

**Laterale Organisation von Shiga Toxin gebunden
an Gb₃-haltige Modellmembranen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Barbara Windschiegl
aus Neustadt a. d. Waldnaab

Göttingen 2008

D 7

Referent: Prof. Dr. Claudia Steinem

Korreferent: Prof. Dr. Tim Salditt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2009

Die Doktorarbeit wurde an der Universität Regensburg, Fakultät für Chemie, Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, im März 2005 unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem begonnen und von April 2006 bis Dezember 2008 an der Universität Göttingen, Fakultät für Chemie, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie bei Prof. Dr. Claudia Steinem fertiggestellt.

Meinen Eltern

Abstract. The aim of this study was to elucidate lateral organization of bound STxB (Shiga Toxin, B-subunit) and the reorganization of lipids upon protein binding by means of high-resolution scanning force (SFM) and fluorescence microscopy.

The formation of 2.2 nm high STxB-clusters was observed upon binding of the protein to solid supported bilayers composed of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)/sphingomyelin/cholesterol/Gb₃ (40:35:20:5) or DOPC/cholesterol/Gb₃ (65:30:5). The determined protein height is 10 % higher than that of the crystal structure, which can be attributed to STxB-induced membrane thickening, being a result of accumulation and compaction of Gb₃-molecules.

The binding site III of STxB was identified to be responsible for membrane thickening, which was deduced from experiments using STxB-W34A, a protein in which binding site III was mutated. Protein clusters with a height of only 1.6 nm were observed.

Labeling of lipid bilayers with fluorescent dyes enabled us to visualize the organization of coexisting liquid-disordered (*l_d*) and liquid-ordered (*l_o*) domains in membranes composed of DOPC/sphingomyelin/cholesterol/Gb₃ (40:35:20:5) before and after protein binding. The redistribution of the fluorophore perylene from the *l_o*- into the *l_d*-phase upon protein addition was observed. Furthermore, the circularity and the surface area of the *l_d*-phase increased. From these observations, we concluded a higher lipid packing density of the lipids induced by STxB binding.

Another aim of this study was to investigate the influence of fatty acids in Gb₃ containing double bounds on clustering of STxB as well as the influence on lipid packing induced by protein binding. The presence of double bounds in acyl chains of Gb₃ avoided dense packing of the lipids and affected lateral clustering of bound STxB.

Besides the observed STxB induced lipid reorganization in solid supported bilayers, lipid monolayers at the air/water interface were used to study the organization of lipids by means of fluorescence microscopy in a more dynamic membrane system. STxB is capable of inducing a more condensed lipid phase probably enriched in Gb₃.

From the obtained results we conclude that STxB reorganizes lipid bilayers resulting in lipid compaction. The lipid phase is probably enriched in Gb₃, which might be a prerequisite for Clathrin-independent endocytosis of STxB.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Shiga Toxin	1
1.2	Globotriaosylceramid (Gb ₃)	6
1.3	Vom <i>fluid mosaic</i> Modell zur <i>raft</i> -Hypothese	7
1.4	Rekonstitution STxB-induzierter Membraninvaginationen an <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>	11
1.5	Krümmung und laterale Organisation in Membranen.....	14
2	Zielsetzung	19
3	Materialien und Methoden.....	21
3.1	Verwendete Substanzen	21
3.1.1	Lipide.....	21
3.1.2	Fluoreszenzsonden	23
3.1.3	Shiga Toxin und anti-Gb ₃	25
3.2	Vesikelspreittechnik	25
3.3	Filmwaagetechnik	26
3.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	29
3.5	Rasterkraftmikroskopie	33
3.5.1	Die Entwicklung vom Lichtmikroskop zum Rasterkraftmikroskop	33
3.5.2	Messprinzip	34
3.5.3	Kräfte in der Rasterkraftmikroskopie.....	36
3.5.4	Betriebsmodi	40
3.5.5	Artefakte und technische Schwierigkeiten	43

4	Ergebnisse	47
4.1	STxB-Bindung an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40/35/20/5)- Lipiddoppelschichten	47
4.2	STxB-Bindung an DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5)-Lipiddoppelschichten	62
4.3	STxB-Bindung an DOPC/Gb ₃ (95:5)-Lipiddoppelschichten.....	71
4.4	Einfluss der molekularen Struktur des Rezeptorlipids Gb ₃ auf die STxB-Bindung	80
4.5	STxB-Bindung an Lipidmonoschichten.....	92
5	Diskussion.....	99
5.1	Charakterisierung von Lipiddoppelschichten mit immobilisiertem nativen Gb ₃ vor Proteinzugabe.....	100
5.2	Bildung von STxB-Clustern durch Bindung an Gb ₃ (nativ)-haltige Lipiddoppelschichten	105
5.3	STxB-induzierte Lipidreorganisation in Gb ₃ (nativ)-haltigen Lipiddoppelschichten	108
5.4	STxB-induzierte Lipidreorganisation und Phasenseparation in Gb ₃ (nativ)- haltigen Lipidmonoschichten.....	110
5.5	Einfluss der molekularen Struktur des Rezeptorlipids Gb ₃ auf die STxB-Bindung	113
5.6	Modell der Bindung von STxB an Gb ₃ -haltige Membranen	117
6	Zusammenfassung.....	123
7	Literaturverzeichnis.....	125

8	Anhang	137
8.1	Symbolverzeichnis	137
8.2	Abkürzungsverzeichnis	138
8.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	139
8.4	Geräte	140
8.5	Abbildungsverzeichnis	141

1 Einleitung

1.1 Shiga Toxin

Shiga Toxin ist ein bakterielles Toxin, das von *Shigella dysenteriae* produziert wird und zur Familie der AB₅-Toxine gehört. Verotoxin I (früher auch Shiga-like Toxin I) wird von bestimmten enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC), auch shigatoxinbildende *E. coli* (STEC) genannt, produziert und unterscheidet sich von Shiga Toxin nur durch den Austausch einer Aminosäure (Thr45 statt Ser45) in der A-Untereinheit. Die B-Untereinheiten beider Toxine sind identisch, weshalb die Begriffe Verotoxin I und Shiga Toxin häufig als Synonyme verwendet werden (1). EHEC-Stämme spielen bei Lebensmittelinfektionen eine wichtige Rolle und können unter anderem durch Aufnahme von verdorbenem Fleisch oder fäkaliellverseuchtem Trinkwasser in den Körper gelangen. Eine Infektion führt zunächst zur Diarrhö und entwickelt sich häufig zu einer enterohämorrhagischen Colitis, was in 10 % der Fälle zum hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) führen kann. HUS ist die Hauptursache für akutes Nierenversagen bei Kindern und führt nicht selten zum Tod (2). Die Bekämpfung des Erregers mit Antibiotika ist nicht sinnvoll, da dies das Krankheitsbild sogar verschlimmern kann. Die Entwicklung neuer Therapeutika ist daher notwendig, um Krankheiten, die von EHEC-Stämmen und *Shigella dysenteriae* verursacht werden, erfolgreich zu bekämpfen (1).

Struktur und Gb₃-Bindungsstellen von STxB

Shiga Toxin besteht aus einer A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten und zählt mit ca. 39 kDa zu den kleinsten Lectinen (kohlenhydratbindende Proteine). Die monomere A-Untereinheit ist die toxische Komponente des Shiga Toxins und besitzt enzymatische N-Glykosidaseaktivität, die zur Inhibition der Proteinbiosynthese und somit zum Zelltod führt. Fünf B-Untereinheiten bilden ein stabiles Homopentamer (STxB), das für die Rezeptorbindung, die Internalisierung und den intrazellulären Transport des Holotoxins verantwortlich ist. Das Glycosphingolipid Globotriaosylceramid (Gb₃ oder CD77) ist dabei der natürliche Rezeptor für Shiga Toxin (siehe Kapitel 1.2) (3). Die A-Untereinheit ist nicht-kovalent mit der B-Untereinheit verbunden.

Die dreidimensionale Struktur von Shiga Toxin (Abb. 1-1 **A**) und STxB (Abb. 1-1 **B**) wurde bereits durch Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Röntgenstrukturanalyse gelöst (4-6). Ein Monomer der B-Untereinheit besteht aus 69 Aminosäuren (7,7 kDa) und enthält sechs β -Faltblätter sowie eine α -Helix (Abb. 1-1 **C**). Zwei dreisträngige, anti-parallele β -Faltblätter bilden ein β -Fass (engl. *β -barrel*) aus, das von einer α -Helix verschlossen wird (Abb. 1-2 **A**). Die dreisträngigen β -Faltblätter von benachbarten Monomeren wechselwirken jeweils über die Grenzfläche der Untereinheiten miteinander. Die α -Helices bilden eine zentrale Pore mit einem Durchmesser von ca. 11 Å (Abb. 1-1 **B**).

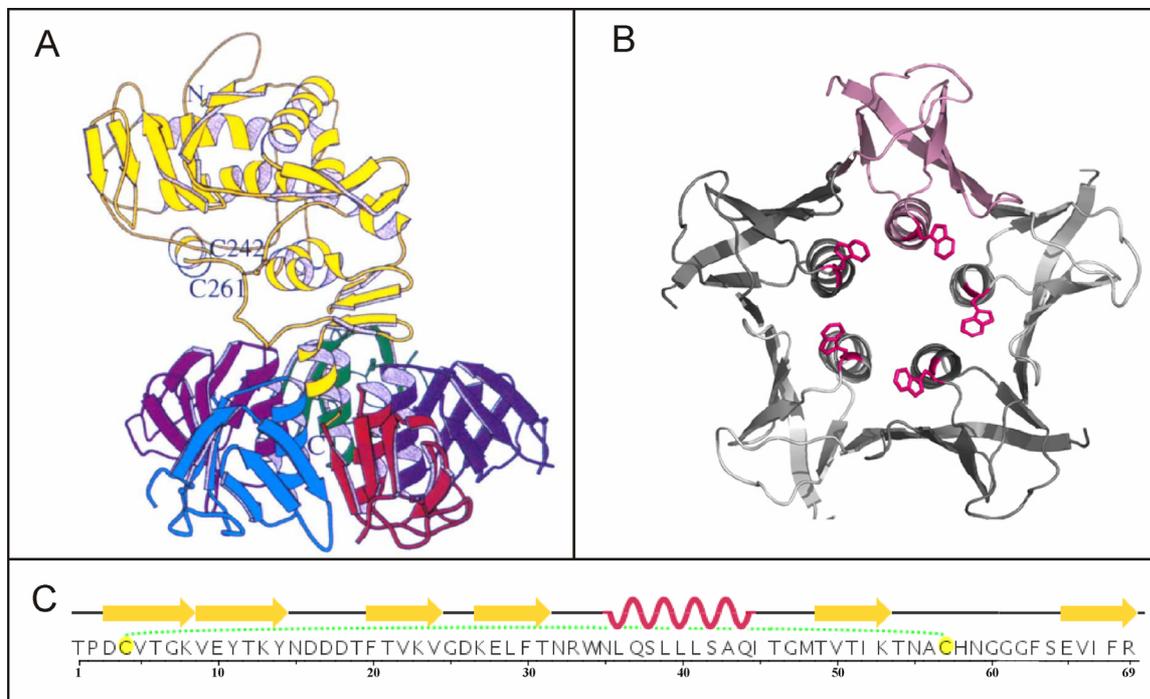


Abb. 1-1: **A** Kristallstruktur des Shiga Toxins: Oberhalb der B-Untereinheiten ist die A-Untereinheit in gelb dargestellt, wobei der N- und C-Terminus gekennzeichnet sind (N, C). C242 und C261 markieren zwei Cysteine, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind (4). **B** Kristallstruktur von STxB: Die Lokalisation der Tryptophanreste (W34) an den α -Helices ist dargestellt (7). **C** Primär- und Sekundärstruktur von STxB (PDB 1BOS).

