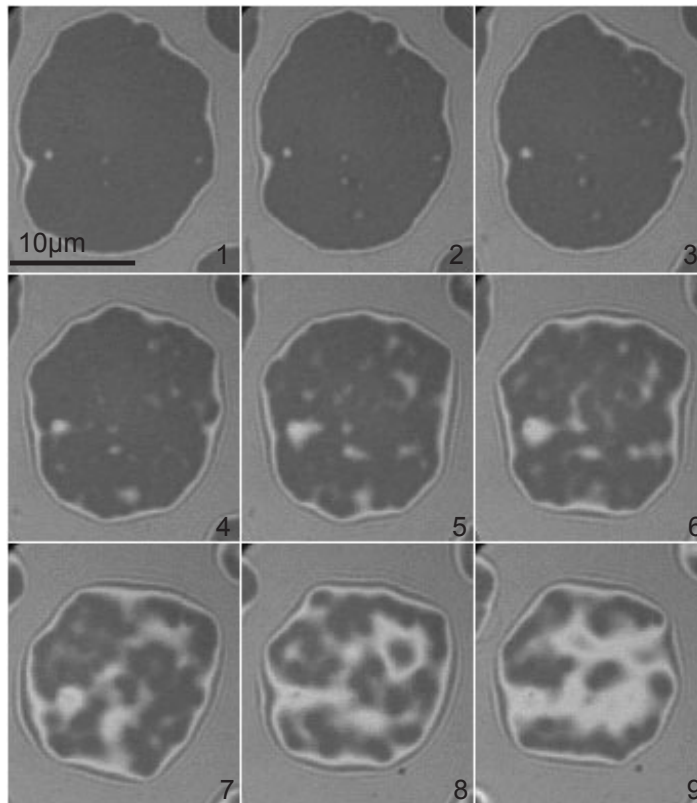
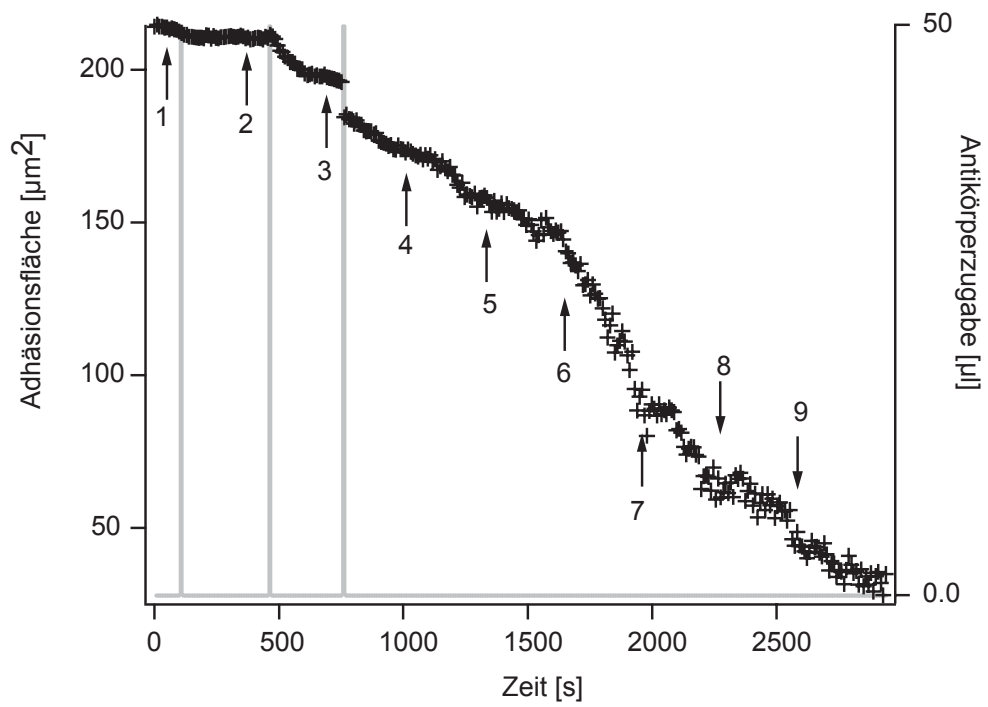


Abbildung 5.8: Titration von Anti-E-Selektin. Bereits bei der ersten Zugabe des Antikörpers verringert sich die Adhäsionsfläche. Wird genügend Antikörper zugegeben, so löst sich der Vesikel vollständig vom Substrat ab.

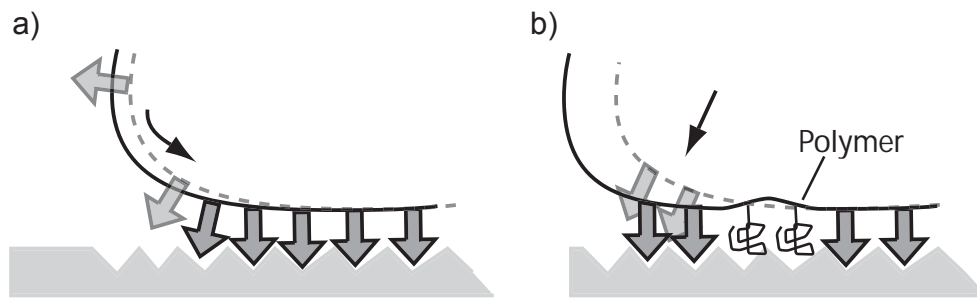


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung zweier möglicher Bindungsmechanismen: a) neue Rezeptor-Ligand-Paare bilden sich direkt an der Kontaktlinie durch herandiffundierende Liganden. b) Nukleationszentren aus mehreren Rezeptor-Ligand-Paaren bilden sich vor der Kontaktlinie durch Clusterbildung.

5.3 Diskussion

Die Adhäsionsdynamik ist im untersuchten Adhäsionssystem weitaus komplexer, als dies in einem Modellsystem mit größerer Bindungsaffinität der Fall ist (Guttenberg 2001). So bilden sich hier in den seltensten Fällen gleichmäßig voranschreitende Kontaktlinien aus, die es ermöglichen, die Geschwindigkeit des Adhäsionsprozesses abzuschätzen. Stattdessen wächst die Adhäsionsfläche dendritisch und mit spontanen Richtungsänderungen mit variabler Geschwindigkeit an. Qualitativ können jedoch einige interessante Eigenschaften des Adhäsionssystems beschrieben werden.

Einfluss der E-Selektindichte

Verringert man bei gleichbleibender Vesikelzusammensetzung die Proteindichte auf dem Substrat, so wird die Adhäsionsdynamik einzelner Flächen aufgeraut, d.h., die Wachstumsgeschwindigkeit der Adhäsionsfläche wird ungleichmäßiger (vgl. Abbildungen 5.4 und 5.5). Gleichzeitig wird die Adhäsionsfläche inhomogener, d.h., es entstehen kleine Flächen schwacher Adhäsion innerhalb der Adhäsionsfläche. Die Kontaktlinie wird bei geringer werdender Proteindichte stärker gekrümmt und verläuft in Mäandern.

All dies spricht dafür, dass die Vesikel zumindest zum Teil über die Bildung von Nukleationszentren aus mehreren Rezeptor-Ligand-Paaren vor der Kontaktlinie adhären, nicht über das diffusive Anbinden einzelner Rezeptoren an der Kontaktlinie (vgl. schematische Abbildung 5.9). Das würde unter anderem erklären, warum die Adhäsionskinetik bei niedriger Proteindichte sprunghaft verläuft: die Stellen für mögliche Nukleationszentren sind dann weniger dicht als bei hoher Belegungsichte und liegen weiter weg von der Kontaktlinie. Leider konnte die genaue Struktur der E-Selektinoberfläche bisher nicht ermittelt werden. Ein Experiment, in dem mögliche Clusterbildungen des Proteins über-

prüft werden, könnte hier mehr Klarheit schaffen (z.B. Elektronenmikroskopie mit goldmarkierten Anti-E-Selektinen, vgl. Kloboucek (1998)).

Für diese Interpretation des Wachstums durch Nukleationspunkte außerhalb der Adhäsionsfläche spricht auch die Beobachtung, dass die Membran oft mehrmals in Kontakt mit dem Substrat kommt, ohne zu binden, bis eine Adhäsion stattfindet. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass zur Bildung eines Nukleationspunkts, der stark genug ist, um thermische Undulationen unterdrücken zu können, mehrere Rezeptoren gleichzeitig binden müssen (Polyvalenz, vgl. z.B. Mammen et al. 1998). Dazu ist eine laterale Entmischung der Vesikelmembran notwendig. Nur durch Entmischung können sich bei den gegebenen Konzentrationen mehrere Adhäsionsmoleküle in sehr kleinem Abstand voneinander befinden, um dann einen neuen Nukleationspunkt der Adhäsion bilden. Eine Studie zur dynamischen Entmischung mehrkomponentiger Membranen, die diesen Ansatz bekräftigt, ist von Marx et al. (2002) publiziert worden. Dort wird berichtet, dass sich Lipopolymere in einer über einem Substrat fluktuierenden Membran vorzugsweise in Regionen aufhalten, die weiter weg vom Substrat gelegen sind. Cholesterol – und möglicherweise auch Liganden – dagegen sind in Teilen der Membran zu finden, die nahe an Substrat gelegen sind.

Die spontane Bildung von Nukleationspunkten und die Reversibilität der Bindung für einzelne kleine Adhäsionspunkte deutet darauf hin, dass es sich beim Übergang von der schwachen zur starken Adhäsion um einen aktivierten Prozess erster Ordnung handelt. Damit wird die von Bruinsma et al. (2000) geforderte und in Kapitel 4 diskutierte Doppelminimumstruktur des Wechselwirkungspotentials durch die hier gewonnenen Erkenntnisse bestätigt.

Einfluss der Polymerlänge

Die Länge der verwendeten Polymere ist für die Bindungsdynamik von entscheidender Bedeutung. Sie spielt sowohl für die Nukleation als auch in der Wachstumsphase eine wichtige Rolle. Verwendet man Polymere, deren Schichtdicke der Länge der Liganden entspricht, so müssen die Polymere bei der spezifischen Adhäsion der Liganden an ein Substrat entweder stark zusammengedrückt, oder vollständig verdrängt werden. Dadurch wird die Adhäsion erschwert, bzw. verlangsamt. Wird das lange Polymer durch ein Polymer der halben Schichtdicke ersetzt, so ändert sich, zumindest bei ausreichend großer Proteindichte, die Charakteristik der Adhäsion (vgl. Abbildung 5.6). Es gibt dann nur noch einen Nukleationspunkt, von dem aus die Adhäsionsfläche gleichmäßig in alle Richtungen anwächst. Das Wachstum der Adhäsionsfläche (A) lässt sich dabei durch über einen Zeitraum von mehreren 100 Sekunden durch ein $t^{1/3}$ -Gesetz beschreiben. Der Wert ist signifikant kleiner als der Exponent bei der klassischen Ostwald-Reifung ($A \propto t^{2/3}$) (Yao et al. 1993).

Dieses Verhalten zeigt, dass bei der Verwendung kurzer Polymere der Ligand wesentlich leichter zugänglich ist und die Adhäsion weniger stark behindert wird

als durch das längere Polymer. Bei einer Verringerung der Proteinkonzentration auf der Oberfläche ist zwar auch hier ein dendritisches Wachstum zu beobachten, allerdings ist die Kontaktlinie weit weniger gekrümmt als im vergleichbaren Fall mit längerem Polymer.

Es besteht also nicht nur die Möglichkeit, die Dynamik und die resultierende Adhäsionsstärke über die *Konzentration* der Repellermoleküle zu steuern, sondern auch die *Länge* der Polymere ermöglicht eine sensitive Regulation des Adhäsionszustände.

Der Einfluss von Antagonisten

In Lösung ist der Prozess der kompetitiven Inhibition gut verstanden und charakterisiert (vgl. Voet & Voet 1995). Es lassen sich dort bei bekannter Konzentration der beteiligten Moleküle die kinetischen Konstanten und ihre Auswirkungen auf das Bindungsgleichgewicht bestimmen. Im hier betrachteten Fall der Vesikeladhäsion gestaltet sich die Situation etwas schwieriger: die Liganden, die mit den Antagonisten um Bindungsplätze an den Rezeptoren konkurrieren, bewegen sich in zwei Dimensionen in der Vesikelmembran, während die Antagonisten in der Lösung dreidimensionale Diffusion zeigen. Außerdem sind Bindungen innerhalb der Adhäsionsfläche für Antagonisten nur schwer oder gar nicht zu erreichen, da sie durch den Spalt zwischen Vesikelmembran und Substrat diffundieren müssen, um dort Bindungen einzugehen. Die Gravitation stabilisiert die Adhäsionsfläche zusätzlich, da sie die Vesikelmembran und damit die Liganden in der Nähe der Rezeptoren hält. Wie stabil die Vesikeladhäsion ist, zeigt sich eindrucksvoll, wenn ein Antagonist derselben Affinität wie der Ligand zugegeben wird (vgl. Abbildung 5.7). Es ist auch bei hohen Konzentrationen des löslichen Sialyl-Lewis^X-Moleküls nicht möglich, die Adhäsionsfläche zu verkleinern oder dauerhaft abzulösen. Selbst wenn der Vesikel durch eine äußere Störung vom Substrat gelöst wird, adhärert er wieder vollständig und verdrängt den Antagonisten.

Verwendet man Antikörper gegen das E-Selektin auf dem Substrat, so kann man mit einer geringen Konzentration die Adhäsionsfläche gezielt verkleinern. Die Relaxation in ein neues Gleichgewicht kann dabei durch eine Exponentialfunktion $A(t) = A_0 + A_1 \exp\{-t/\tau\}$ beschrieben werden (vgl. Abbildung 5.10). Bei der ersten Zugabe sinkt die Größe der Adhäsionsfläche auf 99% ihres Anfangswerts, bei der zweiten Antikörperzugabe um weitere 7%. Für eine systematische Analyse, die möglicherweise die entstehende Größe der Adhäsionsfläche A_1 und die Relaxationszeit τ mit den kinetischen Parametern der kompetitiven Hemmung in Lösung in Verbindung bringen könnte, fehlen bisher ausreichende Datenmengen. Eine höhere Konzentration von Antikörpern im System führt zu einem vollständigen Ablösen des Vesikels. Die genaue Beschreibung der zeitabhängigen Adhäsionsfläche ist dabei schwierig, da der Vesikel seine Überschussfläche, die er durch das Ablösen vom Substrat gewinnt, immer wieder abbaut. Dazu werden Abschnürungen gebildet, die sich als kleine Vesikel im Inneren des Vesikels

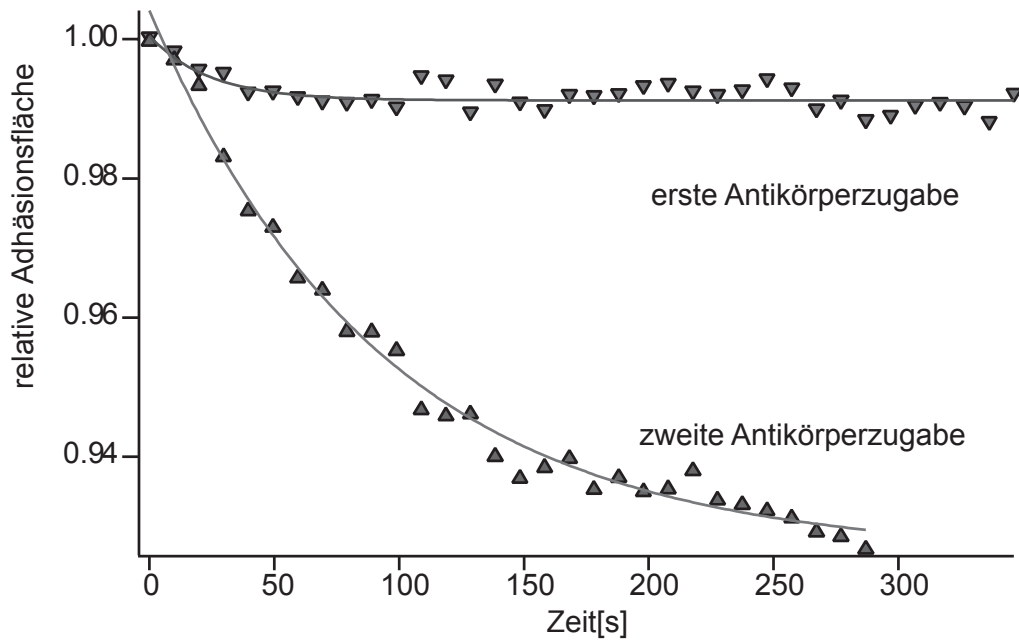


Abbildung 5.10: Relaxation der Adhäsionsfläche in ein neues Gleichgewicht nach der Zugabe von Antikörpern. Die Relaxation kann durch eine Exponentialfunktion gut beschrieben werden (durchgezogene Linien).

und um den Vesikel herum ablagern. Dadurch ändert sich die Zeitabhängigkeit des Übergangs fortwährend (vgl. Knicke in Abbildung 5.8). Der Vesikel behält während des Entbindungsübergangs also weder sein Volumen noch seine Fläche bei, was eine theoretische Beschreibung stark erschwert.