STxB besitzt drei Bindungsstellen für Gb₃ (*Site I, II, II*) (Abb. 1-2). Die Bindungsstelle I ist an der Kluft zwischen zwei benachbarten Monomeren lokalisiert, wobei hier hydrophobe Stapelwechselwirkungen des Phe30-Aminosäurerestes mit der terminalen Galactose des Gb₃, sowie Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Resten eine Rolle spielen. Bei der zweiten Bindungsstelle (*Site II*) werden hauptsächlich

Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Trisaccharid des Gb₃ verantwortlich gemacht. Es wird vermutet, dass diese Bindungsstelle eine höhere Affinität zu Gb₃ besitzt als *Site* I. Die dritte Bindungsstelle besitzt die niedrigste Affinität zu Gb₃ und ist am N-terminalen Ende der α -Helix lokalisiert. Im Pentamer sind diese Bindungsstellen um die zentrale Pore angeordnet. Hydrophobe Stapelwechselwirkungen des Tryptophanrestes Trp34 (W34) sind für die Bindung an Gb₃ verantwortlich (1, 7). Obwohl die Bindungsstelle III aufgrund der niedrigen Bindungsaffinität zu Gb₃ nicht wichtig für die Bindung von STxB an die Zelle ist, wird vermutet, dass diese für andere Funktionen, wie die Bindung von zusätzlichen Gb₃-Molekülen innerhalb der Membran, von Bedeutung ist (1). Die hohe Anzahl der Bindungsstellen von STxB lässt eine Rolle von kooperativen Effekten für die Gb₃-Bindung vermuten. Die B-Untereinheit von Cholera Toxin, ein dem Shiga Toxin strukturell ähnliches Protein, besitzt im Gegensatz dazu nur eine Bindungsstelle für seinen Rezeptor G_{M1} (8).

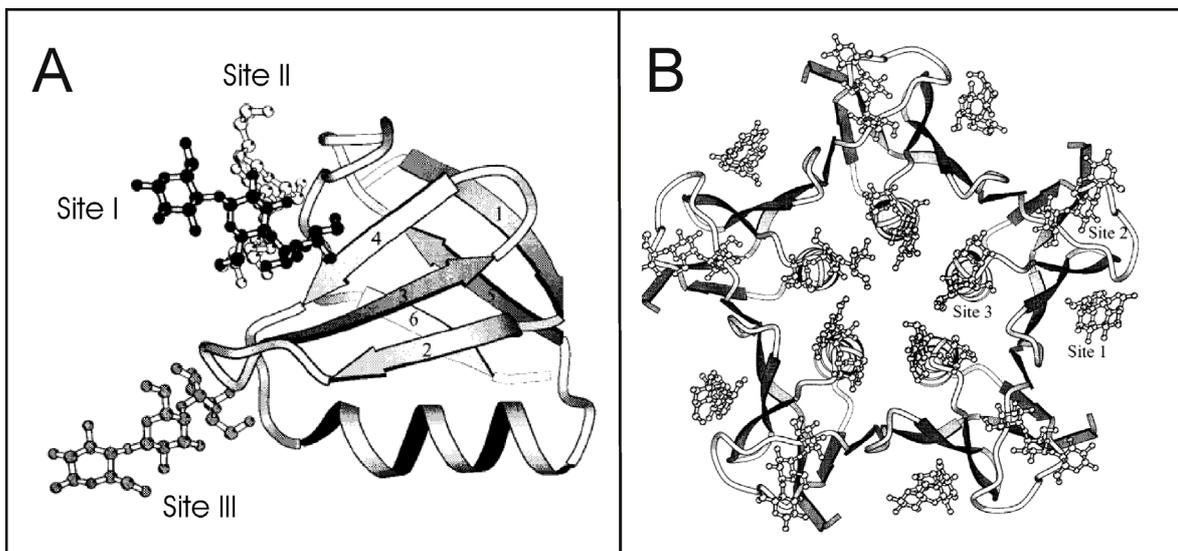


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Gb₃-Bindungsstellen (*Site* I, II und III von STxB. **A** STxB-Monomer und **B** STxB-Pentamer (1).

Zelluläre Funktionen von Shiga Toxin

Der Shiga Toxin-Rezeptor-Komplex kann durch Clathrin-unabhängige Endozytose in die Zelle gelangen (9-14). Über den retrograden Transportweg wird Shiga Toxin von frühen Endosomen zum Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Die A-Untereinheit durchquert die ER-Membran über den Transportweg der Retro-

Translokation und gelangt so ins Cytosol, wo die toxische Wirkung eintritt (3). Die B-Untereinheit besitzt keine toxische Aktivität und kann dadurch als nützliches Werkzeug zur Erforschung des retrograden Transportweges dienen (9). Nur wenige Proteine können über den retrograden Weg transportiert werden, da die meisten Proteine nach erfolgter Endozytose in Lysosomen degradiert oder zur Plasmamembran zurück transportiert werden (13). In der medizinischen Forschung wird STxB deshalb u. a. als Vektor benutzt, um Epitope in das Cytosol zu transportieren und eine Immunantwort zu induzieren (7). Mittlerweile sind viele Endozytosewege bekannt. Neben der klassischen Clathrin-abhängigen werden einige Clathrin-unabhängige Endozytose-Möglichkeiten beschrieben, wie beispielsweise die Bildung von *Caveolae*, die oft mit Mikrodomänen, sogenannten *rafts* (siehe Kapitel 1.3), in Verbindung gebracht werden. Bei der Bildung von Endosomen spielen häufig Hüllproteine, wie Clathrin oder Caveolin, eine wichtige Rolle, die letztendlich die gebildeten Vesikel umschließen (15). Die Endozytose von STxB kann sowohl Clathrin- als auch Caveolin-unabhängig ablaufen. Kürzlich wurde ein neuer Endozytoseweg für Shiga Toxin beschrieben, bei dem an Zellen und Modellmembranen nach Inkubation mit Toxin tubuläre Membraninvaginationen beobachtet wurden (Abb. 1-3) (16).

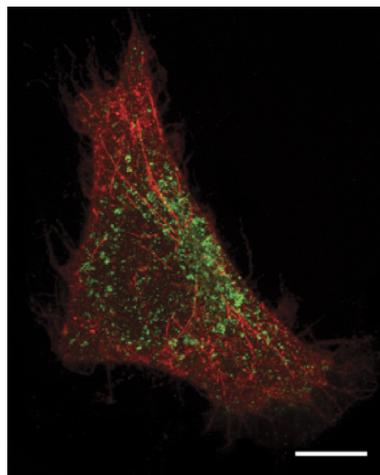


Abb. 1-3: Bildung von Membraninvaginationen in Energie-verarmten HeLa-Zellen nach Inkubation mit STxB (rot). Die tubulären Strukturen sind nicht mit Transferrin-Rezeptoren (grün), Marker für Clathrin-abhängige Endozytose, kolokalisiert (16). Maßstab: 5 µm.

Die Häufigkeit der STxB-Einstülpungen stieg nach ATP-Verarmung in Zellen und nach Inhibition der Dynamin- und Aktinfunktion. Dynamin und Aktin gelten dabei als wichtige Faktoren bei der Abspaltung von Endosomen von der Plasmamembran. Es wird daher vermutet, dass aktive zelluläre Prozesse zwar wichtig für die Abschnürung der STxB-Invaginationen, aber unwesentlich für die Ausbildung der tubulären Strukturen sind. Römer et al. (16) schlussfolgerten, dass ein dynamisches Clustering des STxB-Gb₃-Komplexes für die Bildung der Invaginationen verantwortlich ist. Aus Experimenten mit dem polarisationssensitiven Membranfarbstoff Laurdan wird eine Verdichtung der Anordnung der Lipide durch die Proteinbindung vermutet (16, 17).

Bei der Bindung von STxB an Gb₃ sind vermutlich Mikrodomänen in der Plasmamembran von Bedeutung (18). So wurden sowohl der Rezeptor Gb₃ als auch STxB in detergensresistenten Membranen (DRMs) detektiert (19-23). Außerdem wurde eine Kolokalisation von STxB mit dem *raft*-Marker CTxB beschrieben (24). Falguières et al. (20) beobachteten eine verstärkte Rekrutierung von Gb₃ zu DRMs nach STxB-Bindung, was für eine Reorganisation von Membranlipiden durch die Proteinbindung spricht. Der Einfluss von Cholesterin, ein Lipid das in *rafts* angereichert ist, auf die STxB-Bindung wurde in wenigen Studien untersucht. Kovbasnjuk et al. (24) konnten zeigen, dass der Entzug von Cholesterin in Caco-2 Zellmembranen die STxB-Bindung zwar nicht inhibiert, aber einen großen Effekt auf den Transfer von STxB über die apikale Membran hat. In einer Studie mit *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) konnte kein Einfluss von Cholesterin auf die Bildung von durch STxB-Gb₃-Bindung induzierte Membraninvaginationen beobachtet werden (siehe Kapitel 1.3). Allerdings war die Anwesenheit von Cholesterin für die Abschnürung von in Zellen beobachteten tubulären Invaginationen wichtig, deren Bildung durch STxB induziert wurde (16).

1.2 Globotriaosylceramid (Gb₃)

Globotriaosylceramid (Gb₃ oder CD77) ist ein Glycosphingolipid und der funktionelle Rezeptor für STxB. Die Bezeichnung CD77 wurde durch die Nomenklatur der „*Cluster of Differentiation*“ (CD) festgelegt. Diese benennt Zelloberflächenmoleküle (CD-Antigene), welche von bestimmten monoklonalen Antikörpern (CD-Marker) erkannt werden (25, 26). Die Expression von Gb₃ in der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran von Zellen weist starke Schwankungen auf und ist abhängig vom Zelltyp und Zellstadium (27). So exprimieren beispielsweise Epithelzellen des Darms eine verhältnismäßig große Menge des Glycolipids, was eine effiziente Bindung von Shiga Toxin an diese Zellen ermöglicht. Außerdem wurde die Anreicherung von Gb₃ in bestimmten Tumorzellen beobachtet. Typischerweise ist es im Burkitt-Lymphom, ein malignes Lymphom, welches vor allem in Afrika zu den häufigsten Tumorerkrankungen bei Kindern zählt, überexprimiert (20). Gewebeproben von Magen-, Darm-, Hoden-, Brust- und Hirntumoren weisen ebenfalls eine erhöhte Menge an Gb₃ auf (28, 29). Im Hinblick auf die Überexpression von Gb₃ in menschlichen Krebszellen wird der Einsatz des natürlichen Liganden STxB für das *Targeting* von Tumorzellen vorgeschlagen (27). Die physiologische Funktion von Globotriaosylceramid ist noch unklar. Einige Studien weisen darauf hin, dass Gb₃ die Funktion von Signalmolekülen, wie dem Interferonrezeptor (Typ I) oder CD19 regulieren kann (20). Weiterhin wird dem Gb₃ eine Funktion bei der Bildung von *rafts* in Plasmamembranen beigemessen (siehe Kapitel 1.5). Generell wird eine Anreicherung von Glycosphingolipiden in diesen Membranmikrodomänen vermutet. Die Detektion von Gb₃ in DRMs unterstützt diese Annahme (22, 23).

Die Bindung von STxB an Gb₃ wird bestimmt durch die Wechselwirkung des Proteins mit der Trisaccharidkopfgruppe des Lipids (1). Dennoch wird ein gewisser Einfluss der Fettsäure auf die STxB-Gb₃-Bindung vermutet. In natürlichem Gewebe variiert die Kettenlänge und der Sättigungsgrad der Fettsäure des Gb₃ (30). Bindungsstudien von STxB mit Gb₃-Molekülen unterschiedlicher Fettsäuren lieferten Unterschiede in den Bindungsaffinitäten (30-32). Es wird angenommen, dass die Konformation der Fettsäure die Konformation und damit die Höhe der Zuckerkopfgruppe oberhalb der Membran beeinflusst, was sich auf die Bindung von STxB an Gb₃ auswirken kann (33).