Insgesamt fehlen sowohl für den Adhäsions- als auch für den Entbindungsübergang ausreichende theoretische Modelle, die Vielzahl der beobachteten Phänomene könnte aber eine Grundlage für weitere Schritte sowohl in experimenteller als auch in theoretischer Richtung sein.

Kapitel 6

Störung des Systems durch eine Punktkraft — die magnetische Pinzette

6.1 Einführung

Zellen müssen, um überleben und in einem Netzwerk funktionieren zu können, auf mechanische Störungen angemessen reagieren können, was auch bedeuten kann, aktiv auf andere Zellen oder Zellteile einwirken zu können. Die enorme biologische Bedeutung dieser Fähigkeit wird zum Beispiel deutlich, wenn man sich einige Hauptbestandteile des Blutes genauer betrachtet: So werden Erythrozyten beim Durchgang durch Kapillare extrem mechanisch verformt, da ihr Durchmesser größer ist als der Kapillardurchmesser der Gefäße, in denen der Gasaustausch stattfindet. Nachdem sie die Kapillare passiert haben, erhalten die Erythrozyten in den Venen ihre ursprüngliche Form zurück. Thrombozyten bilden bei der Gerinnung zusammen mit Fibrinogen ein stabiles Netzwerk, dabei verformen sie sich aktiv und halten außerdem den Scherkräften des Blutstromes stand (Horwitz 1998). Das bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschriebene Beispiel des rollenden Leukozyten ist wohl das beeindruckendste in dieser Reihe, da hier sowohl Adhäsion kontrollierter Stärke, als auch aktive Verformung eines Systems zu beobachten ist (Alberts et al. 2002).

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Reaktion eines Modell-Adhäsionssystems auf eine Störung des Gleichgewichts durch eine von außen angelegte Punktkraft definierter Stärke. Mittels solcher Kräfte wird versucht, genauere Einblicke in die Bindungsmechanismen biologischer Systeme zu erlangen und Kriterien für die Stabilität und Dynamik von Bindungen aufzustellen.

Es werden dazu in der Biophysik unterschiedlichste Methoden verwendet (Überblicksartikel: Merkel 2001), zum Beispiel der von Israelachvili bereits um 1970 entwickelte Oberflächen-Kraft-Apparat (*surface force apparatus*;

Israelachvili 1991). Mit diesem können sowohl variable Scherkräfte parallel zu einer funktionalisierten Oberfläche eines Objekts, als auch Zugkräfte senkrecht dazu ausgeübt werden. Das Kraftmikroskop (AFM, Binnig et al. 1986), mit dem Einzelbindungen untersucht werden und die Mikropipettentechnik (Evans & Ritchie 1997), die sowohl für Experimente an Bindungsensembles (Pechtel et al. 2002), als auch an Einzelmolekülbindungen (Nguyen-Duong 2002) geeignet ist, stellen weitere Untersuchungsmöglichkeiten mithilfe externer Kräfte dar. Auf die Verwendung einer Flusskammer, in der ein laminares, planparalleles Scherfeld erzeugt wird, um Zellen oder Vesikel von einer Oberfläche abzulösen, wird in Kapitel 7 noch genauer eingegangen.

Einen anderen Zugang als die oben beschriebenen Möglichkeiten der direkten mechanischen Kraftübertragung bietet die kolloidale Sondentechnik, bei der kleine, funktionalisierte Kugeln in die Probe gebracht und berührungsfrei manipuliert werden. Als Kraftfelder werden dabei entweder der Impuls des Lichts (optische Pinzette: Ashkin 1997) oder das Gradientenfeld eines Elektromagneten verwendet (Heilbronn 1922, Valberg & Butler 1987).

Die Methode der magnetischen Pinzette wurde am Lehrstuhl durch Ziemann (1997) eingeführt. Sie dient hauptsächlich zur Bestimmung viskoelastischer Eigenschaften von Netzwerken und Zellen durch das Ausüben einer meist oszillierenden Kraft in horizontaler Richtung parallel zur Beobachtungsebene (vgl. z.B. Schmidt et al. 2000, Feneberg et al. 2001).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit als vertikal ausgelenkte Sonde ist zum ersten Mal bei Guttenberg et al. (2000) und ausführlich bei Gönnerwein (2003) beschrieben. Diese Technik wird im folgenden dazu verwendet, adhärierte Vesikel reversibel vom Substrat abzuziehen und sowohl die Kinetik als auch den Grad dieser Ablösung zu untersuchen.

6.2 Theoretische Grundlagen

In Kapitel 4 wurden die einzelnen Beiträge diskutiert, die aufgrund ihrer charakteristischen Zusammensetzung für das Zustandekommen und die Reversibilität einer spezifischen Rezeptor-Ligand-Bindung verantwortlich sind. Die Lebensdauer einer solchen Bindung hängt dabei stark von der Bindungsaffinität der beteiligten Moleküle ab (Alberts et al. 2002). Betrachtet man die freie Enthalpie eines Rezeptor-Ligand-Paares entlang eines möglichen Reaktionspfades, so ist der gebundene Zustand vom dissoziierten Zustand durch einen Potentialwall der Höhe ΔG^* getrennt, wie schematisch in Abbildung 6.1 skizziert ist. Die Reaktionsgleichung für ein solches System aus Rezeptor (R) und Ligand (L) hat die Form



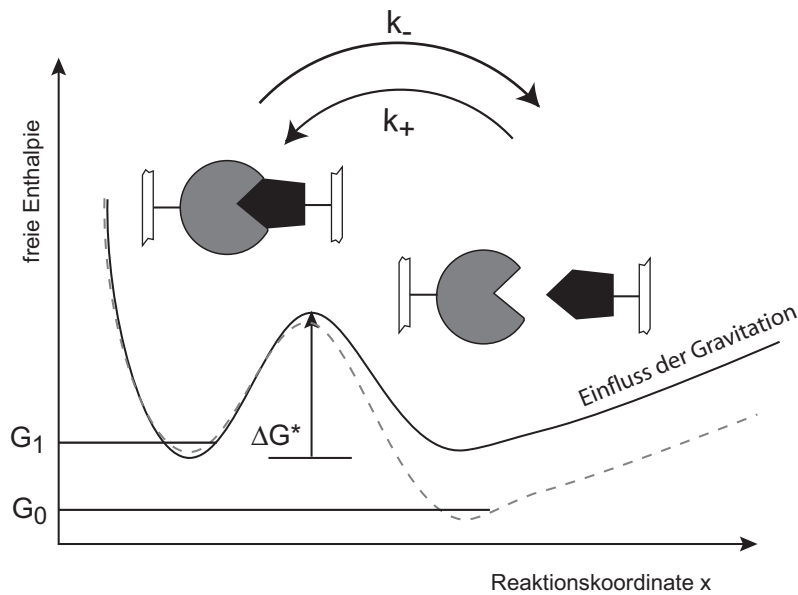


Abbildung 6.1: Darstellung eines möglichen Reaktionspfads einer spezifischen Bindung: der gebundenen und der freie Zustand sind durch einen Potentialwall getrennt (durchgezogene Linie). Das Anlegen einer externen Kraft führt zur Erniedrigung der Aktivierungsenergie ΔG^* (gestrichelte Linie).

wobei im Gleichgewicht ebenso viele Bindungen pro Zeiteinheit assoziieren (k_+) wie dissoziieren (k_-). Die Gleichgewichtskonstante $K = k_+/k_-$ verknüpft dabei die beiden kinetischen Parameter und stellt ein Maß für die Bindungsaffinität dar. Die für die Experimente mit der magnetischen Pinzette relevante Reaktionskonstante für die Dissoziation k_- ist durch die Höhe des Potentialwalls ΔG^* und die Temperatur T festgelegt:

$$k_- \propto \exp \left\{ -\frac{\Delta G^*}{k_B T} \right\} \quad (6.2)$$

Bei einer Einzelbindung wird die freie Enthalpie durch das Anlegen einer externen Kraft entlang der Reaktionskoordinate x um einen Beitrag $-fx$ verringert (dies ergibt die gestrichelte Linie in Abbildung 6.1) und dadurch die Wahrscheinlichkeit, dass eine Bindung dissoziiert, erhöht. Im Falle einer Einzelbindung ist die Dissoziation stark von der Krafrate df/dt abhängig, da sich hier die Wahrscheinlichkeiten der spontanen und der kraftinduzierten Dissoziation konstruktiv überlagern. Dadurch erfolgt bei kleinen Krafraten schon bei niedrigeren Kräften ein Bindungsbruch als bei hohen Krafraten (vgl. z.B. Nguyen-Duong 2002).

Bindungsensembles sind weitaus schwieriger zu beschreiben, da hier das kooperative Zusammenwirken vieler Einzelbindungen betrachtet werden muss. So können gelöste Bindungen wieder geschlossen werden, solange die beiden Zelloberflächen durch andere Bindungen in Kontakt gehalten werden. Zusätzlich

sind die chemischen Potentiale der Adhäsions- und Repellermoleküle im System und osmotische Druckunterschiede zwischen Kontaktzone und freier (Modell-)Zelle nicht zu vernachlässigende Faktoren bei der Beschreibung von Ensemblebindungen (Bruinsma et al. 2000). In Mikropipettenexperimenten an Endothelzellen und Modellmembranen (Prechtel et al. 2002) wurde ein Entbindungsverhalten beschrieben, das qualitativ demjenigen von Einzelbindungen ähnlich ist: die Ablösung erfolgt ratenabhängig, aber nicht logarithmisch, wie dies für Einzelbindungen der Fall ist, sondern über ein Potenzgesetz.

Lokales Modell

Die Auswirkungen einer externen Kraft auf das Verhalten einer adhärenierten Zelle mit vielen Rezeptor-Ligand-Paaren werden bereits im Modell von Bell (1978) theoretisch diskutiert. Dort werden nur Bindungen von innerhalb der Membran mobilen, korrespondierenden Rezeptoren (R) und Liganden (L) auf zwei Oberflächen, die sich im Bindungsabstand zueinander befinden, betrachtet. Alle anderen Wechselwirkungen werden vernachlässigt. Die Reaktionskonstanten k_+ und k_- der Gleichgewichtsreaktion (Gleichung (6.1)) werden aus den Werten für die Reaktion in Lösung abgeleitet. Eine externe Kraft, die auf die Bindungen wirkt, führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zum ungebundenen Zustand hin. Dies drückt sich in einer Vergrößerung der Reaktionsrate der Dissoziation k_- aus:

$$k_-(F) = k_-(0) \exp \left\{ \frac{\gamma F}{k_B T N_b} \right\} \quad (6.3)$$

Dabei ist γ ein empirischer Parameter, der der Oberflächenstruktur und ihren Fehlern Rechnung trägt, und N_B ist die Anzahl der gebundenen Rezeptor-Ligandpaare zwischen den beiden Zelloberflächen. Wenn die angelegte Kraft klein genug ist, so führt sie in diesem Modell zu einem neuen Gleichgewichtszustand und nicht zu einem vollständigen Ablösen der Zellen. Liegt die externe Kraft über einer kritischen Kraft, so ist ein Ablösen der Zellen möglich.

Globales Modell

Ein globales Modell zur Beschreibung einer externen Punktkraft, die auf einen adhärenierten Vesikel wirkt, ist von Ana Smith et al. (2003) publiziert worden. Dort wird, ausgehend von dem Modell von Seifert & Lipowsky (1990) die freie Energie eines adhärenierten Vesikels um den Beitrag einer Punktkraft ergänzt, die senkrecht zur Oberfläche nach oben zieht. Es ergibt sich damit der folgende Ausdruck für die freie Energie F :

$$\begin{aligned} F &= \frac{\kappa}{2} \oint (C_1 + C_2)^2 dA + \frac{\kappa_G}{2} \oint C_1 \cdot C_2 dA + \\ &+ P \int dV + \Sigma \oint dA - W A^* - f (Z^0 - Z(0)) \end{aligned} \quad (6.4)$$

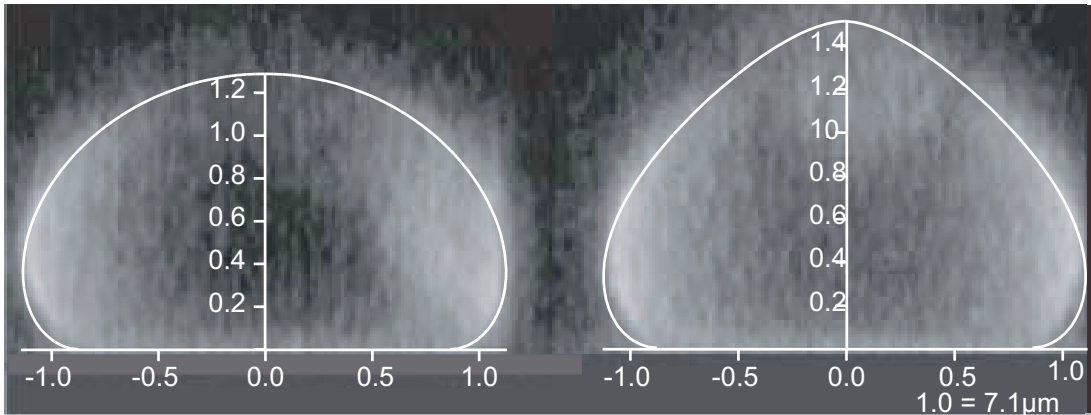


Abbildung 6.2: Vergleich experimenteller Daten mit der globalen Theorie: konfokale Mikroskopiebilder werden mit Trajektorien überlagert, die zu den gleichen Anfangsbedingungen gehören. Eine gute Übereinstimmung ist zu erkennen.

Die beiden ersten Terme in Gleichung (6.4) beschreiben die Krümmung des Vesikels und hängen von den Hauptkrümmungsradien C_1 und C_2 und von der Biegesteifigkeit κ der Membran ab. Die Gaußsche Krümmung wird in diesem Modell als konstant vorausgesetzt, da die Topologie des Systems als sphärisch angenommen wird. Ebenso werden Asymmetrien der beiden Membranhälften ausgeschlossen. Der dritte und vierte Term ergeben sich aus der Erhaltung der Oberfläche bzw. des Volumens des Vesikels. Abhängig davon, ob das Volumen oder die Differenz des osmotischen Drucks während des Ziehens konstant gehalten wird, ist entweder P ein Lagrange-Multiplikator ($V = \text{const}$) oder das Volumen V muss sich bei konstantem osmotischen Druck P während eines Kraftimpulses ändern. Dieselben Relationen gelten auch für den Lagrange-Multiplikator der Spannung Σ und die Oberfläche A . Der fünfte Term bezeichnet die Adhäsionsenergie, die mit einem einfachen Kontaktpotential W ($W > 0$) verknüpft ist. Dieser Term ist proportional zur Kontaktfläche A^* des Vesikels. Der letzte Term beschreibt die Energie, die durch das Anlegen einer Punktkraft senkrecht nach oben am Nordpol des Vesikels hervorgerufen wird.

Die freie Energie wird in einem geeigneten Koordinatensystem numerisch minimiert (zur genauen Rechnung vgl. Smith et al. 2003). Dadurch entstehen axialsymmetrische Trajektorien der *gesamten* Vesikelform, die durch die Wechselwirkungsstärke W und Randbedingungen wie z.B. das reduzierte Volumen v eindeutig bestimmt sind (vgl. Kapitel 4).

Die Anwendbarkeit dieser Theorie wird mit Vesikeln geprüft, die spezifisch auf einer Oberfläche adhärieren und mit einer sehr kleinen Kraft nach oben gezogen werden. Dazu werden konfokale Mikroskopiebilder dieser Vesikel vor und während eines Kraftimpulses aufgenommen und als Seitenansicht dargestellt. Dann wird an den ungestörten Vesikel (linker Teil von Abbildung 6.2) eine Trajektorie ohne

externe Kraft angepasst, und eine Trajektorie mit denselben Randbedingungen, aber mit Einwirkung einer Kraft nach oben, wird an den Vesikel angepasst, der während eines Kraftpulses aufgenommen wurde (rechter Teil von Abbildung 6.2) Die experimentellen Daten für das reduzierte Volumen ($v = 0,8 \pm 0,1$), die Wechselwirkungsstärke ($W = 0,15 \pm 0,05 \mu\text{N}/\text{m}$) und die externe Kraft ($F < 1 \text{pN}$) stimmen gut mit den theoretische ermittelten Parametern ($v = 0,88$; $W = 0,12 \mu\text{N}/\text{m}$ und $F = 0,73 \text{pN}$) überein. Für eine direkte Anwendung der Theorie auf Daten, die mit dem RIKM zugänglich sind, sind noch einige Modifikationen der Theorie notwendig. So sollte das einfache Kontaktpotential durch Rezeptor-Ligand-Bindungen ersetzt und der Einfluss von Repellern berücksichtigt werden. An der Anpassung des Modells wird derzeit gearbeitet.

6.3 Verfahren zur Auswertung der Daten

Zur Auswertung der Daten wird in dieser Arbeit nicht das Modell von Bruinsma verwendet (Guttenberg et al. 2000), sondern ein neuer Zugang gewählt. Die Notwendigkeit hierfür ist in den großen Kontaktflächen der Vesikel begründet, die schon im ungestörten Gleichgewichtszustand, d.h. ohne angelegte Zugkraft, zu Kontaktwinkeln über 20° führen. Das Anlegen einer Kraft resultiert in einer Erhöhung der Spannung und des Kontaktwinkels (Gönnenwein 2003) und erschwert so deren experimentelle Bestimmung während des Kraftimpulses mit dem RIKM.

Durch die niedrige Adhäsionsenergie des Rezeptor-Ligand-Paares ist es im betrachteten System möglich, Teile der Adhäsionsfläche während eines Kraftimpulses reversibel abzulösen. Dadurch bietet sich die Adhäsionsfläche – genauer die Fläche starker Adhäsion, als gut zugängliche Messgröße an. In Abbildung 6.3 ist ein solches Ablöseexperiment mit drei Kraftimpulsen von 12pN dargestellt. Für den ersten Impuls ist in jedem Bild der Umriss der Adhäsionsfläche des *vorhergehenden* Bildes eingetragen, wodurch die anfänglich starke Verkleinerung der Adhäsionsfläche und die anschließende Relaxation des Systems in ein neues Gleichgewicht unter externer Belastung veranschaulicht wird. Zur quantitativen Auswertung wird die Adhäsionsfläche bestimmt und zusammen mit der Information über die angelegte Kraft gegen die Zeit aufgetragen (vgl. oberer Teil der Abbildung 6.4). Nicht stark adhärierte Teile der Kontaktfläche, insbesondere Blasen innerhalb der Adhäsionsfläche (sogenannte Blister; Nardi 1998) werden dabei nicht zur Adhäsionsfläche gezählt. Die so erhaltenen Kurven werden in einzelne Ereignisse zerlegt, die jeweils mit dem Beginn eines Kraftimpulses beginnen und mit dem Abschalten der Kraft beendet werden (vgl. unterer Teil der Abbildung 6.4).

Jedes dieser Einzelereignisse wird nun mit dem Anfangswert der Adhäsionsfläche normiert. Bei der Darstellung dieser normierten Einzelkurven kann man beobachten, dass die Adhäsionsfläche durch das Einwirken der Kraft auf ein tieferes,

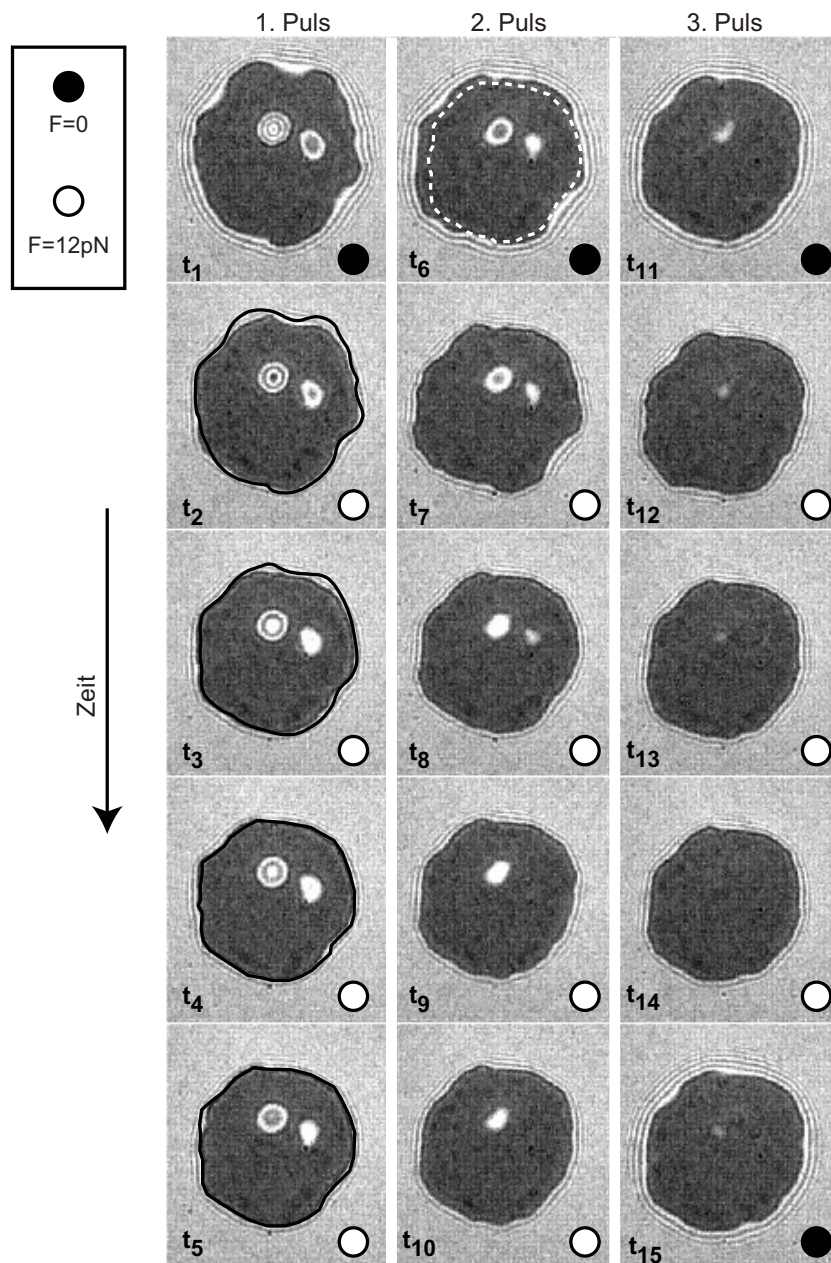
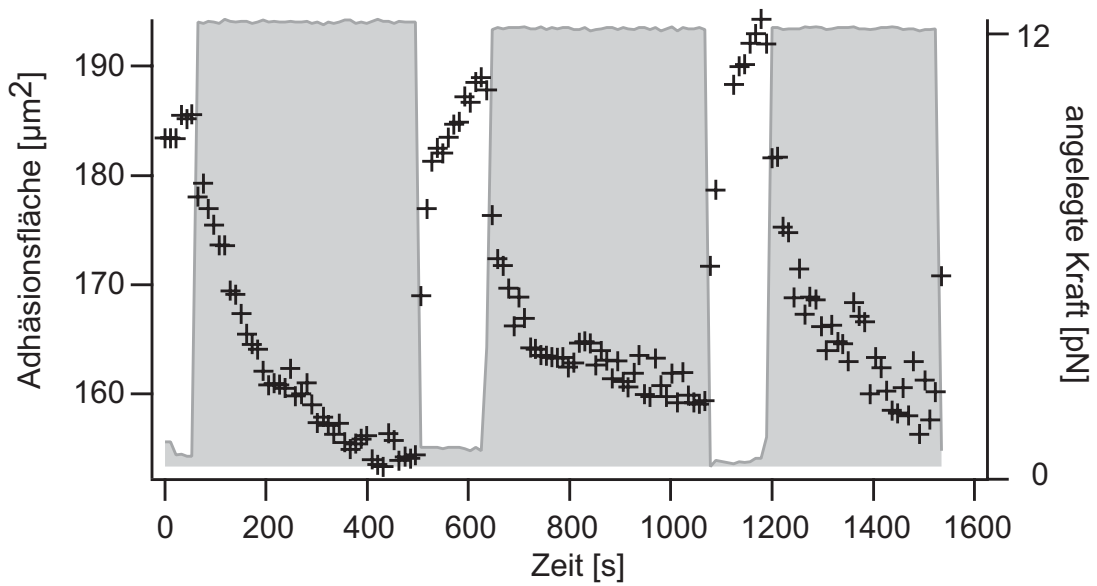


Abbildung 6.3: Entwicklung der Adhäsionsfläche eines Vesikels im RIKM beim Anlegen einer externen Kraft. Die Zeitachse verläuft von oben nach unten, innerhalb einer Spalte ist jeweils ein Kraftimpuls dargestellt. Die Zeitintervalle $t_i - t_{i-1}$ sind konstant. Das erste Bild jeder Spalte zeigt den Zustand ohne äußere Kraft. In der linken Spalte ist der Umriss der Adhäsionsfläche des jeweils vorhergehenden Bildes skizziert, um die Flächenabnahme und deren Sättigung zu verdeutlichen.



Flächenentwicklung während des ersten Kraftpulses:
Die Fläche wird auf den Beginn des Pulses normiert

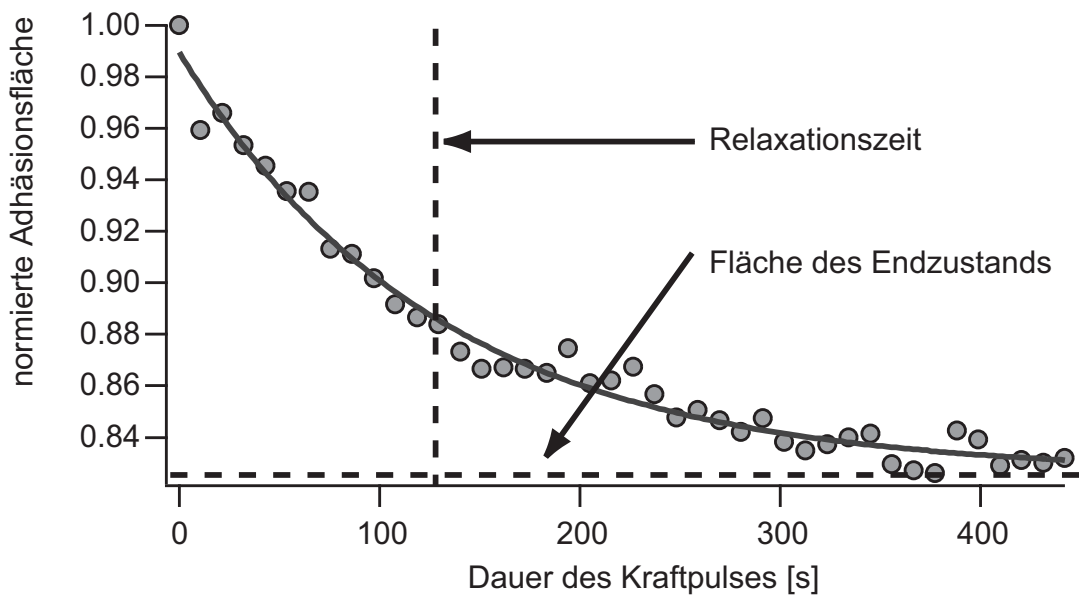


Abbildung 6.4: Zur Datenauswertung wird die Adhäsionsfläche für jeden Kraftimpuls auf den Startwert normiert und gegen die Dauer des Kraftimpulses aufgetragen. Eine Exponentialkurve wird angepasst und die charakteristische Zeit sowie die neue Gleichgewichtsfläche werden ermittelt.

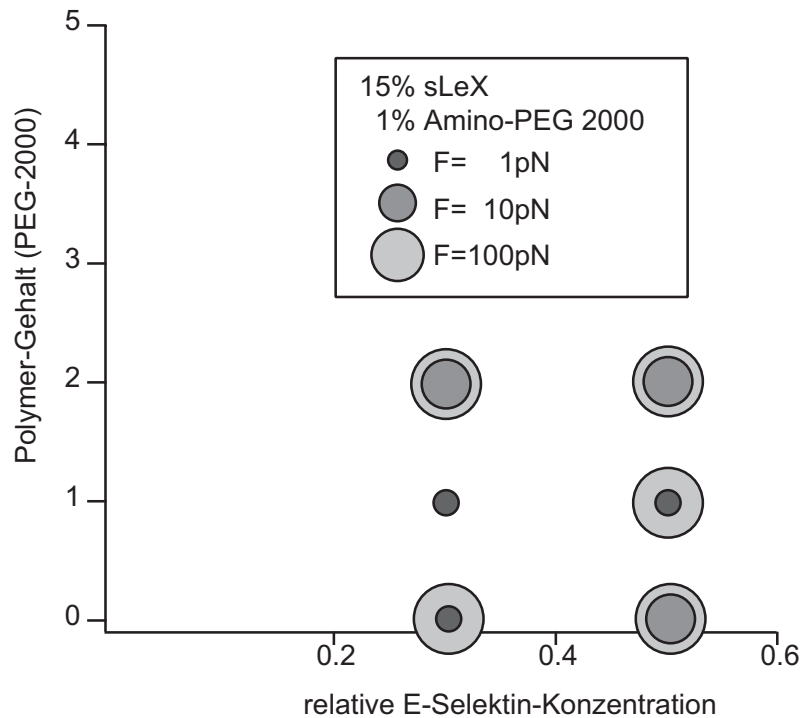


Abbildung 6.5: Mit der magnetischen Pinzette wird, ähnlich wie im thermodynamischen Gleichgewicht (vgl. Kapitel 4) ein Phasendiagramm erstellt, das das Verhalten des Systems als Funktion thermodynamischer Parameter widerspiegelt. Dabei werden die Proteindichte auf der Oberfläche, der Polymergehalt im Vesikel und die angelegte Kraft variiert. Die Stärke der angelegten Kraft ist durch verschieden große Kreise dargestellt.

konstantes Niveau absinkt und dass diese Relaxation in einer charakteristischen Zeit geschieht. Als einfachste Funktion, die ein solches Verhalten beschreibt, wird die Exponentialfunktion

$$A(t) = A_1 + A_0 \exp\left\{-\frac{t}{\tau}\right\} \quad (6.5)$$

zur Anpassung an die Daten gewählt. Im folgenden werden also zur Beschreibung der Experimente die Parameter A_1 und τ als Gleichgewichtsadhäsionsfläche während eines Kraftimpulses bzw. Relaxationszeit des Systems verwendet.

6.4 Experimente mit der magnetischen Pinzette

In Analogie zu den in Kapitel 4 diskutierten Ergebnissen wird auch in den Experimenten mit der magnetischen Pinzette ein möglichst umfangreiches Phasendiagramm erstellt (vgl. Abbildung 6.5). Es werden dazu Messreihen durchgeführt,

in denen die Proteindichte auf der Oberfläche und der Polymergehalt im Vesikel verändert werden und die Kraft, mit der der Vesikel nach oben gezogen wird, variiert wird. Auf die Variation des Sialyl-Lewis^X-Gehaltes wird verzichtet, nachdem im zuvor diskutierten Gleichgewichtsfall weder eine Abhängigkeit der Adhäsionsstärke noch der Größe der Adhäsionsfläche vom verwendeten Glykolipidgehalt nachgewiesen werden konnte. Alle Experimente mit der magnetischen Pinzette werden mit einem Sialyl-Lewis^X-Gehalt von 15% durchgeführt und enthalten 1% lipidgekoppeltes Amino-PEG-2000 zur Kopplung der Magnetkugeln an die Vesikel (vgl. Kapitel 3.2).