1.3 Vom *fluid mosaic* Modell zur *raft*-Hypothese

Lange wurden biologische Membranen nach dem Membranmodell von Davson & Danielli beschrieben (34), bei dem vorgeschlagen wurde, dass die Doppelschicht aus Phospholipiden, neutralen Lipiden (z. B. Cholesterin) und Glycolipiden besteht, wobei beide polare Grenzflächen mit Membranproteinen bedeckt sind.

1972 wurde von Singer und Nicolson ein neues Modell für Zellmembranen vorgestellt, welches damals als konzeptioneller Durchbruch für das Verständnis vom Aufbau von biologischen Membranen galt und bis heute wichtige Aspekte enthält (35). Das *fluid mosaic* Modell beschreibt Membranen als Lipiddoppelschichten, in die amphiphile Membranproteine eingebettet sind. Es handelt sich dabei um eine dynamische Struktur, in der die laterale Diffusion der Lipide und Proteine möglich ist.

Die Rolle der Lipide als homogen verteiltes „Lösungsmittel“ für Proteine schien im Laufe der Zeit allerdings zu einfach. So konnte eine asymmetrische Verteilung der Lipide zwischen den beiden Monoschichten, sowie eine heterogene Anordnung der Lipide innerhalb einer Monoschicht festgestellt werden (36). Auch zwischen verschiedenen Zellorganellen sind Lipide unterschiedlich verteilt. So ist beispielsweise die exoplasmatische Seite der Plasmamembran angereichert mit Sphingomyelin und Glycosphingolipiden (37, 38). Der Aufbau von Membranen, sowie die Funktionalität der einzelnen Komponenten ist allerdings bis heute noch nicht im Detail geklärt. Dies ist nicht überraschend bei der Existenz von über 1000 verschiedenen Lipiden in Zellen. Um die Funktionen besser zu verstehen, wäre die Bestimmung der Struktur des Lipids, dessen Konzentration in Abhängigkeit von Ort und Zeit, sowie der Bindungspartner nötig (39). Außerdem ist ein umfassendes Verständnis der physikalischen Eigenschaften der Lipide und Membranen, insbesondere Lipid-Lipid- bzw. Lipid-Protein-Wechselwirkungen erforderlich. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff „*cellular lipidomics*“ eingeführt, der einen Rahmen für das notwendige Verständnis der Rolle der Lipide, insbesondere beim Membrantransport, bei der Sortierung und Signalwirkung in Zellen, bietet (39).

Die raft-Hypothese

1997 wurde von Simon & Ikonen die sogenannte „raft-Hypothese“ aufgestellt, welche die Heterogenität von biologischen Membranen beschreibt (40). *Rafts* werden als kurzlebige Mikrodomänen, welche mit Sphingolipiden, Cholesterin und bestimmten Proteinen angereichert sind, beschrieben. Sie spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Funktionen, wie beispielsweise im intrazellulären Lipidtransport oder in der Zellsignalwirkung. Über die Jahre wurden weitere Funktionen von *rafts* postuliert, da sie bei der Immunantwort, Apoptose, dem Toxin- und Virusangriff wichtig scheinen (39). *Rafts* befinden sich wahrscheinlich im Zustand der flüssig-geordneten (engl. *liquid-ordered*, l_o) Phase, umgeben von einer flüssig-ungeordneten (engl. *liquid-disordered*, l_d) Phase. Die l_o -Phase ist eine flüssig-kristalline Phase, in der die Lipide innerhalb der Ebene der Doppelschicht frei diffundieren, während die Fettsäureketten überwiegend eine gestreckte („geordnete“) Konformation ohne Kinke aufweisen. Die l_o -Phase wird durch die Einlagerung des flachen, starren Cholesterinmoleküls zwischen den flexibleren Phospholipiden ermöglicht (39, 41). Ipson et al. (42, 43) beschrieben zum ersten Mal die Bildung einer *liquid-ordered* Phase in Modellmembranen bestehend aus Cholesterin und gesättigten Phospholipiden.

Detergensresistente Membranen (DRMs)

Lange Zeit wurden *rafts* mit detergensresistenten Membranen (DRMs) gleichgesetzt. DRMs sind Membranfraktionen, welche nach Behandlung von natürlichen Membranen mit kalten, nicht-ionischen Detergenzien (z. B. Triton X-100) und anschließender Dichtegradientenzentrifugation erhalten wurden. Diese detergensunlöslichen Fraktionen sind mit Sphingolipiden, Cholesterin und bestimmten Proteinen, wie z. B. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen, angereichert. Da DRMs ein Resultat unvollständiger Löslichkeit von Membranen in Detergenzien sind, und diese erst nach Behandlung mit Detergens existieren, ist es heute weitgehend akzeptiert, dass DRMs nicht mit Membranstrukturen vor Detergenszugabe korrelieren müssen (44). So können durch das Detergens Artefakte eingeführt werden, so dass beispielsweise Proteine in DRMs erhalten werden, welche nicht mit *rafts* assoziiert werden (39). Dennoch kann die Isolierung von DRMs wichtige Informationen über ein System liefern.

Untersuchung von rafts in Zellen

Die *raft*-Hypothese wird derzeit stark diskutiert, wobei Hauptdiskussionenpunkte die Methodologie zur Untersuchung von *rafts* und deren Größe sind. Selektive Zusammenlagerung von bestimmten Membrankomponenten und Separation von anderen Komponenten durch Zugabe von Antikörpern zu lebenden Zellen, sind wichtige Methoden, um *rafts* in sichtbare, stabile Cluster zu überführen und mikroskopisch zu untersuchen (44). Methoden, die direkt die Ordnung der Lipide in lebenden Zellen detektieren, werden ebenfalls angewandt, um *rafts* zu charakterisieren. So können geordnete Lipiddomänen durch den amphiphilen Farbstoff Laurdan mittels 2-Photonenmikroskopie visualisiert werden, indem der Emissionspeak des Fluoreszenzfarbstoffes in Abhängigkeit seiner Lipidumgebung verschoben wird (45). Eine häufige Technik, die angewendet wurde, um *raft*-Domänen *in vivo* zu visualisieren, ist die Methode des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET). Sie liefert zwar Informationen über die Nähe von Molekülen in einem sehr kleinen Bereich (5 nm), allerdings ist sie nicht geeignet größere Einheiten zu detektieren (44). Die Studien ergaben, dass FRET zur Untersuchung von *rafts* nicht geeignet ist. Trotz Anwendung von alternativen Methoden lassen sich *raft*-Domänen in Zellen nicht direkt visualisieren. Ihre Existenz *in vivo* bleibt deshalb bislang ohne Beweis. Die Größe der Domänen ist folglich umstritten. Manche Studien ermittelten 200 nm große *rafts*, andere schlagen Domänen vor, die kleiner als 5 nm sind (44). Aufgrund experimenteller Daten mit Antikörpern zur eindeutigen Visualisierung von flüssig-geordneten Bereichen in lebenden Zellen (45), und dem Hinweis, dass isolierte Zellmembranen *in vitro* eine Phasenseparation aufweisen, scheint es sinnvoll zu sein, eine Phasenseparation in natürlichen Zellmembranen anzunehmen. Die Erweiterung der *raft*-Hypothese um den dynamischen Aspekt gewinnt immer mehr an Gewicht (16, 46). So scheinen die Größe und die Zeitskala von existierenden *rafts* äußerst wichtige Merkmale zu sein, welche deshalb in einer Definition von *rafts* berücksichtigt werden sollten.

Modellmembranen zur Charakterisierung von Phasenseparationen

Die laterale Organisation von Lipiden, sowie die Phasenseparation in gemischten Lipidmembranen, können gut mit Hilfe von Modellmembranen untersucht werden. Die Ergebnisse lassen sich zwar nicht direkt auf die Situation *in vivo* übertragen, dennoch können allgemeingültige Prinzipien abgeleitet werden, die helfen können, die Vorgänge in Zellmembranen besser zu verstehen. Mono- und Doppelschichten werden dazu verwendet. Lipidmonoschichten werden häufig an der Luft-Wasser-Grenzfläche untersucht, wobei in diesem System die Lipidpackung durch die für die Lipide verfügbare Fläche reguliert wird. Dabei wird der laterale Druck der Monoschicht in Abhängigkeit von der Fläche gemessen. Monoschichten können auf einen Festkörper übertragen werden. Lipiddoppelschichten werden entweder in Form von Vesikeln oder immobilisiert auf einem festen Substrat zur Untersuchung von Phasenseparationen verwendet. *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) stellen ein Membransystem dar, welches Zellmembranen wahrscheinlich am ähnlichsten ist, da ein Artefakt durch einen Festkörper ausgeschlossen werden kann. Die allgemeinen Prinzipien der Phasenseparation wurden zunächst in einfachen, binären Lipidsystemen etabliert. In den letzten Jahren wurden dagegen häufig ternäre Lipidmischungen, welche die Zusammensetzung von Plasmamembranen besser imitieren, verwendet. Die Mischungen enthalten meist Cholesterin, ein Lipid mit hoher und ein Lipid mit niedriger Phasenumwandlungstemperatur. Die erste Visualisierung von „raft-ähnlichen“ Domänen in Modellmembranen gelang Dietrich et al. 2001 (47). Sie visualisierten mittels Fluoreszenzmikroskopie l_o -Domänen in festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten und GUVs, welche nicht nur aus synthetischen Lipiden zusammengesetzt waren, sondern auch aus Lipidextrakten der apikalen Membran von Darmzellen. Nach Cholesterin-Extraktion durch Methyl- β -cyclodextrin verschwanden diese, woraus eine Cholesterin-abhängige Bildung der Domänen abgeleitet wurde. Weitere wichtige Erkenntnisse bezüglich Phasenseparationen lieferte die Etablierung von ternären Phasendiagrammen. Das ternäre Phasendiagramm von Sphingomyelin/Phosphatidylcholin/Cholesterin bei physiologischer Temperatur prognostiziert die Koexistenz der l_o - und l_d -Phase über viele Zusammensetzungen, welche den Aufbau der Plasmamembran von Zellen imitieren (48). Ein etwas anderes Modell von Heterogenitäten in Modellmembranen wurde von McConnell et al. beschrieben (49). Anstelle der Ausbildung einer l_o -Phase werden „kondensierte Komplexe“ zwischen Cholesterin und Sphingomyelin vorgeschlagen. Die Herkunft dieses Begriffes

liegt begründet in der Beobachtung, dass Cholesterin und Sphingomyelin in Mischungen eine geringere Oberfläche benötigen als die Summe des Flächenbedarfs der einzelnen Komponenten erwarten lässt. Die Theorie der kondensierten Komplexe wurde allerdings aus Experimenten mit Lipidmonoschichten abgeleitet, und konnte bislang nicht für Doppelschichten bestätigt werden.

Mittlerweile gibt es durch Studien mit Modellmembranen, welche die exoplasmatische Seite der Plasmamembran imitieren, eindeutige Hinweise für die Lipid-gesteuerte Bildung von Domänen. Obwohl Modellmembranen ein sehr vereinfachtes System von Zellmembranen darstellen, gibt es viele Beispiele, die zeigen, dass diese Ergebnisse mit denen aus Studien mit lebenden Zellen gut korrelieren (44).