Die einzelnen Kraftimpulse werden, wie in Abbildung 6.4 dargestellt, als Einzelereignisse ausgewertet und auch gesondert in die Auswertungsdiagramme eingetragen (keine Mittelwertbildung aus verschiedenen Ereignissen). Das reduzierte Volumen wird für alle Vesikel vor dem ersten Kraftimpuls bestimmt. Da sich keine Abhängigkeit der gemessenen Parameter feststellen lässt, wird zugunsten der Übersichtlichkeit auf eine gesonderte Darstellung des reduzierten Volumens verzichtet. Fehlerbalken werden angegeben, soweit sie größer als der verwendete Markierungspunkt sind.

Während eines Experiments adhären die Vesikel zunächst fast ungestört an der Oberfläche, lediglich eine kleine Kraft nach oben sorgt dafür, dass die Magnetkugeln nicht an das Substrat binden. Dann werden mehrere Kraftimpulse mit einer Dauer von mindestens 400s auf die Vesikel ausgeübt. Zwischen den Impulsen wird solange bei sehr niedriger Kraftanwendung gewartet, bis das System relaxiert ist und die Adhäsionsfläche nicht mehr weiter wächst.

Mit dem verwendeten Aufbau ist es möglich, mit unterschiedlichen Kräften an einer Kugel zu ziehen, die an einen Vesikel gebunden ist, im hier betrachteten Fall mit einer konstanten Kraft von 1,2pN, 12pN oder 94pN. Die Variation der angelegten Kraft erfolgt dabei über die Ausnutzung der in Kapitel 3.2 überprüften Abstandsabhängigkeit des Magnetfeldes.

Die Stärke der Kraft auf Bindungen in der Adhäsionsfläche hängt von der Größe dieser Fläche ab (Guttenberg et al. 2000). Um die Kraft, die in der Kontaktzone des Vesikels am Substrat wirkt, zu berechnen, wird die Gesamtkraft, mit der die Magnetkugel zieht, durch den Umfang der Adhäsionsfläche geteilt. Dadurch erhält man einen Mittelwert der vertikalen Komponente der Kraft pro Längeneinheit an der Kontaktlinie (diese Kraftkomponente wird im folgenden als vertikale Linienkraft bezeichnet). Die Bestimmung des Umfangs der Adhäsionsfläche erfolgt jeweils vor dem Einwirken der Kraft.

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Experimente werden an Substraten mit zwei verschiedenen E-Selektindichten durchgeführt. Im folgenden werden Substrate mit einer Konzentration von $1700 \pm 700 \mu\text{m}^{-2}$ als Substrate *hoher* Dichte bezeichnet und solche mit einer Konzentration von $900 \pm 100 \mu\text{m}^{-2}$ als Substrate *niedriger* Dichte.

6.4.1 Abhängigkeit der resultierenden Adhäsionsfläche von Systemaufbau und angreifender Linienkraft

In Anlehnung an das oben beschriebene Modell von Bell (1978) werden für die Beschreibung der Experimente mit der magnetischen Pinzette die Adhäsionsfläche $A(t)$, die sich unter dem Einfluss der vertikalen Zugkraft einstellt und die Relaxationszeit τ des Systems in dieses neue Gleichgewicht als Messparameter gewählt.

In Abbildung 6.6 ist die Verkleinerung der Adhäsionsfläche während eines Kraftimpulses dargestellt. Dazu wird die Differenz aus der ursprünglichen Adhäsionsfläche und der Adhäsionsfläche $A(t)$, die sich während eines Kraftimpulses einstellt mit der ursprünglichen Adhäsionsfläche normiert und gegen die mittlere vertikale Linienkraft in $\mu\text{N}/\text{m}$ aufgetragen. Dabei ist die hohe E-Selektindichte auf dem Substrat im oberen Bildteil (6.6a) aufgetragen, die niedrige Dichte im unteren Diagramm (6.6b). Die verschiedenen Symbole bezeichnen verschiedene Polymeranteile im Vesikel.

Bei der Betrachtung der hohen E-Selektindichte (Abbildung 6.6a) zeigt sich, dass die Adhäsionsfläche unter einer externen Kraft nur wenig verändert wird. Der Flächenverlust beträgt maximal 20% des ursprünglichen Wertes und auch das nur bei maximaler PEG-2000 Konzentration, also bei minimaler Adhäsionsstärke (vgl. Kapitel 4). Für kleinere Polymerkonzentrationen ist die resultierende Adhäsionsfläche um weniger als 20% kleiner als die Adhäsionsfläche im ungestörten Gleichgewicht. Vergleicht man für den Fall großer E-Selektindichte die Werte für gleiche Polymerkonzentrationen und verschiedene vertikale Linienkräfte, so zeigt sich, dass bei einer Polymerkonzentration von 2% PEG-2000 keine Kraftabhängigkeit im beobachteten Intervall festgestellt werden kann. Für 1% PEG-2000 zeigt sich eine klare Abhängigkeit des Flächenverlusts von der Linienkraft. Mit einer größeren Kraft kann dabei erwartungsgemäß eine größere Fläche vom Substrat abgezogen werden. Bei einem Polymergehalt von 0% kann so gut wie keine Flächenänderung mittels einer angelegten Kraft erzielt werden.

Es lässt sich bei hoher E-Selektindichte also zum einen das Gleichgewicht der Adhäsionsfläche durch eine externe Kraft nur wenig verändern, zum anderen ist diese Verschiebung für große Polymeranteile unabhängig von der angelegten Kraft.

Im Fall der niedrigen E-Selektindichte (Abbildung 6.6b) verändert sich die Abhängigkeit der resultierenden Adhäsionsfläche von der angelegten Kraft drastisch. Es ist hier möglich, die Adhäsionsfläche durch das Anlegen einer Kraft stark zu verkleinern, im Extremfall großer PEG-2000 Konzentration und einer Linienkraft von mindestens $7,5\mu\text{N}/\text{m}$ kann ein Vesikel bei zwei verschiedenen Impulsen sogar vollständig abgelöst werden. Die anderen Vesikel zeigen eine lineare Abhängigkeit des Flächenverlusts von der angreifenden Linienkraft im Messbe-

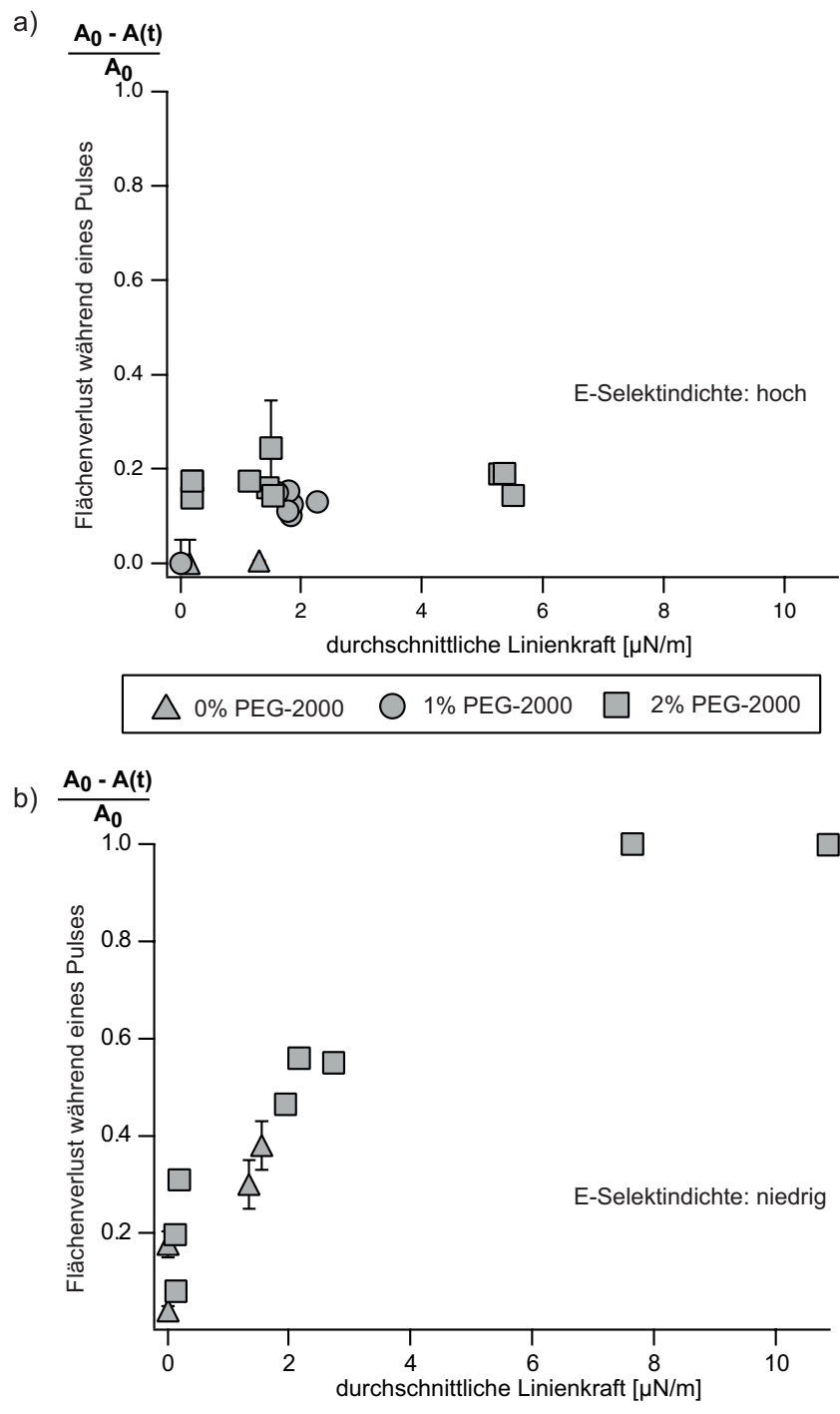


Abbildung 6.6: Abhängigkeit der Adhäsionsfläche, die sich während eines Kraftimpulses einstellt, von der Stärke der Linienkraft. a) Verhalten für hohe E-Selektindichte; b) gleiche Darstellung für niedrige E-Selektindichte.

reich bis ca. $4\mu\text{N}/\text{m}$. Verschiedene Polymergehalte können dabei nur als leichte Verschiebung des Flächenverlusts wahrgenommen werden, nicht als Änderung in der Steigung.

Es kann damit bei niedriger E-Selektinkonzentration eine starke Verkleinerung der Adhäsionsfläche durch eine externe Kraft erzielt werden. Zusätzlich ist die resultierende Adhäsionsfläche stark von der angelegten Kraft, nicht aber vom Polymergehalt abhängig.

6.4.2 Abhängigkeit der Relaxationszeit von Systemaufbau und angreifender Linienkraft

Die im folgenden diskutierte Relaxationszeit ist ein Maß dafür, wie schnell ein System bei einer Veränderung der äußeren Bedingungen ein neues Gleichgewicht erreicht. Die externe Störung ist im hier betrachteten Fall die Linienkraft am Ort der Kontaktfläche, die durch die magnetische Pinzette ausgeübt wird.

In Abbildung 6.7 sind die Relaxationszeiten in das neue, durch die angelegte Kraft verschobene Gleichgewicht gegen die vertikale Linienkraft aufgetragen. Im oberen Bildteil (6.7a) ist wieder die höhere E-Selektinkonzentration dargestellt, im unteren Bildteil (6.7b) die niedrigere Konzentration. Hier ist in beiden Fällen eine klare Tendenz dahingehend festzustellen, dass bei höherer angelegter Kraft die Relaxationszeit des Systems stark abnimmt. Bei größerer angelegter Linienkraft kommt das System also schneller ins Gleichgewicht. Dabei nimmt die Relaxationszeit bei kleinen Linienkräften und kleiner E-Selektindichte größere Werte an (bis zu 400s) als für große E-Selektindichten (maximal 220s). Gleichzeitig ist die Abnahme der Relaxationszeit mit wachsender Linienkraft für die kleine E-Selektinkonzentration ausgeprägter als für die große Rezeptorendichte, d.h. die Abhängigkeit der Relaxationszeit von der Linienkraft für die kleine E-Selektinkonzentration verläuft steiler.

Ein Einfluss der Polymere auf das Relaxationsverhalten kann im Rahmen der betrachteten Fälle nicht festgestellt werden. Die Werte für verschiedene Polymerkonzentrationen liegen für gleiche Linienkräfte im selben Bereich und überlagern sich zu einer abfallenden Kurve.

6.5 Diskussion

Die magnetische Pinzette stellt eine geeignete Methode dar, das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte System von außen durch das Anlegen einer Kraft zu beeinflussen. Die adhärenierten Vesikel werden vom Substrat weg senkrecht nach oben gezogen. Durch die elastischen Eigenschaften der Vesikelmembran wird die am oberen Pol des adhärenierten Vesikels ausgeübte Punktkraft in eine Linienkraft entlang der Kontaktlinie des Vesikels übertragen. Die Stärke der so ausgeübten Linienkraft kann in einem Intervall variiert werden, das es erlaubt, sowohl sehr

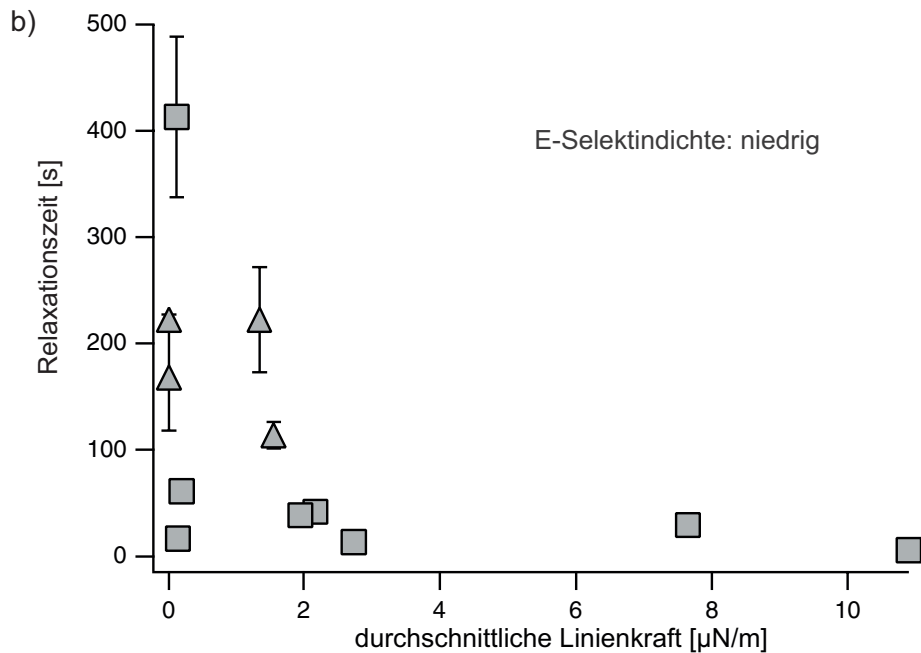
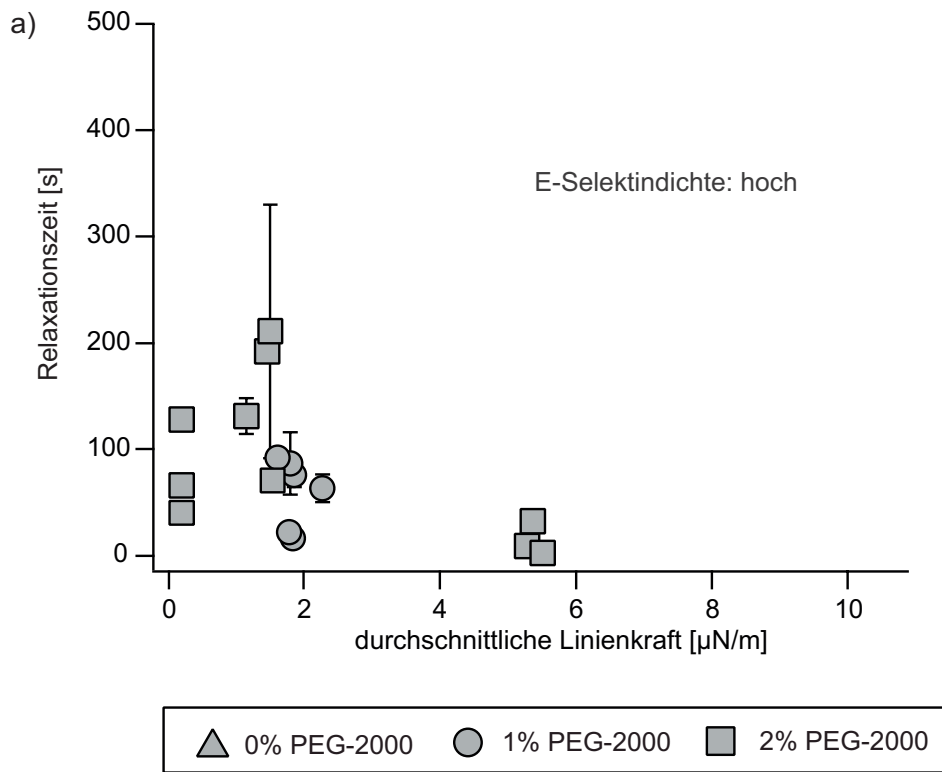


Abbildung 6.7: Abhängigkeit der Relaxationszeit, innerhalb derer das Gleichgewicht in Anwesenheit einer externen Kraft eingestellt wird, von der Stärke des Linienkraft. a) Verhalten für eine hohe E-Selektindichte; b) gleiche Darstellung für eine niedrige E-Selektindichte.

kleine Verschiebungen des Gleichgewichts als auch die völlige Loslösung einzelner Vesikel zu beobachten.

Auswirkung eines Kraftimpulses auf ein System mit schwacher Adhäsion

Im Experiment wird beobachtet, dass das Einwirken einer externen vertikalen Kraft dazu führt, dass sich die Adhäsionsfläche der Vesikel verkleinert. Der zeitliche Verlauf dieser Flächenentwicklung lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben, die in einem Niveau A_1 sättigt (vgl. Gleichung (6.5)). Die relative Größe dieser neuen Fläche A_1 und die Relaxationszeit τ des Systems sind abhängig von der Rezeptordichte auf der Oberfläche und der Linienkraft, die an der Adhäsionsfläche wirkt. In Abbildung 6.8 sind die Ergebnisse der Experimente mit der magnetischen Pinzette zusammengefasst. Es sind dabei der Übersichtlichkeit halber die Werte für gleiche Polymer- und Proteinkonzentration als Mittelwerte abgebildet, die in einem kleinen Intervall der vertikalen Linienkraft zu finden sind. Im linken Bildteil sind der Flächenverlust und die dazugehörige Relaxationszeit in Abhängigkeit von der vertikalen Linienkraft für die niedrige E-Selektindichte dargestellt. Im rechten Bildteil sind die gleichen Messgrößen für die hohe E-Selektindichte aufgetragen. Werte, die zu Linienkräften nahe Null gehören, sind aufgrund ihrer großen Streuung hier nicht berücksichtigt

Abhängig von der E-Selektindichte ergeben sich für den Flächenverlust während eines Kraftimpulses zwei verschiedene Szenarien. Für die niedrige E-Selektindichte (Abbildung 6.8 links oben) zeigt sich eine starke Abhängigkeit des Flächenverlusts von der angelegten Linienkraft. So kann bei gleichem Polymergehalt mit einer Kraft von $2,3\mu\text{N}/\text{m}$ im Mittel die Hälfte der Adhäsionsfläche abgelöst werden, mit einer Kraft von mindestens $7,6\mu\text{N}/\text{m}$ kann der Vesikel völlig abgerissen werden. Für sehr kleine Linienkräfte von etwa $1,5\mu\text{N}/\text{m}$ nimmt die Relaxationszeit stark zu; sie beträgt im Experiment ohne PEG-2000 $170\pm 60\text{s}$. In dieser sehr langen Zeit wird die Adhäsionsfläche um etwa ein Drittel verkleinert. Der große Flächenverlust könnte damit zusammenhängen, dass man hier die aus Experimenten mit nicht-konstanten Zugkräften bekannte Überlagerung von spontanen und induzierten Bindungsbrüchen beobachten kann (Prechtel et al. 2002).

Systeme mit großer E-Selektindichte verhalten sich in einem wesentlichen Aspekt anders als Systeme mit niedriger Proteindichte: Es kann hier, wie in Abbildung 6.8 rechts oben dargestellt, keine Abhängigkeit des Flächenverlusts von der Linienkraft festgestellt werden, er liegt für Linienkräfte über $1,5\mu\text{N}/\text{m}$ immer bei etwa 20% der ursprünglichen Fläche. Allerdings ist auch hier eine starke Zunahme der Abreissgeschwindigkeit, bzw. eine Abnahme der Relaxationszeit mit zunehmender Linienkraft festzustellen (Abbildung 6.8 rechts unten). Braucht das System bei einer Linienkraft von $1,4\mu\text{N}/\text{m}$ noch $150\pm 60\text{s}$, um das neue Gleichgewicht zu erreichen, so ist es bei einer Linienkraft von $5,4\mu\text{N}/\text{m}$ schon nach ca. 15s vollständig relaxiert.

Es kann bisher keine Abhängigkeit der Relaxationszeit von der Polymerkon-

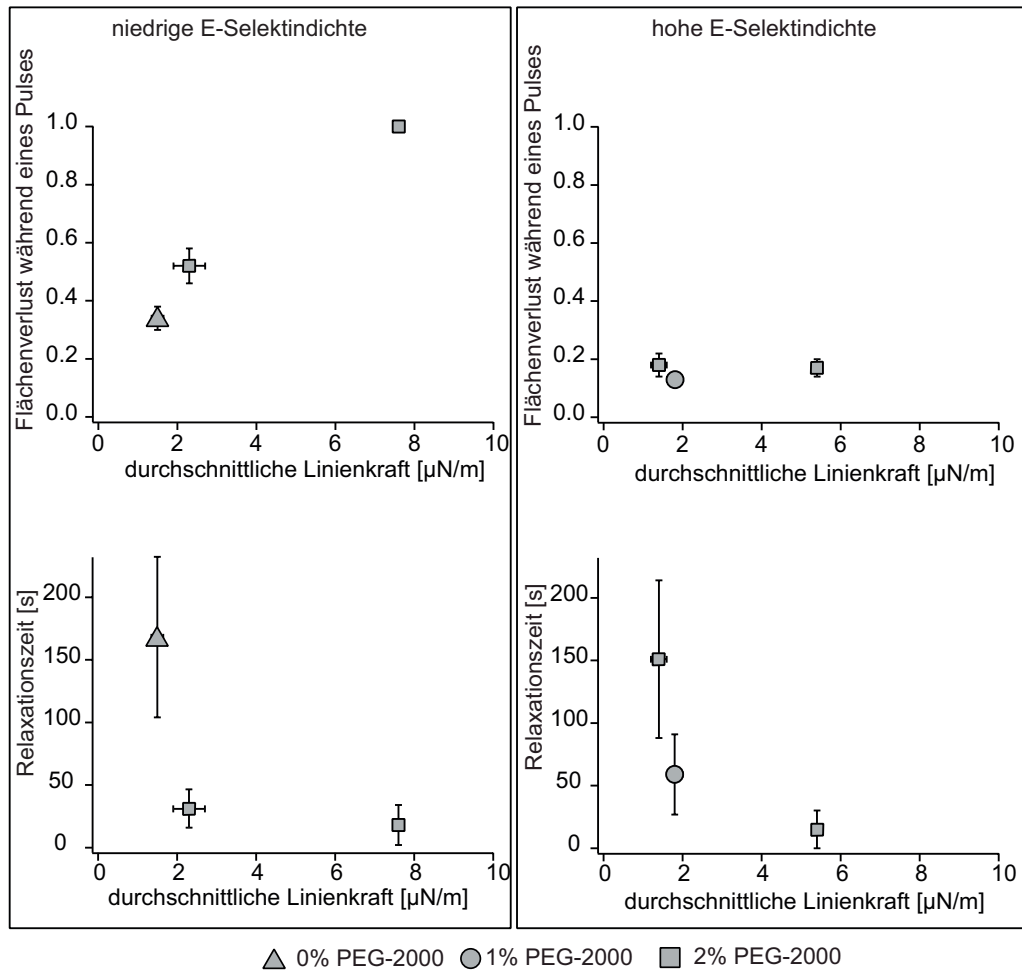


Abbildung 6.8: Zusammenfassung der Messungen mit der magnetischen Pinzette. Es sind die Mittelwerte des Flächenverlusts während eines Kraftimpulses und die dazugehörigen Relaxationszeiten dargestellt. Im linken Bildteil sind dabei die Ergebnisse für niedrigen E-Selektindichte, im rechten Bildteil für hohe E-Selektindichte aufgetragen.

zentration im Vesikel festgestellt werden. Diese scheinbar fehlende Abhängigkeit des Relaxationszeit von der Polymerkonzentration ist erstaunlich, insbesondere da in Kapitel 4 die direkte Abhängigkeit der Adhäsionsstärke vom Polymergehalt in der Vesikelmembran gezeigt wurde. Bei der Betrachtung des Flächenverlusts der Adhäsionsfläche während eines Kraftimpulse ist im Mittel ebenfalls keine Abhängigkeit von der Polymerkonzentration festzustellen. Eine mögliche Abhängigkeit von der Ligandendichte wurde aufgrund der Ergebnisse im thermodynamischen Gleichgewicht nicht untersucht. Dort konnte keine Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von der Ligandenkonzentration im Vesikel gemessen werden.

6.6 Anwendbarkeit bestehender Theorien

Für quantitative Aussagen über den Mechanismus, der für das oben geschilderte Verhalten verantwortlich ist, ist ein theoretisches Modell unumgänglich. Die Sättigung auf ein neues Gleichgewichtsniveau unter dem Einfluss einer äußeren Kraft scheint dabei die Folge elastischer Eigenschaften der Vesikelmembran und der Möglichkeit, im Ensemble gelöste Bindungen zum Teil wieder schließen zu können, zu sein. Für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente mit der magnetischen Pinzette kann keine Theorie gefunden werden, die das Experiment exakt beschreibt. Um eine erste Interpretation der Experimente geben zu können, sollen daher zunächst die charakteristischen Eigenschaften des betrachteten Systems noch einmal zusammengefasst werden, und dann mit den vorhandenen theoretischen Ansätzen verglichen werden.

Die Rezeptoren (E-Selektin) sind auf dem Substrat physisorbiert und daher nicht lateral beweglich. Die Vesikelmembran dagegen ist fluide, so dass sowohl die Liganden (Sialyl-Lewis^X-GSL) als auch die Repeller (PEG-2000-Lipopolymere) in der Membran diffundieren können. Die Kraft auf die Adhäsionsfläche wird weit weg von der Oberfläche am Nordpol des Vesikels senkrecht nach oben ausgeübt.

Im Modell von Bell (1978), das am Anfang dieses Kapitels bereits beschrieben wurde, wird durch das Anlegen einer kleinen Kraft die Reaktionsrate zum ungebundenen Zustand hin erhöht und das Gleichgewicht dadurch zu einem Zustand mit weniger Bindungen verschoben. Allerdings werden in diesem Modell *mobile* Rezeptoren und Liganden betrachtet, die sich auf zwei Oberflächen befinden, deren Abstand durch die Kraft vergrößert wird.

Im Ansatz von Dembo et al. (1988) wird ein Ablöseexperiment beschrieben, bei dem sowohl Rezeptoren als auch Liganden nicht-mobil in ihre jeweilige inkompressible Oberfläche eingebettet sind. Die beiden Flächen sind aneinander adhärirt. Eine der Flächen wird unter einem Winkel von der anderen, ebenen Fläche abgezogen und die Geschwindigkeit des Kontaktpunktes der beiden Flächen wird gemessen. Auch hier kann ein Gleichgewichtszustand unter Belastung erreicht werden und zwar dann, wenn durch die Kraft eine kritische Spannung an den Bindungen induziert wird. Diese Spannung ist abhängig von der Anzahl der Rezeptoren, deren Bindungsaffinität und vom Winkel unter dem die Kraft ausgeübt wird. Beide Modelle sind rein reaktionslimitiert und berücksichtigen Membraneigenschaften nicht.

Erhaltung von Volumen und Oberfläche während eines Ablöseexperiments

Die Vielzahl der die Adhäsionsstärke bestimmenden Parameter erfordert neue Denkmodelle, da neben der Zusammensetzung des Systems und der angelegten Kraft auch das Volumen der Modellzelle eine entscheidende Rolle spielt. Für die theoretische Modellierung eines Systems ist es unerlässlich, die Randbedingungen zu kennen und deren Entwicklung verfolgen zu können. In den theoretischen

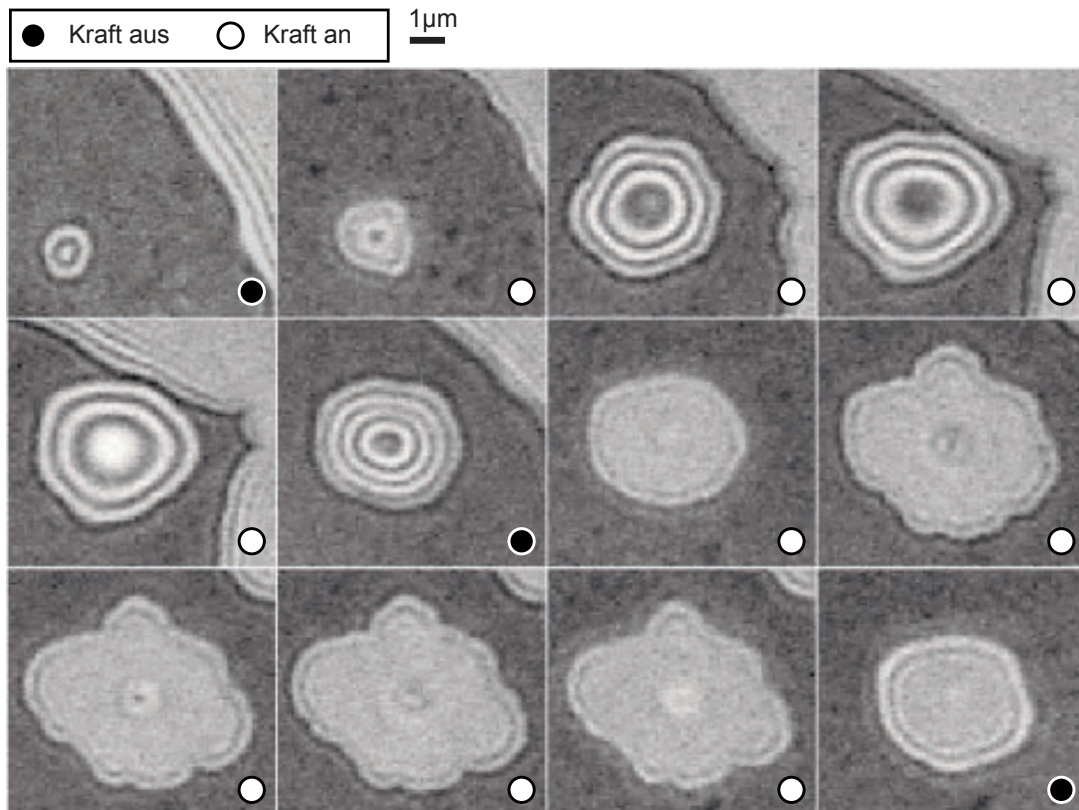


Abbildung 6.9: Entwicklung eines Blisters während eines Experiments mit der magnetischen Pinzette: Die nicht-adhärerte Stelle innerhalb der Adhäsionsfläche wächst während eines Kraftimpulses, wobei, wie am Rand der Adhäsionsfläche auch, Stellen starker Adhäsion sichtbar werden. Der Blister erscheint dadurch blütenförmig.

Modellen der Vesikeladhäsion bilden die Erhaltung des Volumens und der Oberfläche eines Vesikels einen zentralen Aspekt. Ob in den Experimenten Volumen- und Oberflächenerhaltung gegeben ist, muss aber geprüft und diskutiert werden. Dazu werden im folgenden einige Experimente dargelegt.