1.4 Rekonstitution STxB-induzierter Membraninvaginationen an *Giant Unilamellar Vesicles*

In Zellstudien konnte gezeigt werden, dass STxB unabhängig von Clathrin und Caveolin durch die Bildung von Membraninvaginationen effizient in die Zelle transportiert werden kann. Um die an Zellen beobachteten STxB-induzierten Membraninvaginationen an einem einfachen Membransystem zu untersuchen, wurden Studien an *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) durchgeführt (siehe Abb. 1-4) (16). GUVs ermöglichen Untersuchungen in absoluter Abwesenheit von zellulären Faktoren. GUVs, zusammengesetzt aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC)/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5), dotiert mit 1 mol% Bodipy-C₅-HPC, wurden mit fluoreszenzmarkiertem STxB bei 37 °C inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Protein bindet innerhalb von Sekunden und ist zunächst homogen auf der Oberfläche verteilt (Abb. 1-4 A'). Anschließend können Regionen intensiver STxB-Fluoreszenz beobachtet werden, was auf die Ausbildung von STxB-Clustern hinweist (Abb. 1-4 A'', Pfeile). Verringerung der Membranspannung durch Photoaktivierung von Bodipy-C₅-HPC (16) führt innerhalb einer Minute zur Bildung von tubulären Membraninvaginationen (Abb. 1-4 A'''). Durch die Membranspannung kann eine mögliche Ausbildung von Invaginationen bzw. Membrandeformationen gesteuert werden, da bei erhöhter Membranspannung die für die Deformation erforderliche Energie größer wird (50). Eine hohe Membranspannung kann somit die Bildung von

Invaginationen verhindern. In analogen Experimenten bei Raumtemperatur führte die Bindung von STxB an GUVs mit niedriger Membranspannung ebenfalls zur Bildung von Membraninvaginationen (51).

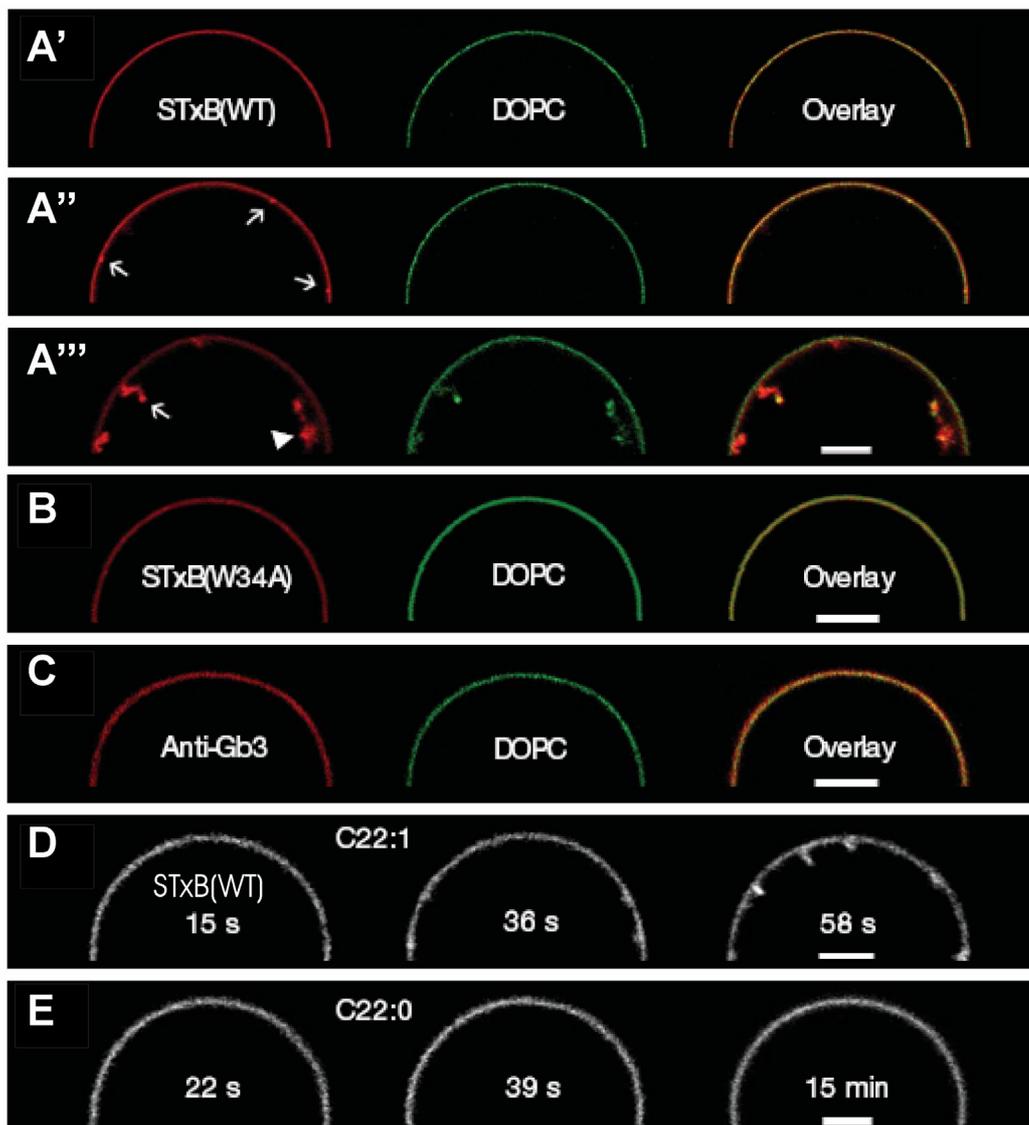


Abb. 1-4: Bindung von STxB (rot) an GUVs, zusammengesetzt aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5), dotiert mit 1 mol% Bodipy-C₅-HPC (grün), bei 37 °C. **A** STxB-Bindung führt zur Induzierung von Invaginationen, **B/C** die Bindung von STxB-W34A und anti-Gb₃ dagegen nicht. **D** Die Bindung von STxB an Gb₃ (C22:1¹³) induziert Invaginationen, **E** an Gb₃ (C22:0) nicht. Maßstabsbalken: 5 μm (16).

STxB-W34A, welches keine Gb₃-Bindungsstelle III besitzt, führt trotz effizienter Bindung an Gb₃ in GUVs nicht zur Bildung von Invaginationen (Abb. 1-4 B). Entsprechende Experimente mit GUVs hoher Membranspannung zeigen zusätzlich keine Bildung von STxB-W34A-Clustern. Die Bindung des Antikörpers anti-Gb₃ führt ebenfalls nicht zur Bildung von Invaginationen (Abb. 1-4 C), woraus sich schließen lässt, dass spezifische strukturelle Bedingungen des Proteins für die Induzierung der Invaginationen nötig sind. GUVs, die synthetisches Gb₃ (C22:1¹³)¹ bzw. Gb₃ (C22:0)² enthielten, wurden mit STxB inkubiert, um den Einfluss der Lipidstruktur auf die Bildung der Invagination zu ermitteln. Trotz effizienter Bindung von STxB, wurden in GUVs, welche 5 mol% Gb₃ (C22:0) enthielten, keine Invaginationen beobachtet, in GUVs mit 5 mol% Gb₃ (C22:1¹³) dagegen schon (Abb. 1-4 D/E).

Um den Einfluss der Membranzusammensetzung auf die Ausbildung von Invaginationen zu untersuchen, wurden DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (42:40:13:5)-GUVs, dotiert mit 1 mol% Bodipy-C₅-HPC, mit STxB bei Raumtemperatur inkubiert (51). Bereits vor Proteinzugabe wurde eine Phasenseparation in eine *l_d*- und *l_o*-Phase beobachtet. Das Protein bindet an die *l_o*-Phase, welche mit Sphingomyelin und Cholesterin angereichert ist und in der der Membranfluorophor verarmt ist (Abb. 1-5).

Interessanterweise wurden Inhomogenitäten der STxB-Fluoreszenz innerhalb der *l_o*-Phase detektiert (Pfeile), was aus der Bildung von STxB-Clustern resultieren könnte. Die Bindung von STxB führte nicht zur Bildung von Invaginationen, sondern nur zur Ausbildung von flachen Membrandeformationen. Dies verdeutlicht den Einfluss der Membranzusammensetzung auf STxB-induzierte Invaginationen in GUVs.

¹ synthetisches Gb₃ verknüpft mit Erucasäure (22 Kohlenstoffatome mit einer Doppelbindung an Position 13)

² synthetisches Gb₃ verknüpft mit Behensäure (22 Kohlenstoffatome, keine Doppelbindung)

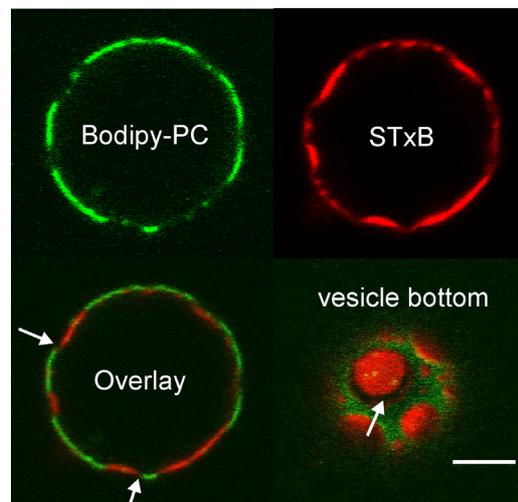


Abb. 1-5: Bindung von STxB (rot) an GUVs, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (42:40:13:5), dotiert mit 1 mol% Bodipy-C₅-HPC, bei Raumtemperatur. Das Protein bindet an phasenseparierte GUVs. Die Bildung von flachen Membrandeformationen kann beobachtet werden (Pfeile). Maßstabsbalken: 5 μm (51).

1.5 Krümmung und laterale Organisation in Membranen

Membrandeformationen sind essenziell für den intrazellulären Transport von Substanzen. Der Transport erfolgt über stark gekrümmte, tubuläre oder vesikuläre Transporter (engl. *carrier*), die sich von der ursprünglichen Membran abknospen und mit der Zielmembran fusionieren (52). Beim Knospungsprozess sind häufig Hüllproteine beteiligt, die sich durch Oligomerisierung um den entstehenden Transporter anordnen (*coat*, engl. „Hülle“). Die bekanntesten Vertreter dieser von Protein umhüllten Vesikel sind Clathrin-, COPI-, COPII-*coats* und *Caveolae*. Sie wurden bereits an Plasmamembranen, Endosomen, am Golgi-Apparat und im endoplasmatischem Reticulum entdeckt. Die Bildung von Clathrin-*coats* spielt z. B. bei der klassischen Endozytose eine entscheidende Rolle. Weitere Mechanismen, wie Membrankrümmung und somit -deformierung induziert werden können, sind bekannt. Lokale Veränderungen der Lipidkomposition, reversible Insertion von Proteinen mit intrinsischer Krümmung oder Veränderung der

Zytoskelettpolymerisierung werden als mögliche Mechanismen für Membrandeformationen beschrieben (52-54). Bei lokaler Veränderung der Lipidkomposition ist die Form der Lipide von Bedeutung, so führen keilförmige Lipide eher zu positiver Krümmung, kegelförmige dagegen zu negativer Membrankrümmung (16).

Neben der klassischen Endozytose wurden mittlerweile mehrere Beispiele einer Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Aufnahme von Substanzen in die Zelle beschrieben, die häufig von Viren, Toxinen oder Bakterien genutzt wird (50). Der erst kürzlich entdeckte Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytoseweg für Shiga Toxin wurde bereits in Kapitel 1.1 und 1.4 vorgestellt. Unabhängig von zellulären Prozessen wurden tubuläre Membraninvaginationen beobachtet, deren Bildung nur durch die Toxinbindung selbst induziert wurde (16). Es wird vermutet, dass die Bindung von STxB an Gb₃ zu einer negativen Membrankrümmung führt (Abb. 1-6 A) und somit zu einer Cargo-induzierten Membrandeformation (50).

Phasenseparation von Lipiden kann eine wichtige Rolle bei Membrandeformationen spielen. Die Bildung von Lipiddomänen wird im Allgemeinen durch die Nukleationsenergie bestimmt, eine Energiebarriere, die überwunden werden muss. Proteine können diese Energie erniedrigen und somit die Bildung von Domänen begünstigen. Einen signifikanten Anteil zur Nukleationsenergie trägt die Linienenergie bei, die durch die Grenzfläche der Domänen mit der umgebenden Membran entstehen (50).