Das Verhalten von kleinen, nicht-adhärerten Flächen innerhalb der Adhäsionsfläche (sog. Blister) während eines Kraftimpulses ist in Abbildung 6.9 dargestellt. Der Vesikel enthält kein PEG-2000 und adhärert auf einer Oberfläche mit einer E-Selektindichte von $900 \pm 100 \mu\text{m}^{-2}$, was einer Adhäsionsstärke von etwa $1,7 \cdot 10^{-8} \text{ N/m}$ entspricht (vgl. Kapitel 4). Die Linienkraft beträgt $1,5 \pm 0,1 \mu\text{N/m}$. Beim Anlegen einer Kraft wächst der Blister und es erscheinen Stellen starker Adhäsion, an denen die Membran nicht abgelöst wird. Der Blister wird dadurch blütenförmig. Außerdem wird die Membrankuppe, die den Blister abschließt, steiler. Das wird daran deutlich, dass keine Interferenzringe mehr zu erkennen sind (zweiter Kraftimpuls in Abbildung 6.9). Die bei Nardi et al. (1998) publizierte Interpretation von Blistern als Blasen, in denen sich durch

den Adhäsionsprozess gelöste Stoffe wie Ionen oder auch Zucker anreichern, kann hier eine mögliche Lösung darstellen. Nachdem die Vesikelmembran für Wassermoleküle durchlässig ist, für größere Moleküle aber nicht, strömt Wasser in die Blister, um den osmotischen Druckunterschied zwischen Blister und Vesikel auszugleichen. Dies führt zu einem Gleichgewichtszustand, bei dem der Blister einen gewissen Radius und einen Kontaktwinkel besitzt, die durch den Unterschied der Konzentration an gelösten Stoffen zwischen Vesikel und Blister (also den Laplace-Druck) und durch die Membranspannung festgelegt sind.

Die beobachtete irreversible Vergrößerung eines Blisters kann in diesem Modell nur dadurch entstehen, dass der osmotische Druckunterschied zwischen Blister und Vesikel erhöht wird, da die Spannung nach Beendigung des Kraftimpulses zu ihrem Ausgangswert zurückkehrt (hier nicht gezeigt).

Zur Vergrößerung des osmotischen Druckunterschieds zwischen Blister und Vesikel müssen entweder gelöste Stoffe in den Blister gelangen oder aus dem Vesikel ausströmen. Letzteres erscheint dabei als die weitaus wahrscheinlichere Variante. Dazu müssen sich während des Kraftimpulses Poren in der Vesikelmembran bilden, durch die Zuckermoleküle aus dem Vesikel entweichen. Dadurch wird der osmotische Druck im Vesikel erniedrigt und es dringt Wasser durch die Membran nach außen, um die Druckdifferenz auszugleichen. Auch in den Blister gelangt auf diese Weise mehr Wasser, er wird größer und steiler. Durch das Abschalten der Kraft verändern sich die Osmolalitäten im System nicht, so dass der Effekt irreversibel ist bis auf den Anteil, der durch die vorübergehende Erhöhung der Membranspannung während des Kraftimpulses verursacht wurde. Das Modell der Porenbildung durch Erhöhung der Membranspannung und der dadurch erhöhten Permeabilität der Membran wird zum Beispiel bei Brochard-Wyart et al. (2000) diskutiert.

Dies würde bedeuten, dass das Volumen eines Vesikels während eines Kraftimpulses nicht konstant bleibt, sondern leicht abnimmt. Klarheit könnte hier ein sogenanntes „Leakage-Experiment“ schaffen, bei dem Fluorophore in so großer Dichte in den Vesikel gebracht werden, dass Selbstlöschung stattfindet und keine Fluoreszenz beobachtet werden kann. Treten durch Porenbildung Fluorophore aus dem Vesikel aus, so ist deren Fluoreszenzsignal zu beobachten (Weinstein et al. 1977).

Weiterhin wird häufig beobachtet, dass die Adhäsionsfläche nach dem Abschalten (bzw. Verringern der Kraft auf einen Minimalwert) auf eine Größe anwächst, die die Fläche vor dem Kraftimpuls erheblich überschreitet. In Abbildung 6.10 ist das Anwachsen der Adhäsionsfläche nach dem Ende eines Kraftimpulses dargestellt. Es sind dabei die relaxierten Zustände für $F \approx 0\text{pN}$ (linke Spalte) und $F = 100\text{pN}$ (rechte Spalte) nebeneinandergestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind die Adhäsionsfläche und die Stärke des Kraftimpulses gegen die Zeit aufgetragen; die Zeitpunkte, zu denen die oben dargestellten Bilder gehören, sind durch Pfeile markiert. Es ist deutlich zu sehen, dass die Größe der Adhäsionsfläche nach dem ersten und zweiten Impuls stark anwächst.

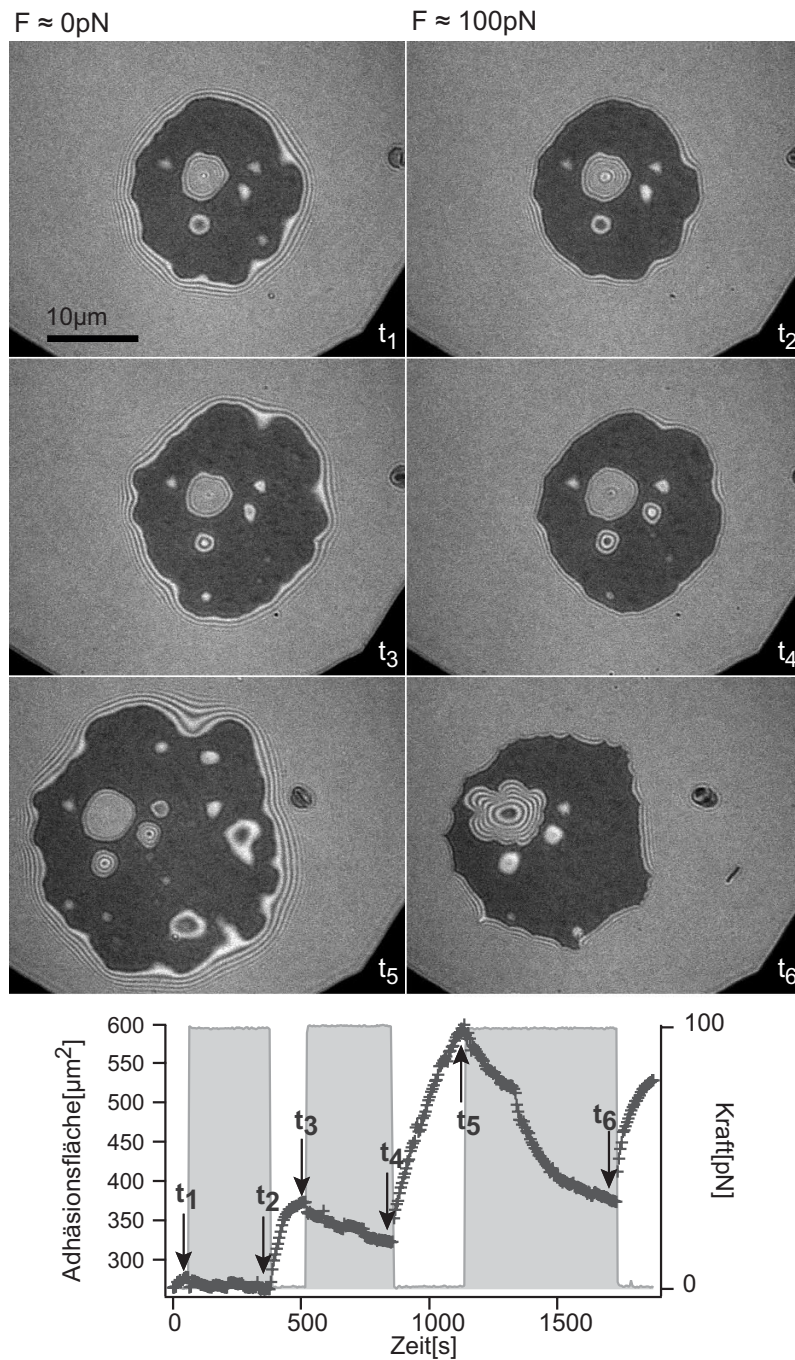
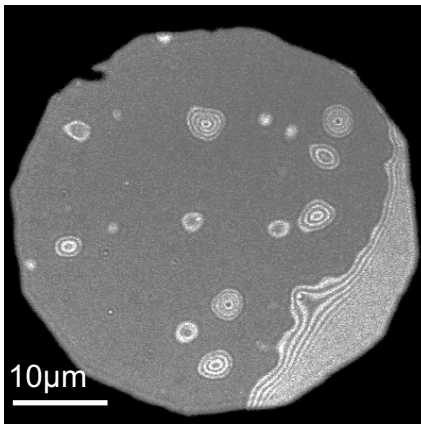
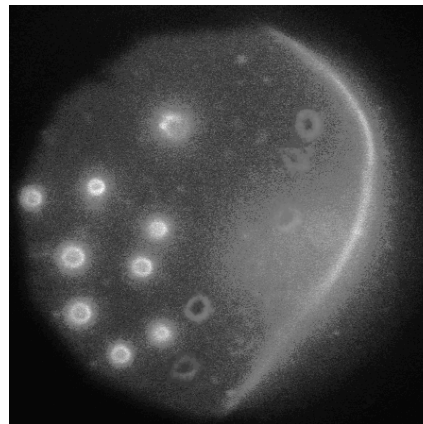


Abbildung 6.10: Wachstum der Adhäsionsfläche nach dem Abschalten der äußeren Kraft: in der linken Spalte sind Bilder eines Vesikels für $F \approx 0$ dargestellt, in der rechten Spalte Bilder am Ende eines Kraftimpulses ($F = 100\text{pN}$). Im unteren Bildteil ist die dazugehörige Adhäsionsfläche aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Adhäsionsfläche nach jedem Abschalten des Impulses anwächst.

RIKM



Fluoreszenz



Überlagerung des Umrisses der Adhäsionsfläche
mit dem Fluoreszenzbild

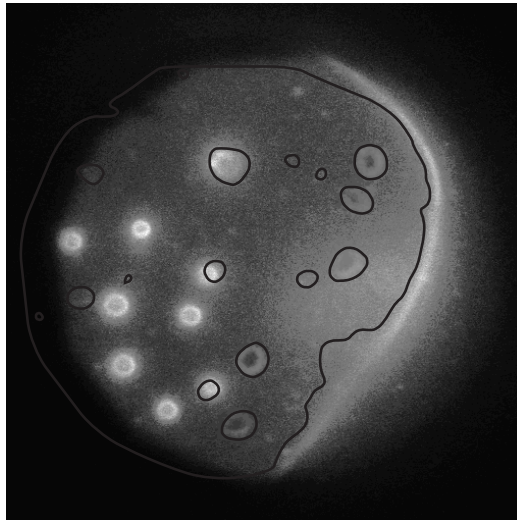


Abbildung 6.11: RIKM und Fluoreszenz-Aufnahme eines adhärenen Vesikels. In der Überlagerung der Umriss der Adhäsionsfläche (aus dem RIKM-Bild) mit dem Fluoreszenzbild ist deutlich zu sehen, dass es innerhalb der Adhäsionsfläche Orte starker Fluoreszenz gibt, die nicht mit Blistern in der Fläche zusammenfallen. Diese werden mit kleinen Vesikeln identifiziert, die sich sehr nahe an der Kontaktfläche befinden.

Eine mögliche Ursache für das Anwachsen der Adhäsionsfläche könnte darin begründet sein, dass das Volumen eines Vesikels – wie oben diskutiert – während eines Ablöseexperiments nicht erhalten bleibt. Es nimmt durch Porenbildung ab und somit steht mehr Überschussfläche zur Adhäsion zur Verfügung, bis das Gleichgewicht von Biege-Energie und Membranspannung erreicht ist.

Eine andere mögliche Interpretation dieses Phänomens liegt in der Bildung kleiner kugelförmiger Membranabschnürungen (engl.: bud). Diese können ent-

weder durch einen schmalen Hals mit dem Vesikel verbunden sein, oder sich vollständig abschnüren und loslösen. Sie erscheinen im ersteren Fall als kleine Vesikel, die an die Membran des Riesenvesikels gebunden sind. Diese Abschnürungen tragen dazu bei, die freie Energie einer Membran zu minimieren, die aus verschiedenen Bestandteilen aufgebaut ist (Lipowsky 1992). Asymmetrische Verteilungen von Membranbestandteilen oder Phasenseparationen innerhalb einer Monoschicht können so ausgeglichen werden. Membranabschnürungen entstehen zum Beispiel durch die Änderung der osmotischen Verhältnisse im Vesikel (Döbereiner et al. 1993), wie sie im hier betrachteten System durchgeführt werden.

Es ist nun denkbar, dass die spezifische Adhäsion des Riesenvesikels an das mit E-Selektin funktionalisierte Substrat nicht genügend Spannung in der Membran induziert, um die Membran glattzuziehen, d.h., die Abschnürungen wieder in die Membran zu integrieren. Die Abschnürungen bleiben also auch bei einem adhärierten Vesikel erhalten.

Für diese Annahme spricht die in Abbildung 6.11 dargestellte Existenz kleiner Abschnürungen in der Adhäsionsfläche eines Vesikels. Es ist dort ein RIKM-Bild und ein Fluoreszenzbild der Kontaktfläche eines spezifisch adhärierten Vesikel zu sehen, dessen Membran einen Fluoreszenzfarbstoff enthält. Im Fluoreszenzbild sind Flächen starker Krümmung besonders hell, was sich am Rand der Adhäsionsfläche und an den Löchern (Blistern) darin gut erkennen lässt. Im unteren Bildteil ist der Rand der Adhäsionsfläche aus dem RIKM-Bild der Fluoreszenzaufnahme überlagert und es wird deutlich, dass es leuchtende Ringe gibt, die nicht mit Blistern in der Adhäsionsfläche korreliert sind und im RIKM-Bild nur als sehr schwache Interferenzringe erkennbar sind. Diese Ringe werden als kleine, möglicherweise mit der Membran verbundene Abschnürungen identifiziert. Für eine Verbindung mit der Membran spricht neben der Nähe zum Substrat (gleiche Fokalebene) auch die Tatsache, dass die kleinen Vesikel nicht fluktuieren, sondern an der gleichen Stelle der Kontaktfläche bleiben.

Wird nun durch das Anlegen einer externen Kraft die Spannung im Vesikel weiter erhöht (Gönnenwein 2003), so können die Membranabschnürungen bei einer Spannung kurz unterhalb der Zerreißspannung der Membran geglättet werden und der Vesikel gewinnt scheinbar an Fläche (Lipowsky 1992). Diese neu zur Verfügung stehende Überschussfläche wird als Adhäsionsfläche verwendet und es können sich keine neuen Abschnürungen mehr bilden.

Erhaltung der Dichte der Bindungen

Ein damit eng verknüpft Problem, das sich hier für die Anwendung auf das betrachtete System stellt, besteht in der Frage, ob die Adhäsionsfläche direkt mit der Anzahl von Bindungen identifiziert werden kann. Das würde bedeuten, dass die Dichte der Bindungen in der Adhäsionsfläche während eines Kraftimpulses konstant bleibt und nur Bindungen gelöst werden, die sich am Rand der Adhäsions-

onsfläche befinden. Diese Annahme ist durchaus sinnvoll, da bei der Verformung einer dünnen Schale die meiste elastische Energie in einem schmalen Bereich am Rand der Verformung gespeichert wird (Landau & Lifschitz 1989). Dieser schmale Bereich ist bei einem adhärennten Vesikel durch die charakteristische Länge λ gegeben, die den Übergang zwischen der Adhäsionsfläche und der freien Membran beschreibt (vgl. Kapitel 4). Durch das Anlegen einer externen Kraft wird die Spannung γ in der Membran erhöht und der Übergangsbereich $\lambda = \sqrt{\kappa/\gamma}$ wird schmaler (κ bezeichnet die Biegesteifigkeit der Membran und bleibt während eines Kraftimpulses erhalten). Nach dieser Interpretation „spüren“ Bindungen innerhalb der Adhäsionsfläche nichts von einem Kraftimpuls, sondern es sind wirklich nur die Bindungen am Rand der Adhäsionsfläche betroffen. Diese Interpretation wird auch bei Guttenberg et al. (2000) verwendet.

Das oben diskutierte Verhalten eines Blisters in der Adhäsionsfläche während eines Kraftimpulses deutet darauf hin, dass das Anlegen einer Kraft und die damit verbundene Erhöhung der Membranspannung auch im Inneren der Adhäsionsfläche Einfluss auf die spezifischen Bindungen hat. Das könnte bedeuten, dass die Dichte der gebundenen Rezeptor-Ligand-Paare während eines Kraftimpulses nicht konstant bleibt. Dies wäre in einem theoretischen Modell auch zu berücksichtigen.

Zur Aufklärung des Mechanismus, der dazu führt, dass spezifisch adhärennte Vesikel durch eine externe Kraft vom Substrat teilweise abgelöst werden können, sich dann aber in einem neuen, kraftinduzierten Gleichgewicht stabilisieren, sind noch weitere Überlegungen notwendig. Einige wichtige Voraussetzungen für eine Interpretation konnten in dieser Arbeit experimentell gefunden werden. Dabei zeigt sich auch hier, dass das biologisch relevante Zusammenspiel von spezifischen Wechselwirkungen und Membraneigenschaften höchst sensitiv auf Veränderungen reagiert und Adhäsionsprozesse dadurch effektiv reguliert werden können.

Kapitel 7

Ausblick

Neben den bereits in den Diskussionen zu den einzelnen Kapiteln aufgezeigten Möglichkeiten der weiteren Untersuchung des in dieser Arbeit aufgebauten Modellsystems, sollen zwei experimentelle Ansätze besonders erwähnt werden. Zum einen die bereits in früheren Arbeiten verwendete Flusskammer, zum anderen ein Experiment, bei dem die Verwendung von Antikörpern und der magnetischen Pinzette kombiniert werden. Zu beiden Ansätzen existieren bereits Vorversuche, die hier kurz dargelegt werden sollen.

Vorversuche zu Flusskammerexperimenten

Das laminare Scherfeld, dem Zellen oder Vesikel in einer Flusskammer ausgesetzt werden, stellt eine geeignete Methode dar, deren Adhäsionseigenschaften zu untersuchen (Simson et al. 1998, Lorz et al. 2000). Die in der hier verwendeten Flusskammer am Kammerboden anliegenden Scherkräfte liegen zwischen 0,04 und 2,25mPa. Vesikel mit eingebetteten Sialyl-Lewis^X-Lipiden und Lipopolymeren adhäreren zunächst ungestört auf einem Substrat mit E-Selektin. Dann wird der Scherfluss eingeschaltet und dessen Auswirkung auf die Vesikelkontur untersucht. Diese Art von Experiment ist deshalb besonders interessant, da die E-Selektin - Sialyl-Lewis^X-Wechselwirkung das Rollen von Leukozyten bei der Immunantwort vermittelt (vgl. dazu Kapitel 1). In vielen Studien werden aus diesem Grund die Rollbedingungen von Zellen oder spezifisch funktionalisierten Mikrokugeln untersucht (Vogel et al. 1998, Dong et al. 1999, Blackwell et al. 2001). Durch ein Experiment, bei dem Vesikel über eine funktionalisierte Oberfläche rollen, könnte die Lücke, die sich zwischen der Beobachtung lebender Zellen und starrer Mikrokugeln auftut, zumindest zum Teil geschlossen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Vesikel mit 15% sLe^X-Lipid und 1% PEG-2000 auf einer Oberfläche mit 900 bzw. 1700 E-Selektinmolekülen pro μm^2 nicht zum Rollen gebracht werden können. Es ist lediglich möglich, die Vesikel zu verformen, bzw. bei zu hoher Scherkraft zu zerstören, ohne die Adhäsionsfläche merklich zu beeinflussen. Allerdings konnte bei einer Oberfläche, die durch einen Fehler in der Präparation eine wesentlich niedrigere Anzahl aktiver E-Selektinmoleküle besaß,

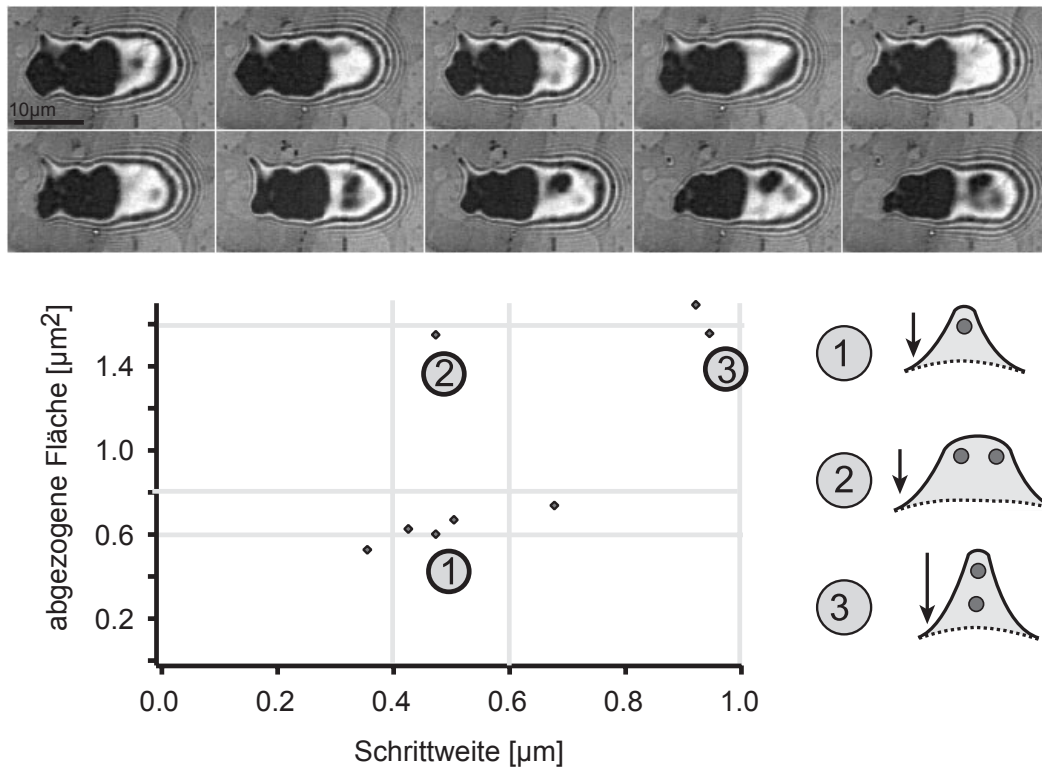


Abbildung 7.1: Vesikelrollen im laminaren Scherfeld. Der Zeitraum zwischen zwei Bildern beträgt 1 Sekunde. Die Adhäsionsfläche des Vesikels wird auf der dem Fluss zugewandten Seite schrittweise abgebaut und bildet sich auf der flussabgewandten Seite neu. Die Größe der in einem Schritt abgelösten Adhäsionsflächen wird analysiert und gegen den Durchmesser der Flächen in Flussrichtung aufgetragen. Die sich ergebende Verteilung lässt mögliche Rückschlüsse auf die Charakteristik der einzelnen Pinningzentren zu.

ein Rollvorgang beobachtet werden. Dabei löst sich der Vesikel an der dem Fluss zugewandten Seite schrittweise ab und bildet an der flussabgewandten Seite eine neue Adhäsionsfläche (vgl. Abbildung 7.1). Trägt man die Größe der abgelösten Adhäsionsflächen gegen den Durchmesser derselben (in Richtung des Scherflusses) auf, so ergibt sich ein interessantes Bild: Es bildet sich keine rein statistische Verteilung, sondern es sind drei Bereiche voneinander abgegrenzt. Ein Bereich (Bereich 1 in Abbildung 7.1) hat eine Schrittweite von etwa $0,45 \pm 0,05 \mu\text{m}$ bei einer abgelösten Fläche von etwa $0,6 \mu\text{m}^2$. Der nächste Bereich (2) hat eine doppelt so große abgelöste Fläche (ca. $1,4 \mu\text{m}^2$) bei gleichbleibender Schrittgröße. Der dritte Bereich schließlich zeigt im Vergleich zum ersten eine verdoppelte Schrittgröße von $1 \mu\text{m}$ und eine etwas mehr als verdoppelte Fläche (ca. $1,6 \mu\text{m}^2$). Eine mögliche Interpretation ist schematisch in Abbildung 7.1 angegeben: Es könnte sich um Flächen handeln, die durch verschieden viele Nukleationszentren gebildet werden,

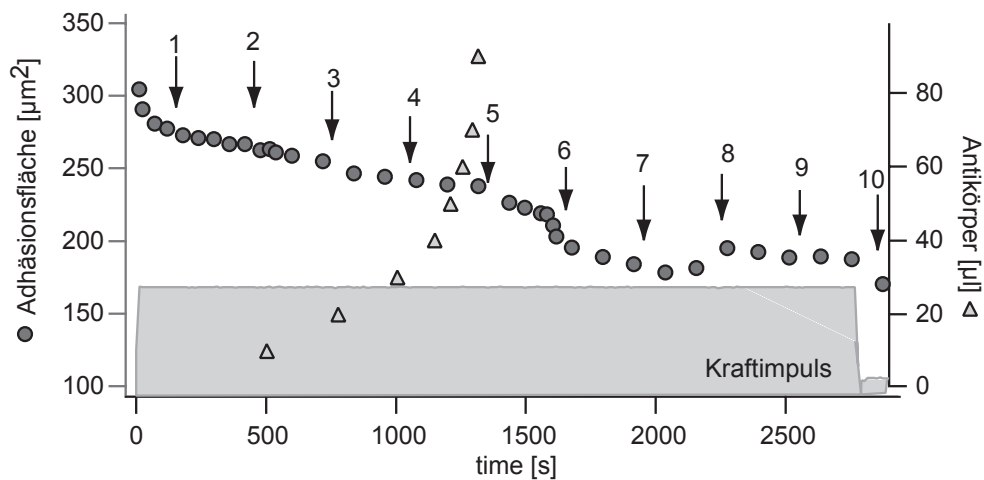
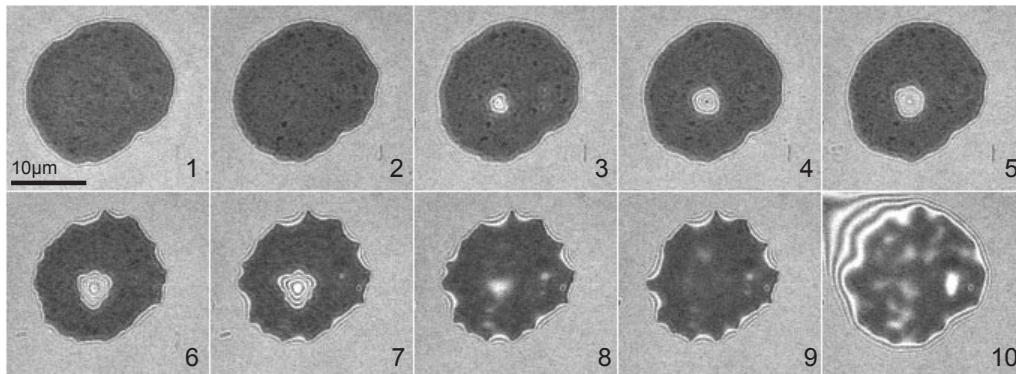


Abbildung 7.2: Während eines Kraftpulses werden Antikörper in das Adhäsionssystem gegeben. Dadurch ergibt sich eine gleichmäßig abnehmende Adhäsionsfläche, keine Sättigung auf ein konstantes Niveau.

die gegenüber der Flussrichtung auf unterschiedliche Weise angeordnet sind und gleichzeitig abgelöst werden. Bereich 1 gehört zu einem einzelnen Nukleationszentrum, für die doppelte Fläche bei gleicher Schrittweite (Bereich 2) werden zwei Nukleationszentren, die nebeneinander liegen, abgelöst und Bereich 3 ergibt sich beim Ablösen zweier hintereinander liegender Nukleationszentren.

Magnetische Pinzette kombiniert mit Antikörper-Experimenten

Eine interessante Möglichkeit, bereits vorhandene Experimentiertechniken miteinander zu kombinieren, bietet sich für die Experimente mit der magnetischen Pinzette an. Gibt man während eines Kraftpulses Antikörper in die Probe, so bildet sich bei ausreichender Konzentration der Antagonisten kein Sättigungsniveau der Adhäsionsfläche unter Einfluss der äußeren Kraft, wie dies in Kapitel 6 beschrieben wird, sondern die Adhäsionsfläche verkleinert sich kontinuierlich.

Ein Beispiel für ein solch kombiniertes Experiment ist in Abbildung 7.2 gegeben. Nach der schrittweisen Zugabe von $90\mu\text{l}$ Anti-E-Selektin nimmt die Adhäsionsfläche linear ab. Die zusätzliche Verkleinerung zwischen Bild 6 und Bild 8 wird durch die Vergrößerung und das anschließende Verschwinden des Blisters im Inneren der Adhäsionsfläche hervorgerufen. Die Adhäsionsfläche erscheint insgesamt sternförmig, da Punkte starker Adhäsion mit mehreren Rezeptor-Ligand-Bindungen länger erhalten bleiben als Einzelbindungen, die zwischen diesen Nukleationszentren liegen. Nach dem Abschalten der Kraft kann kein Anwachsen der Adhäsionsfläche beobachtet werden.

Ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Experimente könnte darin bestehen, mögliche Zusammenhänge zwischen der Geschwindigkeit, mit der sich die Adhäsionsfläche verkleinert, der Zusammensetzung des Systems und der Antikörperkonzentration aufzuklären.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4. Aufl., Garland Science.
- Ashkin, A. (1997). Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers, *PNAS* **94**: 4853 – 4860.
- Bell, G. I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells, *Science* **200**: 618 – 627.
- Bell, G. I., Dembo, M. & Bongrand, P. (1984). Competition Between Nonspecific Repulsion and Specific Bonding, *Biophysical Journal* **45**: 1051 – 1064.
- Bhatia, S. K., King, M. R. & Hammer, D. A. (2003). The State Diagram for Cell Adhesion Mediated by Two Receptors, *Biophysical Journal* **84**: 2671 – 2690.
- Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters* **56**(9): 930 – 934.
- Blackwell, J. E., Dagia, N. M., Dickerson, J. B., Berg, E. L. & Goetz, D. J. (2001). Ligand Coated Nanosphere Adhesion to E- and P-Selectin under Static and Flow Conditions, *Annals of Biomedical Engineering* **29**: 523 – 533.
- Born, M. & Wolf, E. (1999). *Principles of Optics*, 7. Aufl., Cambridge University Press.
- Brochard-Wyart, F., de Gennes, P. G. & Sandre, O. (2000). Transient pores in stretched vesicles: role of leak-out, *Physica A* **278**: 32 – 51.
- Bruinsma, R. (1995). Adhesion and rolling of leukocytes: a physical model, *Proc. of NATO advanced Institute on Physics of Biomaterials*, Vol. 322 of *NATO ASI*, p. 61.
- Bruinsma, R., Behrisch, A. & Sackmann, E. (2000). Adhesive switching of membranes: Experiment and theory, *Physical Review E* **61**(4): 4253–4267.
- Brunk, D. K. & Hammer, D. A. (1997). Quantifying rolling adhesion with a cell-free assay: E-selectin and its carbohydrate ligands, *Biophysical Journal* **72**: 2820 – 2833.