Die Linienenergie E_γ wird durch Gleichung (1-1) beschrieben:

$$E_\gamma = \gamma \cdot P \quad (1-1)$$

γ ist die Linienspannung und P der Umfang (Perimeter) der Domäne (55). Domänen-deformation kann den Domänenumfang und damit die Linienenergie erniedrigen. Bei Membranen ohne gebundenes Protein ist dieser Effekt normalerweise ziemlich gering. Durch die Bindung von Proteinen, wie im Falle des STxB, können Proteinaggregate zu stark gekrümmten tubulären Domänen führen (Abb. 1-6 B). Die Beteiligung einer Protein-induzierten Phasenseparation wäre denkbar. Falls ein gebundenes Protein eine Krümmung der Membran erzeugen kann, führen kooperative Kräfte zur Rekrutierung weiterer gebundener Proteine, die eine ähnliche Krümmung bevorzugen, und so eine hohe Membrankrümmung generieren können (56).

Die Gesamtenergie E_{ges} der Membran setzt sich aus vielen Faktoren zusammen. Sie kann nach Gleichung (1-2) beschrieben werden (50, 57):

$$E_{\text{ges}} = E_{\gamma} + E_{\sigma} + E_{\kappa} + E_{\text{elstat}} + E_x \quad (1-2)$$

E_{σ} ist die Oberflächenenergie und wird durch die Membranspannung σ definiert. E_{κ} bezeichnet die Krümmungsenergie und E_{elstat} die elektrostatische Energie. E_x steht für Energiebeiträge, die durch zusätzliche Faktoren entstehen können, wie z. B. van-der-Waals-Wechselwirkungen.

Die Krümmungsenergie, die zur Deformation erforderlich ist, steigt mit der Membranspannung. Eine hohe Membranspannung kann somit eine Deformation der Membran verhindern, sogar wenn das Protein eine gekrümmte Form bevorzugt. Die Minimierung der Linienenergie kann zu Fusion von Domänen und damit zu einem Anstieg der Domänengröße in der Membranebene führen (Abb. 1-6 **B**) (58, 59).

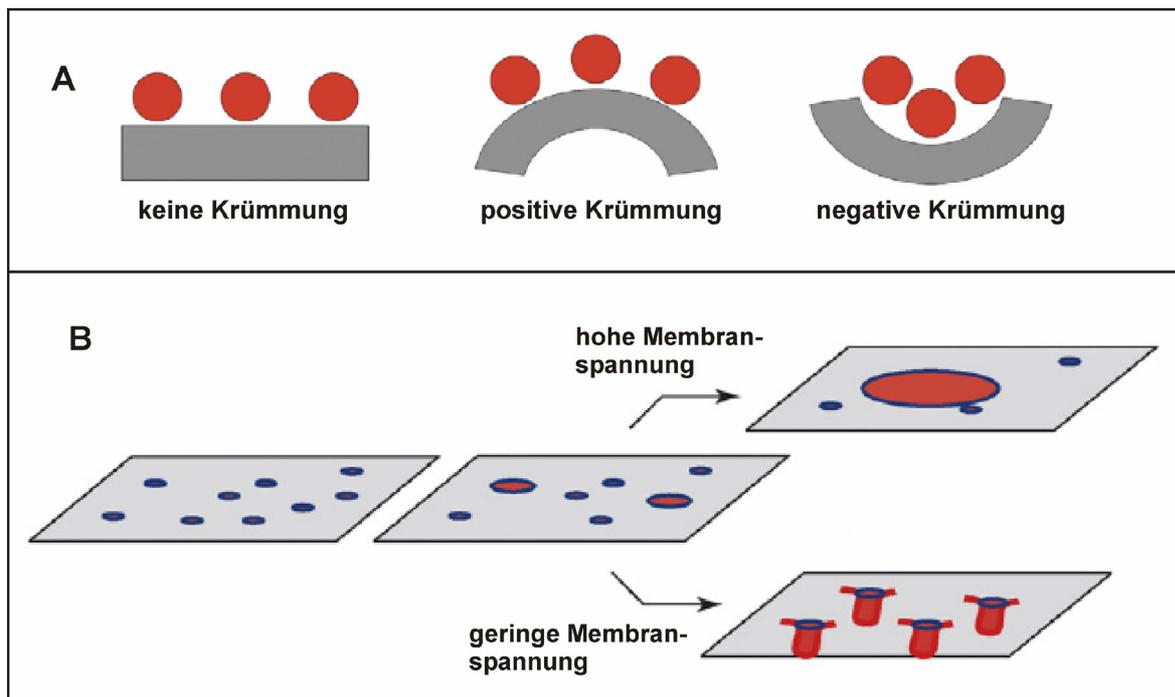


Abb. 1-6: Cargo-induzierte Membrandeformation und laterale Organisation. **A** Vorzeichendefinition der Membrankrümmung. Die roten Objekte stellen Cargo-Moleküle dar. **B** Abhängigkeit des Domänenwachstums und der Membrandeformation von der Membranspannung. (50)

Die Linienenergie E_{γ} gilt als Schlüsselfaktor bei der Regulation der Größe von Lipiddomänen. Sie steht u. a. in Zusammenhang mit Membranspannung, spontaner

Krümmung und Höhendifferenzen von Lipidphasen. Garcia-Sáez et al. (60) untersuchten kürzlich den Zusammenhang zwischen Linienspannung, Domänenform und -größe. Sie präparierten festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten mit koexistierenden l_d - und l_o -Phasen und variierten die Linienenergie durch Veränderungen der Höhendifferenzen zwischen beiden Phasen. Dabei steigt die Linienenergie mit wachsender Differenz, da der Kontakt der hydrophoben Ketten mit der wässrigen Umgebung energetisch ungünstig ist. Mit steigender Linienspannung stieg die Größe und die Circularität der Domänen an. Damit wird der relative Domänenumfang minimiert, so dass die Linienenergie sinkt. Analoge Experimente mit GUVs zeigten tendenziell einen Anstieg der Membrankrümmung mit steigendem Höhenunterschied der Lipidphasen. Somit konnte ein Zusammenhang zwischen Höhendifferenzen von Phasen mit Linienspannung und Krümmung in Vesikeln hergestellt werden (60). Der Zusammenhang zwischen molekularer Struktur der Lipide und Proteine und induzierten Membrandeformationen muss allerdings noch geklärt werden.

2 Zielsetzung

Shiga Toxin spielt eine wichtige Rolle bei Lebensmittelinfektionen und kann zu verschiedenen Durchfallerkrankungen führen. Die Untereinheit B des Toxins (STxB) existiert als Homopentamer und ist für den retrograden Transportweg in der Zelle verantwortlich. Das Glycosphingolipid Globotriaosylceramid (Gb₃) gilt als natürlicher Rezeptor für STxB bei der Bindung an die Plasmamembran. Das Monomer besitzt drei Bindungsstellen für Gb₃. STxB kann durch Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose in die Zelle transportiert werden. Neue Studien an Zellen und *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) beschreiben in diesem Zusammenhang die Ausbildung von Membraninvaginationen, die unabhängig von zellulären Prozessen sind. Dynamisches Clustering des STxB-Gb₃-Komplexes, das zu einer negativen Membrankrümmung führt, wird dafür verantwortlich gemacht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die laterale Organisation von STxB gebunden an artifizielle Gb₃-haltige Lipidmembranen mit hochauflösenden Methoden untersucht werden. Durch Kombination der Rasterkraft- mit der Fluoreszenzmikroskopie sollte simultan die Bindung des Proteins und die Organisation von Membranstrukturen visualisiert werden. Es stellte sich die Frage, ob die STxB-Bindung zu einer Clusterbildung des Proteins und zu einer Reorganisation der Lipide innerhalb der Membran führt.

Weiterhin sollte der Einfluss der molekularen Struktur des Proteins und des Gb₃ auf die laterale Organisation des gebundenen Proteins und die Organisation der Lipide in der Membran untersucht werden, indem der Sättigungsgrad der Gb₃-Fettsäuren und die Existenz von Bindungsstellen des STxB durch Punktmutation variiert wird.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Substanzen

3.1.1 Lipide

Für die Immobilisierung des Rezeptorlipids Globotriaosylceramid Gb₃ in artifiziellen Membranen wurden die Matrixlipide 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), Sphingomyelin (SM) und Cholesterin verwendet.

DOPC (C₄₄H₈₄NO₈P, *M* = 786,15 g/mol, Abb. 3.1 A) ist ein ungeladenes synthetisches Glycerophospholipid. Durch eine *cis*-Konstitution mit anschließender *trans-gauche*-Konformation an der Doppelbindung der beiden Ölsäureketten wird eine Kinke in der Kette ausgebildet, welche einen großen Einfluss auf das Phasenverhalten des Lipids hat. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur liegt bei -20 °C.

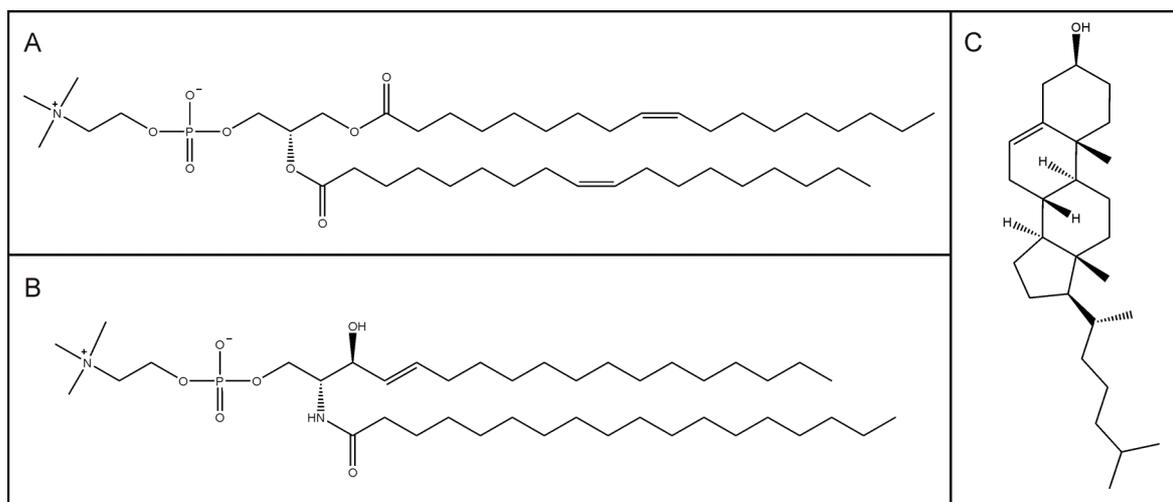


Abb. 3-1: Strukturformeln von **A** 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC), **B** Sphingomyelin (SM, exemplarisch mit Stearinsäure verknüpft) und **C** Cholesterin.

Das ebenfalls ungeladene Lipid Sphingomyelin ($M_{C_{18:0}} = 731,09$ g/mol, ca. 49 % mit Stearinsäure verknüpft, Abb. 3-1 B) besitzt ein SphingosinGrundgerüst, welches an der Aminofunktion über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft ist. Das in dieser Arbeit verwendete Sphingomyelin wurde aus Rinderhirn isoliert und besteht aus einem Gemisch mit unterschiedlich verknüpften Fettsäuren, wobei der Hauptanteil der Fettsäuren

gesättigt ist. Die Doppelbindung des Sphingosins ist *trans* konfiguriert. Die Phasenumwandlungstemperatur liegt in einem Bereich von 37 °C bis 41 °C.

Cholesterin ($C_{27}H_{46}O$, $M = 386,65$ g/mol, Abb. 3-1 C) gehört zur Gruppe der Steroide. Es ist ein wichtiger Bestandteil in tierischen Membranen und reguliert die Membranfluidität. In fluiden Bereichen der Membran wirkt es stabilisierend indem es die Rotationsfreiheit benachbarter Kohlenwasserstoffketten einschränkt, während es in Bereichen der Gelphase eine Störung der hoch geordneten Packung der Lipidketten bewirkt (37).

Das Globotriaosylceramid Gb₃ (siehe Abb. 3-2) fungiert als neutrales Rezeptorlipid für die Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB). Das Ceramidgrundgerüst ist mit einem Trisaccharid verknüpft (α -D-Galactosyl-(1→4)- β -D-galactosyl-(1→4)- β -D-glucosid-Ceramid), man spricht von einem Glycosphingolipid. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Gb₃-Moleküle verwendet:

- Gb₃ (nativ) (siehe Abb. 3-2 A) isoliert aus Schweinegewebe; 70 % verknüpft mit gesättigten Fettsäuren, 30 % mit ungesättigten Fettsäuren (mittlere $M = 1105,16$ g/mol, Abb. 3-2 A)
- synthetisches Gb₃ (C22:0) verknüpft mit der Behensäure ($C_{58}H_{109}NO_{18}$, $M = 1108,48$ g/mol, Abb. 3-2 B)
- synthetisches Gb₃ (C22:1¹³) verknüpft mit der Erucasäure ($C_{58}H_{107}NO_{18}$, $M = 1106,47$ g/mol, Abb. 3-2 C)

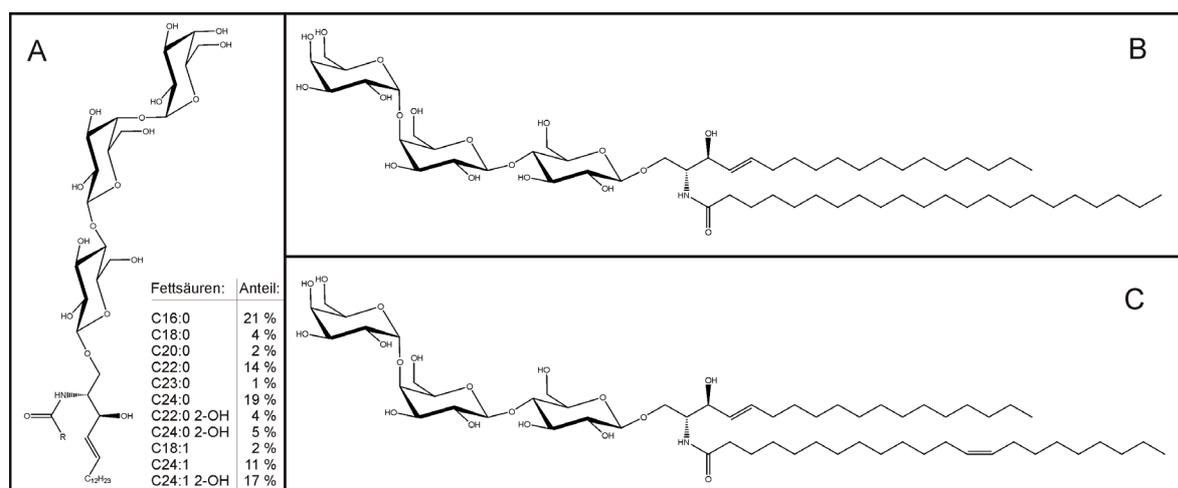


Abb. 3-2: Strukturformeln von **A** nativem Globotriaosylceramid (Gb₃ nativ), **B** synthetischem Gb₃ (C22:0) und **C** synthetischem Gb₃ (C22:1¹³).

Ist die Spezifität des Gb₃ nicht näher angegeben, so handelt es sich in dieser Arbeit um das native Gb₃.

3.1.2 Fluoreszenzsonden

Es wurde mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Lipiden gearbeitet, um die auftretenden Phasen in den Membranen beobachten zu können.

β -Bodipy C₁₂-HPC (C₄₆H₇₉BF₂N₃O₈P, *M* = 881,93 g/mol, Abb. 3-3 A) wurde in Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche eingebaut. Es handelt sich um ein Seitenketten-gelabeltes Glycerophosphocholin. Der Fluorophor ist am Ende einer C12-Fettsäure kovalent gebunden. Das Absorptionsmaximum liegt bei 500 nm, das Emissionsmaximum bei 510 nm. β -Bodipy C₁₂-HPC (Bodipy-PC) reichert sich bevorzugt in fluiden Bereichen von Membranen an (38).

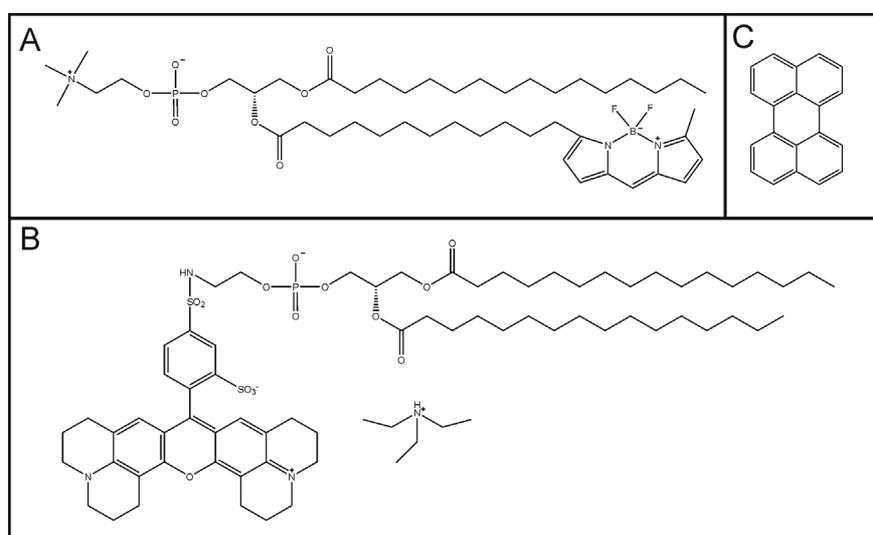


Abb. 3-3: Strukturformeln von **A** β -Bodipy C₁₂-HPC, **B** Texas Red DHPE und **C** Perylen.

Ein weiteres verwendetes Fluoreszenzlipid, welches sich in fluiden Membranbereichen anreichert (61), ist Texas Red DHPE (Sulforhodamin 101 DHPE Triethylammoniumsalz, C₇₄H₁₁₇N₄O₁₄PS₂, *M* = 1381,84 g/mol, Abb. 3-3 B). Das Lipid ist Kopfgruppen-gelabelt, wird maximal bei einer Wellenlänge von 538 nm angeregt und emittiert maximal bei einer Wellenlänge von 601 nm.

Perylen ($C_{20}H_{12}$, $M = 252,31$ g/mol, Abb. 3-3 C) ist ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff und kann als fluoreszierendes Molekül in Lipidmembranen integriert werden. Die Anreicherung von Perylen in einer Phase ist nicht eindeutig geklärt. In einer Studie mit markierten *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) wird beschrieben, dass sich das Perylen bevorzugt in die *liquid-ordered* Phase einlagert (62). Andere Untersuchungen an GUVs schildern dagegen eine Gleichverteilung von Perylen in der *liquid-ordered* und *liquid-disordered* Phase (63). Das Maximum der Absorption liegt bei 438 nm und das der Emission bei 472 nm.

Neben der Fluoreszenzmarkierung der Membranen wurde das Protein Shiga Toxin durch den kovalent gebundenen Fluorophor Cy3 (Abb. 3-4) markiert. Der Farbstoff Cy3 NHS-Ester reagiert dabei mit der Aminogruppe von Lysinresten durch Ausbildung einer Amidbindung (Abb. 3-4). Cy3 absorbiert maximal bei einer Wellenlänge von 548 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 562 nm (64).

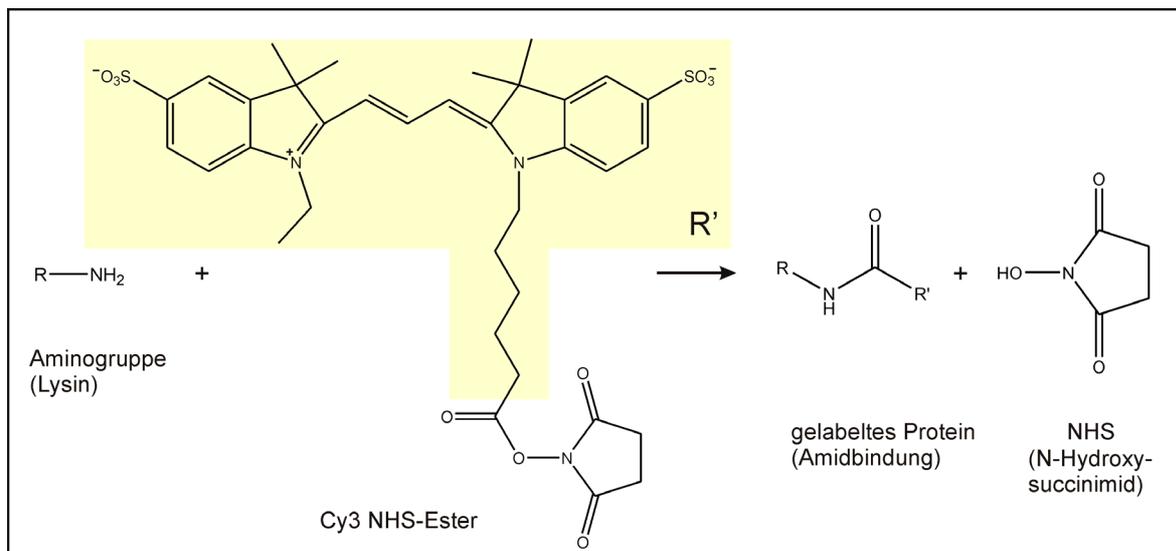


Abb. 3-4: Proteinlabeling durch Reaktion von Lysinresten mit Cy3 NHS-Ester.

3.1.3 Shiga Toxin und anti-Gb₃

Die Isolierung des Wildtypen von STxB (STxB-wt) wurde von Winfried Römer am Institut Curie (Centre de Recherche, Laboratoire Trafic, Signalisation et Ciblage Intracellulaires, Paris) durchgeführt. STxB wurde rekombinant aus *E. coli* (Plasmid pSU108) exprimiert und über eine Ionenaustausch-Säule aufgereinigt (65).

Weiterhin wurde die Mutante STxB-W34A durch ortsspezifische Mutagenese konstruiert, in der an Position 34 Tryptophan durch Alanin ausgetauscht wurde (66).

Der monoklonale Antikörper anti-Gb₃ (Antikörper CD77) wurde aus Ratten isoliert (Immunotech, Marseille, Frankreich) und bindet spezifisch an das Glycosphingolipid Gb₃. Es handelt sich um ein Immunglobulin M (Ig M).

3.2 Vesikelspreittechnik

Festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten wurden auf den Substraten Glimmer (engl. *Mica*) und Silizium mittels Vesikelspreittechnik präpariert. Das hier verwendete Glimmer wird als Muscovit bezeichnet. Es besitzt die chemische Formel $KAl_2[(OH,F)_2/AlSi_3O_{10}]$ (26). Durch Spalten des Schichtsilikates Glimmer erhält man eine saubere, glatte Oberfläche, was für rasterkraftmikroskopische Messungen von Bedeutung ist. Unilamellare Vesikel adsorbieren an den Festkörper, spreiten durch einen selbstorganisierenden Prozess und bilden eine Lipiddoppelschicht aus. Für diesen Prozess ist es notwendig, dass sich die Lipide der Vesikel in der fluiden Phase befinden. Deshalb sollte oberhalb der Phasenhauptumwandlungstemperatur der Lipide gearbeitet werden (67).