- Cevc, G. (1993). Thermodynamic properties of phospholipids, in G. Cevc (ed.), *Phospholipids Handbook*, Marcel Dekker Inc.
- Curtis, A. (1964). The mechanism of adhesion of cells to glass, a study by interference reflection microscopy, *Journal of Cell biology* **20**: 199 – 215.
- Dembo, M., Torney, D. C., Saxman, K. & Hammer, D. (1988). The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B : Biological Sciences* **234**: 55 – 83.
- Dichtl, M. (1997). *Anwendung kolloidaler Sonden zur Untersuchung der Reptation von Aktinfilamenten*, Diplomarbeit, Technische Universität München.
- Dietrich, C. (1995). *Untersuchung der adsorptiven Wechselwirkung von wasserlöslichen Proteinen und Proteinsegmenten mit Lipidmonofilmen mit Hilfe von Fluoreszenz- und Filmwaagenmessungen*, Dissertation, Technische Universität München.
- Dimitrov, D. S. & Angelova, M. I. (1988). Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **253**(2): 323 – 336.
- Döbereiner, H. G., Käs, J., Noppl, D., Sprenger, I. & Sackmann, E. (1993). Budding and Fission of Vesicles, *Biophysical Journal* **65**: 1396 – 1403.
- Dong, C., Cao, J., Struble, E. J. & Lipowsky, H. H. (1999). Mechanics of Leukocyte Deformation and Adhesion to Endothelium in Shear Flow, *Annals of Biomedical Engineering* **27**: 298 – 312.
- Engelhardt, J. & Knebel, W. (1993). Konfokale Laserscanning-Mikroskopie, *Physik in unserer Zeit* **24**(2): 70 – 78.
- Evans, E. & Ritchie, K. (1997). Dynamic strength of molecular adhesion bonds, *Biophysical Journal* **72**: 1541 – 1555.
- Feneberg, W., Westphal, M. & Sackmann, E. (2001). Dictyostelia Cells Cytoplasm as Active Viscoplastic Body, *European Biophysics Journal* **30**: 284 – 294.
- Gabius, H.-J. & Gabius, S. (eds) (1997). *Glycosciences – Status and Perspectives*, 1. Aufl., Chapman and Hall.
- Garidel, P. & Blume, A. (2000). Miscibility of phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and acyl chain length, *European Biophysics Journal* **28**: 629 – 638.

- Gege, C. (2001). *Synthetische und analytische Strategien zur Untersuchung der homophilen Kohlenhydrat-Wechselwirkung*, Dissertation, Universität Konstanz.
- Gege, C., Oscarson, S. & Schmidt, R. R. (2001). Synthesis of fluorescence labeled Sialyl LewisX glycosphingolipids, *Tetrahedron Letters* **105**: 5178 – 5185.
- Geyer, A., Gege, C. & Schmidt, R. R. (2000). Calcium-dependent carbohydrate-carbohydrate recognition between LewisX blood group antigens, *Angewandte Chemie (int. ed.)* **39**(18): 3245 – 3249.
- Gönnenwein, S. (2003). *Generic and Specific Cell Adhesion: Investigations of a Model System by Micro-Interferometry*, Dissertation, Technische Universität München.
- Greenberg, A. W., Brunk, D. K. & Hammer, D. A. (2000). Cell-free rolling mediated by L-selectin and Sialyl LewisX reveals the shear threshold effect, *Biophysical Journal* **79**: 2391 – 2402.
- Guttenberg, Z. (2001). *Zelladhäsion als Benetzungsübergang: Mikrooptische und mikromechanische Untersuchung eines biomimetischen Modellsystems*, Dissertation, Technische Universität München.
- Guttenberg, Z., Bausch, A. R., Hu, B., Bruinsma, R., Moroder, L. & Sackmann, E. (2000). Measuring ligand-receptor unbinding forces with magnetic beads: molecular leverage, *Langmuir* **16**(23): 8984 – 8993.
- Guttenberg, Z., Lorz, B., Sackmann, E. & Boulbitch, A. (2001). First-order transition between adhesion states in a system mimicking cell-tissue interaction, *Europhysics Letters* **54**(6): 826 – 832.
- Häckl, W., Seifert, U. & Sackmann, E. (1997). Effects of fully and partially solubilized amphiphiles on bilayer bending stiffness and temperature dependence of the effective tension of giant vesicles, *Journal de Physique II France* **7**: 1141 – 1157.
- Hansen, C. B., Kao, G. Y., Moase, E. H., Zalipsky, S. & Allen, T. M. (1995). Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures, *Biochimica et Biophysica Acta* **1239**: 133 – 144.
- Hecht, E. (1987). *Optics*, 2. Aufl., Addison-Wesley Publishing Company.
- Heilbronn, A. (1922). Eine neue Methode zur Bestimmung der Viskosität lebender Protoplasten, *Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik* **61**: 284 – 338.

- Helfrich, W. & Servuss, R.-M. (1984). Undulations, steric interactions and cohesion of fluid membranes, *Il nuovo cimento* **3**(1): 137 – 151.
- Hirshfeld, C. L. & Seul, M. (1989). Critical mixing in monomolecular films: pressure-composition phase diagram of a two dimensional binary mixture, *Journal de Physique* **51**: 1537 – 1552.
- Horwitz, A. F. (1998). Integrine, *Spektrum der Wissenschaft* **1**: 86 – 94.
- Israelachvili, J. N. (1991). *Intermolecular and Surface Forces*, 2. Aufl., Academic Press, Kapitel 11.
- Joanny, J. F. & de Gennes, P. G. (1984). A model for contact angle hysteresis, *The Journal of Chemical Physics* **81**(1): 552 – 562.
- Keller, M., Schilling, J. & Sackmann, E. (2001). Oscillatory magnetic bead rheometer for complex fluid microrheometry, *Review of Scientific Instruments* **72**: 3626 – 3634.
- Kern, W. & Puotinen, D. A. (1970). Cleaning solutions based on hydrogen peroxide for use in silicon semiconductor technology, *RCA Review* pp. 187 – 206.
- Kloboucek, A. (1998). *Rekonstitution von amphiphilen Zell-Rezeptoren in Modellmembranen: Untersuchung der lateralen Organisation und Funktion*, Dissertation, Technische Universität München.
- Kloboucek, A., Behrisch, A., Faix, J. & Sackmann, E. (1999). Adhesion-Induced Receptor Segregation and Adhesion Plaque Formation: A Model Membrane Study, *Biophysical Journal* **77**: 2311 – 2328.
- Kraus, M., Seifert, U. & Lipowsky, R. (1995). Gravity-induced shape transformations of vesicles, *Europhysics Letters* **32**(5): 431 – 436.
- Kühner, M. (1996). *Präparation und Charakterisierung von Polysaccharid-Monofilmen, Lipid-Doppelschichten und Polysaccharid-Lipid-Verbundfilmen auf Festkörperoberflächen*, Dissertation, Technische Universität München.
- Landau, L. D. & Lifschitz, E. M. (1987). *Lehrbuch der Theoretischen Physik V: Statistische Physik Teil 1*, Akademie Verlag, Kapitel 9.
- Landau, L. D. & Lifschitz, E. M. (1989). *Lehrbuch der Theoretischen Physik VII: Elastizitätstheorie*, Akademie Verlag, Kapitel 2.
- Lipowsky, R. (1992). Budding of membranes induced by intramembrane domains, *Journal de Physique II France* **2**(10): 1825 – 1840.

- Lipowsky, R. & Leibler, S. (1986). Unbinding transitions of interacting membranes, *Physical Review Letters* **56**(23): 2541 – 2544.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. E. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4. Aufl., W. H. Freeman.
- Lorz, B. (1999). *Aufbau und Charakterisierung eines Modellsystems zur Untersuchung der physikalischen Grundlagen der Zell-Gewebe-Wechselwirkung*, Diplomarbeit, Universität Leipzig.
- Lorz, B., Simson, R., Nardi, J. & Sackmann, E. (2000). Weakly adhering vesicles in shear flow: Tanktreading and anomalous lift force, *Europhysics Letters* **51**(4): 468 – 474.
- Lorz, C. (2003). *Der Einfluss von unspezifischen Immunkomplexen und einigen genau definierten Polymeren auf cholesterolhaltige Lipoproteine - ein in-vitro Modellversuch*, Dissertation, Technische Universität München.
- Mabrey, S. & Sturtevant, J. M. (1976). High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems, in E. D. Korn (ed.), *Methods in Membrane Biology*, Plenum Press, Kapitel 3.
- Maggio, B., Ariga, T., Sturtevant, J. M. & Yu, R. K. (1985). Thermotropic behaviour of binary mixtures of dipalmitoylphosphatidylcholine and glycosphingolipids in aqueous solutions, *Biochimica et Biophysica Acta* **818**: 1 – 12.
- Mammen, M., Choi, S.-K. & Whitesides, G. (1998). Polyvalent interactions in biological systems: implication for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angewandte Chemie (int. ed.)* **37**: 2754 – 2794.
- Marx, S., Schilling, J., Sackmann, E. & Bruinsma, R. (2002). Helfrich repulsion and dynamical phase separation of multicomponent lipid bilayers, *Physical Review Letters* **88**(13): 138102.
- Mathe, G. (2000). *Untersuchung der statischen und dynamischen Quell- und Benetzungseigenschaften von festkörpergestützten biokompatiblen Polymerfilmen*, Dissertation, Technische Universität München.
- McElhaney, R. N. (1986). Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems, *Biochimica et Biophysica Acta* **864**: 361 – 421.
- Merkel, R. (2001). Force Spectroscopy on single passive biomolecules and single biomolecular bonds, *Physics Reports* **346**: 343 – 385.

- Milner, S. T. & Roux, D. (1992). Flory theory of the unbinding transition, *Journal de Physique I France* **2**: 1741 – 1754.
- Nardi, J. (1998). *Non-equilibrium phenomena of free and bound vesicle: modeling cell adhesion and vesicle transport*, Dissertation, Technische Universität München.
- Nardi, J., Bruinsma, R. & Sackmann, E. (1998). Adhesion Induced Reorganisation of charged fluid membranes, *Physical Review E* **58**: 6340 – 6354.
- Nguyen-Duong, M. C. (2002). *Chemische Kinetik einzelner spezifischer Bindungen unter Einfluss einer mechanischen Kraft*, Dissertation, Technische Universität München.
- Petri, D. S. F., Wenz, G., Schunk, P. & Schimmel, T. (1999). An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers, *Langmuir* **15**(13): 4520 – 4523.
- Ploem, J. S. (1975). Reflection contrast microscopy as a tool for investigation of the attachment of living cells to a glass surface, in R. van Furth (ed.), *Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection, and Pathology*, Blackwell scientific publications.
- Plotnikov, V. V., Brandts, J. M., Lin, L.-N. & Brandts, J. F. (1997). A New Ultrasensitive Scanning Calorimeter, *Analytical Biochemistry* **250**: 237 – 244.
- Prechtel, K., Bausch, A. R., Marchi-Artzner, V., Kantlehner, M., Kessler, H. & Merkel, R. (2002). Dynamic Force Spectroscopy to Probe Adhesion Strength of Living Cells, *Physical Review Letters* **89**(2): 028101.
- Radhakrishnan, A. & McConnell, H. M. (1999). Cholesterol-Phospholipid Complexes in Membranes, *Journal of the American Chemical Society* **121**: 486 – 487.
- Rädler, J. O. (1993). *Über die Wechselwirkung fluider Phospholipid-Membranen mit Festkörperoberflächen*, Dissertation, Technische Universität München.
- Rädler, J. O., Feder, T. J., Strey, H. H. & Sackmann, E. (1995a). Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates, *Physical Review E* **51**(5): 4526 – 4536.
- Rädler, J. O. & Sackmann, E. (1993). Imaging optical thickness and separation distances of phospholipid vesicles and solid surfaces, *Journal de Physique II France* **3**: 727 – 748.
- Rädler, J. O., Strey, H. H. & Sackmann, E. (1995b). Phenomenology and Kinetics of lipid Bilayer spreading on Hydrophilic Surfaces, *Langmuir* **11**: 4539 – 4548.

- Sackmann, E. (1994). Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions, *FEBS Letters* **346**: 3 – 16.
- Sackmann, E. (1995). Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles, in R. Lipowsky & E. Sackmann (eds), *Handbook of Biological Physics*, Elsevier Science B.V., Kapitel 5.
- Schilling, J. (1999). *Entwicklung einer Echtzeit-Bildverarbeitungssoftware und digitaler Videoaufnahmetechnik zur quantitativen Mikrorheometrie von Aktin-Netzwerken.*, Diplomarbeit, Technische Universität München.
- Schilling, J., Sengupta, K., Goennenwein, S., Bausch, A. & Sackmann, E. (2003). Measurement of Absolute Interfacial Separation by Dual Wavelength Reflection Interference Contrast Microscopy, *in prep* .
- Schindl, M., Wallraff, E., Deubzer, B., Witke, W., Gerisch, G. & Sackmann, E. (1995). Cell-substrate interactions and locomotion of Dictyostelium wild-type and mutants defective in three cytoskeletal proteins: a study using quantitative reflection interference contrast microscopy, *Biophysical Journal* **68**: 1177 – 1190.
- Schmidt, F. G., Hinner, B. & Sackmann, E. (2000). Microrheometry underestimates the values of the viscoelastic moduli in measurements on F-actin solutions compared to macrorheometry, *Physical Review E* **61**(5): 5646 – 5653.
- Seifert, U. (1995). Self-consistent theory of bound vesicles, *Physical Review Letters* **74**(25): 5060 – 5063.
- Seifert, U. & Lipowsky, R. (1990). Adhesion of vesicles, *Physical Review A* **42**: 4768 – 4771.
- Simanek, E. E., McGarvey, G. J., Jablonowski, J. A. & Wong, C.-H. (1998). Selectin-carbohydrate interactions: From natural ligands to designed mimics, *Chemical Reviews* **98**: 833–862.
- Simson, R., Wallraff, E., Faix, J., Niewöhner, J., Gerisch, G. & Sackmann, E. (1998). Membrane Bending Modulus and Adhesion Energy of Wild-Type and Mutant Cells of Dictyostelium lacking Talin or Cortexillins, *Biophysical Journal* **74**: 514 – 522.
- Smith, A., Seifert, U. & Sackmann, E. (2003). Effect of a pulling force on the shape of a bound vesicle, *submitted to European Physics Letters* .
- Symington, F. W., Hedges, D. L. & Hakamori, S. I. (1985). Glycolipid antigens of human polymorphonuclear and the inducible HL-60 myeloid leukemia neutrophils line, *Journal of Immunology* **134**: 2498 – 2506.

- Torney, D. C., Dembo, M. & Bell, G. I. (1986). Thermodynamics of cell adhesion II, *Biophysical Journal* **49**: 501 – 507.
- Valberg, P. A. & Butler, J. P. (1987). Magnetic Particle Motions within Living Cells-Physical Theory and Techniques, *Biophysical Journal* **537 - 550**.
- Vestweber, D. & Blanks, J. E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands, *Physiological Reviews* **79**(14): 181 – 213.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*, 2. Aufl., John Wiley and Sons.
- Vogel, J., Bendas, G., Bakowsky, U., Hummel, G., Schmidt, R. R., Kettmann, U. & Rothe, U. (1998). The role of glycolipids in mediating cell adhesion: a flow chamber study, *Biochimica et Biophysica Acta* **1372**: 205 – 215.
- Weinstein, J. N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R. & Hagins, W. A. (1977). Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker, *Science* **195**: 489 – 491.
- Wiegand, G., Jaworec, T., Wegner, G. & Sackmann, E. (1997). Studies of Structure and Local Wetting Properties on Heterogeneous, Micropatterned Solid Surfaces by Microinterferometry, *Journal of Colloidal and Interface Science* **196**: 299 – 312.
- Wiegand, G., Neumaier, K. R. & Sackmann, E. (1998). Microinterferometry: three-dimensional reconstruction of surface microtopography for thin-film and wetting studies by RICM, *Applied Optics* **37**(29): 6892 – 6904.
- Wild, M. K., Huang, M.-C., Schulze-Horsel, U., van der Merwe, P. A. & Vestweber, D. (2001). Affinity, kinetics and thermodynamics of E-selectin binding to E-selectin ligand-1, *The Journal of Biological Chemistry* **276**(34): 31602 – 31612.
- Yao, J. H., Elder, K. R., Guo, H. & Grant, M. (1993). Theory and simulation of Ostwald ripening, *Physical Reviews B* **47**(21): 47 – 61.
- Zantl, R. (2001). *Flüssigkristalle aus DNA und kationischen Lipidmembranen: Struktur und Phasenverhalten*, Dissertation, Technische Universität München.
- Ziemann, F. (1997). *Untersuchungen der lokalen viskoelastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mit einem Magnetkugel-Mikrorheometer („Magnetic Tweezer“)*, Dissertation, Technische Universität München.