Stammlösungen von DOPC, Sphingomyelin, Cholesterin, Texas Red DHPE und Bodipy-PC wurden jeweils in Chloroform hergestellt, während Gb₃ in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst wurde. Lipidfilme wurden in einem Reagenzglas unter Stickstoffstrom bei 55 °C gebildet, im Vakuum bei 55 °C 4 h getrocknet und bei 4 °C gelagert. Durch 20 minütiges Quellen des Lipidfilms bei 55 °C in Puffer (20 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7,4) und anschließendem dreimaligen Vortexen für 30 sec im Abstand von 5 min, wurden multilamellare Vesikel (MLVs) erhalten (Gesamtlipidkonzentration: 0,3 mg/ml). Die MLVs wurden anschließend in

unilamellare Vesikel (engl. *large unilamellar vesicles*, LUVs) überführt, indem die MLVs in einem Miniextruder (*LiposoFast*, Avestin, Ottawa, Kanada) mehrmals durch eine Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 50 nm) bei 55 °C gedrückt wurden. Die LUVs wurden auf *Mica*- bzw. Siliziumsubstrate, befestigt in Teflonkammern, mit einer Lipidkonzentration von 0,1-0,3 mg/ml und in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} aufgebracht. Die obersten Schichten des *Micas* wurden zuvor abgespalten. Siliziumträger, auf welchen sich bereits eine 100 nm SiO_2 -Schicht befand, wurden frisch hydrophilisiert, indem sie für 20 min bei 70 °C in einer Lösung aus $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ (25 %ig)/ H_2O_2 (30 %ig) (5:1:1) (v:v:v) behandelt wurden. Die LUVs wurden 1 h bei 55 °C auf den Oberflächen inkubiert und nach kurzem Abkühlen mit PBS-Puffer (2,7 mM KCl, 136,9 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) bei Raumtemperatur gespült. Das STxB wurde den planaren Lipiddoppelschichten bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nicht und reversibel gebundenes Protein wurde durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt.

3.3 Filmwaagetechnik

Mit Hilfe der Filmwaagetechnik können Eigenschaften von amphiphilen Substanzen an der Wasser-Luft-Grenzfläche untersucht werden. Oberflächenaktive Stoffe, wie beispielsweise Lipide, langkettige Alkohole oder Fettsäuren, bilden dabei monomolekulare Filme (Langmuir-Filme) an der Grenzfläche aus (68, 69). Die Filmwaage wurde bereits 1891 von Agnes Pockels entwickelt und Jahre später von Irving Langmuir nur wenig verändert (70, 71). Der schematische Aufbau einer Filmwaage ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Sie besteht aus einem temperierbaren Teflontrog, einer oder zwei beweglichen Teflonbarrieren und einem Wilhelmy-Messsystem. Im Trog befindet sich zunächst nur die Subphase (z. B. Wasser oder Puffer), welche grundsätzlich eine hohe Oberflächenspannung besitzen sollte. Dann wird eine definierte Menge an oberflächenaktiver Substanz auf die Oberfläche aufgebracht. Dies geschieht oft mit Spreithilfsmitteln, wie z. B. Chloroform, in denen die Amphiphile gelöst sind. Das Lösungsmittel spreitet vollständig und nach dessen Verdampfen wird eine monomolekulare Schicht auf der Oberfläche ausgebildet. Polare Gruppen der Moleküle, wie die Zuckerreste des Gb_3 , sind zur Subphase hin orientiert.

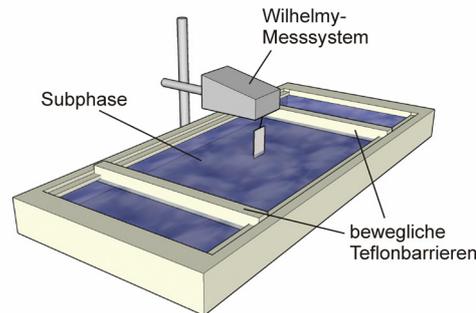


Abb. 3-5: Schematischer Aufbau einer Filmwaage mit Wilhelmy-Messsystem.

Durch die Bewegung der Barrieren kann die für den Film zur Verfügung stehende Fläche verkleinert werden. Dies führt zu intermolekularen Wechselwirkungen der amphiphilen Moleküle. Die Oberflächenspannung der Subphase wird dadurch herabgesetzt und der dafür verantwortliche Oberflächendruck Π kann gemessen werden. Der Oberflächendruck ergibt sich aus der Differenz der Oberflächenspannung der Subphase σ_S und der filmbedeckten Oberfläche σ_F .

$$\Pi = \sigma_S - \sigma_F \quad (3-1)$$

Der Oberflächendruck wird mit einem Wilhelmy-Messsystem ermittelt (72). Es besteht aus einer sehr feinen Waage mit Feder, an der ein Filterpapier-Plättchen befestigt ist. Dieses taucht senkrecht in die Wasseroberfläche und ist vollständig benetzt. Auf das eintauchende Filterpapier wirken die Kräfte der Gravitation, des Auftriebs und der Oberflächenspannung. Vor dem Aufbringen des Films muss das Filterpapier kalibriert werden, indem der Wert für den Oberflächendruck an Luft auf 72,5 mN/m (Oberflächenspannung des Wassers) und für den in Wasser auf 0 mN/m eingestellt wird. Dies ermöglicht die Messung des Oberflächendrucks Π des monomolekularen Films in Abhängigkeit der Fläche A . Die Steuerung der Filmwaage verläuft über eine elektronische Kontrolleinheit, welche zur Barrierenbewegung, Auslesung der Trogfläche und des Drucks dient.

Durch die Aufzeichnung von Druck/Flächen-Isothermen (Π/A -Isothermen) kann beispielsweise das Phasenverhalten von Lipiden charakterisiert werden (68). Der Druck wird dabei oft in Abhängigkeit von der Fläche pro Molekül dargestellt, da die so dargestellten Isothermen charakteristisch für jede Substanz sind. Durch Verringerung der Fläche bzw. der Fläche pro Molekül richten sich die hydrophoben Ketten der Lipide immer mehr auf und treten in Wechselwirkung miteinander. Der Oberflächendruck steigt dabei an

und es können je nach Lipid verschiedene Phasen oder auch Phasenübergänge beobachtet werden.

Durch Kombination der Filmwaage mit einem Epifluoreszenzmikroskop können die Vorgänge in einer Lipidmonoschicht direkt visualisiert werden. Dazu werden Fluoreszenzsonden in geringen Konzentrationen (0,1-1 mol %) den amphiphilen Substanzen beigemischt. Die unterschiedliche Verteilung der Sonde in den auftretenden Lipidphasen ermöglicht die direkte Beobachtung von Lipiddomänen (69).

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Lipiden in einer Lipidmonoschicht kann ebenfalls mit der Filmwaagetechnik untersucht werden. Durch einen zusätzlich eingebauten Proteintrog kann das Protein direkt in die Subphase injiziert werden und ermöglicht das Arbeiten mit kleinen Proteinmengen, da das Volumen der Subphase ($V = 6$ ml) reduziert wird. Es kann dabei z. B. der Einfluss der Proteinbindung auf den Oberflächendruck detektiert (73-75) oder die Lokalisation von fluoreszenzmarkiertem Protein visualisiert werden (76).

Durchführung

Die Messungen wurden mit einer Filmwaage der Firma Riegler & Kirstein (Potsdam) mit einer Trogfläche von $172,2 \text{ cm}^2$ und einem Trogvolumen von 115 ml durchgeführt. Die Konzentrationen aller in dieser Arbeit verwendeten Lipidstammlösungen (außer Gb₃-Stammlösungen) wurden durch die Aufnahme von Isothermen bestimmt. Auf diese Weise konnten die Verhältnisse der Lipidkomponenten in den untersuchten Mischungen präzise eingestellt werden. Hierfür wurden die Isothermen mit Milli-Q-Wasser als Subphase gemessen. Die Kompressionsgeschwindigkeit der Barrieren betrug $7,9 \text{ mm}^2/\text{s}$.

Die Charakterisierung der Proteinbindung an Gb₃ in Lipidmonoschichten erfolgte mit PBS-Puffer (2,7 mM KCl, 136,9 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) als Subphase. Nach dem Spreiten der Lipidmischung wurde die Monoschicht 15 min equilibriert. Im Anschluss wurde der Film mit einer Geschwindigkeit von $4,7 \text{ mm}^2/\text{s}$ bis zu einem Druck von 30 bis 32 mN/m komprimiert und der Barrierenmotor gestoppt. Nach 15-minütiger Equilibrierungszeit wurde das Protein in die Subphase injiziert. Der Oberflächendruck und die Fluoreszenz der Lipidschicht bzw. des gelabelten Proteins konnte über ein langes Zeitfenster beobachtet werden. Soweit nicht anders angegeben, wurde eine Konzentration von $0,3 \text{ }\mu\text{M}$ STxB in die Subphase gegeben.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Das Phänomen Fluoreszenz wurde erstmals von George Gabriel Stokes im Jahre 1852 beobachtet. Er wies nach, dass bestimmte Substanzen selbstleuchtend werden, indem sie auftreffendes Licht absorbieren. Stokes erkannte die Gesetzmäßigkeit, dass das von fluoreszierenden Stoffen emittierte Licht eine höhere Wellenlänge besitzt, als das vom Stoff absorbierte Licht (Stokes-Verschiebung) (77, 78). 1935 beschrieb Alexander Jablonski die Fluoreszenz auf physikalischem Weg. Diese Theorie ist die Grundlage für das heutige Verständnis der Fluoreszenz. In den 1990er Jahren war die Anwendung der Fluoreszenztechnik immer noch auf sehr wenige Fluorochrome beschränkt. Die Entwicklung von unterschiedlichen Fluorophoren in den letzten Jahren ermöglicht vielfältige Anwendungen von diversen Fluoreszenztechniken, vor allem im Bereich der Biowissenschaften.

Abbildung 3-6 veranschaulicht die Ursache für das Auftreten von Fluoreszenz. Gezeigt sind schematisch die Potentialkurve des elektronischen Grundzustandes S_0 und die des elektronisch angeregten Zustandes S_1 eines Moleküls in Abhängigkeit der Kernabstände. Beide elektronischen Zustände besitzen verschiedene Kernschwingungsniveaus, die durch die Schwingungsquantenzahlen ν' bzw. ν'' beschrieben werden. Bei Absorption von Licht wird ein Elektron vom ersten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes ($S_0, \nu'' = 0$) in den elektronisch angeregten Zustand (S_1) angehoben. Eine Anregung in höher liegende elektronisch angeregte Zustände (z. B. S_2) ist auch möglich. Die Anregung erfolgt unter Beachtung des Franck-Condon-Prinzips vertikal, da die Elektronenanregung viel schneller verläuft ($\sim 10^{-15}$ s) als die Kernbewegung ($\sim 10^{-13}$ s) (78).

Der wahrscheinlichste Übergang führt zum Schwingungsniveau mit der maximalen Überlappung der Wellenfunktionen der Kernschwingungen des angeregten Zustandes und des Anfangszustandes. Durch Stöße mit den umgebenden Molekülen kann das angeregte Molekül Schwingungsenergie verlieren, weshalb es sehr schnell strahlungslos in den elektronisch angeregten Schwingungsgrundzustand ($S_1, \nu' = 0$) übergeht. Der strahlungslose Übergang zwischen zwei elektronisch angeregten Zuständen wird als *internal conversion* bezeichnet (z. B. $S_2 \rightarrow S_1$).

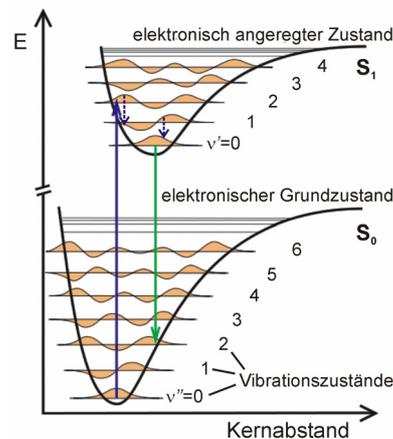


Abb. 3-6: Schematische Darstellung der Kernpotentialkurven des elektronischen Grundzustandes und des elektronisch angeregten Zustandes.

Die Umgebung ist normalerweise nicht in der Lage, den großen Energiebetrag aufzunehmen, der nötig wäre, um das Molekül in den elektronischen Grundzustand zurückkehren zu lassen. Durch die spontane Emission von Licht gelangt deshalb das angeregte Molekül ebenfalls nach dem Franck-Condon-Prinzip in die Schwingungszustände des elektronischen Grundzustandes. Dieser Übergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Wegen der strahlungslosen Energieverluste im elektronisch angeregten Zustand ist das Emissionsspektrum der Fluoreszenz im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu höhere Wellenlängen hin verschoben. Die verschiedenen strahlenden und strahlungslosen Prozesse, die in Molekülen vorkommen, können in einem Jablonski-Diagramm (Abb. 3-7) zusammengefasst werden. Dies ist eine vereinfachte Darstellung der relativen Lage der elektronischen Energie- und Schwingungsniveaus. Die relative vertikale Lage der Energie der Schwingungszustände ist dabei korrekt positioniert, die relative horizontale Lage der elektronischen Zustände sagt jedoch nichts über die tatsächliche Anordnung der Kerne in den Zuständen aus. Anhand des Jablonski-Diagramms kann der Unterschied zur Phosphoreszenz gezeigt werden. Der entscheidende Schritt ist hierbei das *intersystem crossing*, bei dem das Elektron vom elektronisch angeregten Singulettzustand S_1 durch Elektronenspinumkehr in einen Triplettzustand T_1 übergeht. Dieser Triplettzustand wirkt als langsam strahlendes Reservoir, da die Rückkehr in den Grundzustand S_0 spinverboten ist (79). Im Gegensatz zur Fluoreszenz klingt bei der

Phosphoreszenz die spontan emittierte Strahlung also nicht sofort ab, nachdem das Anregungslicht abgeschaltet wird.

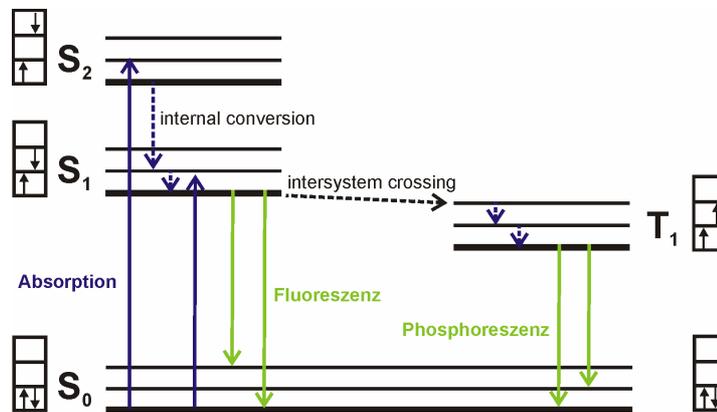


Abb. 3-7: Jablonski-Diagramm: vereinfachtes Termschema mit eingezeichneten Strahlungsübergängen (→) und strahlungslosen Übergängen (⇄).

Das Epifluoreszenzmikroskop

Der Grundaufbau eines Epifluoreszenzmikroskops entspricht im Wesentlichen dem eines Auflichtmikroskops. Das zu beobachtende Objekt wird dabei nicht durchstrahlt sondern durch das Objektiv beleuchtet. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3-8 dargestellt. Als Lichtquelle dient in der Regel eine Quecksilberdampfampe, die Licht im sichtbaren und ultravioletten Bereich emittiert. Durch einen Anregungsfilter wird der für die Anregung des Fluorophors gewünschte Wellenlängenbereich isoliert und über einen dichroitischen Spiegel durch das Objektiv auf die Probe reflektiert. Das Objekt fluoresziert und die emittierte Strahlung wird über das Objektiv zum dichroitischen Spiegel gelenkt, der für das längerwellige Emissionslicht durchlässig ist. Ein im Anschluss geschalteter Emissionsfilter gewährleistet, dass nur die Wellenlängen des emittierten Lichtes das Okular bzw. die CCD-Kamera erreichen.

In biologischen Systemen wird die Fluoreszenzmikroskopie vielseitig eingesetzt. In Zellen können so bestimmte Proteine sichtbar gemacht werden. Durch Markierung bestimmter Proteine können auch einzelne Zellbestandteile, wie z. B. das Cytoskelett, visualisiert werden. Die Proteine werden dabei meist mit fluoreszenzgelabelten spezifischen Liganden oder Antikörpern markiert (80). Eine weitere Anwendung findet die Fluoreszenzmikroskopie in Untersuchungen an artifiziellen Membransystemen. Fluoreszenzmarkierte

Lipide werden hierbei als Sonden eingesetzt, wobei die Konzentration dieser möglichst gering sein sollte (0,1-1 mol%).

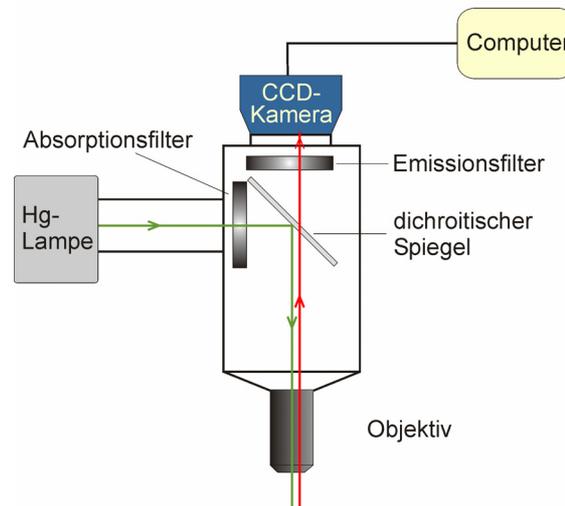


Abb. 3-8: Schematischer Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops.

Durch Kombination der Fluoreszenzmikroskopie mit einer Filmwaage ist es möglich, Vorgänge in Lipidmonoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche, wie z. B. das Phasenverhalten, zu untersuchen (68). Weiterhin können auch die Wechselwirkungen von fluoreszenzmarkierten Proteinen mit festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten mittels Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert werden (81).

Durchführung

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem AxioTech Vario Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) gemacht. In dieser Arbeit wurden sowohl fluoreszenzmikroskopische Studien an Lipidmonoschichten, mit kombiniertem Filmwaageaufbau, als auch an festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten durchgeführt. An der Luft-Wasser-Grenzfläche wurde mit dem Objektiv EC Epiplan-Neofluar (20x/n.A. 0.5, Zeiss) gearbeitet, bei Messungen in Flüssigkeiten mit dem Wasserimmersionsobjektiv Achroplan (40x/n.A. 0.8 W, Zeiss). Die artifiziellen Membranen wurden je nach Experiment mit (0.1-1) mol% der Sonden Bodipy-PC, Texas Red DHPE oder Perylen markiert. Außerdem wurden Experimente mit Cy3-gelabeltem Protein durchgeführt. Die Bodipy PC-Fluoreszenz wurde mit Filtersatz 44 (BP 475/40, FT 500, BP 530/50, Zeiss), die Perylen-Fluoreszenz mit Filtersatz 47 (BP 436/20, FT 455, BP 480/40, Zeiss) detektiert. Die

Fluoreszenz von Texas Red DHPE sowie Cy3 konnte mit dem Filtersatz 45 (BP 560/40, FT 585, BP 630/75, Zeiss) visualisiert werden.

3.5 Rasterkraftmikroskopie

3.5.1 Die Entwicklung vom Lichtmikroskop zum Rasterkraftmikroskop

Mikroskope eröffnen den Zugang zu Strukturen im Mikro- und Nanometermaßstab, die unserem Auge nicht unmittelbar zugänglich sind. Die stete Weiterentwicklung diverser Mikroskopietechniken ermöglicht unterschiedliche Anwendungen mit unterschiedlich guten Auflösungen. Das Auflösungsvermögen klassischer Lichtmikroskope ist begrenzt durch die Wellenlänge des Lichts und beträgt nach der Abbeschen Bedingung maximal die Hälfte der verwendeten Wellenlänge. Im sichtbaren Bereich liegt die Auflösungsgrenze daher bei etwa 200 nm (82). In der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird statt eines Lichtstrahls ein spannungsbeschleunigter Elektronenstrahl auf eine Probe gelenkt, welcher eine viel kleinere Wellenlänge als Licht besitzt, wodurch Strukturen bis zu 0,05 nm auflöst werden können (83). Die Präparate für die TEM müssen allerdings sehr dünn und im Vakuum stabil sein.

Eine spezielle Art der Mikroskopie stellt die Rastermikroskopie dar. Es handelt sich hier um eine andere Art der Bildentstehung. Ein Strahl oder eine feine Sonde „rastert“ Zeile für Zeile eine Probenoberfläche ab, wobei Punkt für Punkt chemische oder physikalische Eigenschaften, wie z. B. Kräfte oder elektrische Ströme, gemessen werden. Beim Rasterelektronenmikroskop (engl. *Scanning Electron Microscope*, SEM), welches erstmals 1937 von Max von Ardenne beschrieben wurde, wird ein feiner Elektronenstrahl über die Objektoberfläche geführt, was durch die Wechselwirkung mit der Probe u. a. zur Emission von Sekundärelektronen führt. SEM-Messungen müssen im Vakuum mit elektrisch leitenden Proben durchgeführt werden. Die Abbildungen weisen eine hohe Tiefenschärfe auf und erreichen eine laterale Auflösung bis zu 1 nm (82). Eine neue Generation von Mikroskopen leitete 1982 das von Gerd Binnig und Heinrich Rohrer entwickelte Rastertunnelmikroskop (engl. *Scanning Tunneling Microscope*, STM) ein, welches die Untersuchung von Oberflächen mit atomarer Auflösung erlaubt (84). Es handelt sich dabei

um eine Nahfeld-Mikroskopie, da eine feine Sonde so positioniert wird, dass der Abstand zur Probe nur wenige Nanometer beträgt. Durch Anlegen einer geringen Spannung zwischen Probe und Messspitze kann ein Tunnelstrom fließen, welcher ein Maß für den Abstand zwischen Probenoberfläche und Spitze ist. Es entstehen topographische Bilder mit einer horizontalen Auflösung bis zu 0,1 nm und einer vertikalen Auflösung bis zu 0,01 nm (82). Damit überhaupt ein Tunnelstrom fließen kann, muss die Oberfläche der Probe elektrisch leitend sein. Im Unterschied zum REM benötigt das STM jedoch kein Vakuum und kann auch an Luft oder in Flüssigkeiten messen. 1986 wurde von Binning, Gerber und Quate ein neuer von der STM abgeleiteter Mikroskopietyp vorgestellt, die Rasterkraftmikroskopie (engl. *Scanning Force Microscopy*, SFM) (85). Bei der SFM rastert ebenfalls eine sehr feine Messspitze, welche an einem Federbalken befestigt ist, die Probenoberfläche ab, wobei hier winzige atomare Kräfte zwischen Probe und Spitze gemessen werden. Eine weitere gängige Bezeichnung ist deshalb *Atomic Force Microscopy* (AFM). Diese Methode ermöglicht die Untersuchung von Strukturen nicht elektrisch leitender Proben im molekularen Bereich an Luft und auch in wässriger Umgebung. Die Rasterkraftmikroskopie ist deshalb besonders gut geeignet für hochauflösende Abbildungen biologischer Systeme. Die vertikale Auflösung beträgt bei dieser Technik ca. 0,1 nm, die horizontale ca. 1 nm (77, 86). Ebenfalls auf der Technik der Rastertunnelmikroskopie basierend konnten in den 1980er Jahren optische Rasternahfeldmikroskope (engl. *Scanning Nearfield Optical Microscope*, SNOM) entwickelt werden, welche mit einer lateralen Auflösung von bis zu 20 nm, die von klassischen Lichtmikroskopen übertreffen. Die Auflösung wird nicht durch die Wellenlänge des Lichtes, sondern durch den Abstand und die Geometrie einer Nahfeldsonde, welche sehr präzise unmittelbar vor dem zu beobachtenden Bereich positioniert wird, begrenzt (82).

3.5.2 Messprinzip

Das Messprinzip der Rasterkraftmikroskopie beruht auf einem mechanischen Abtastvorgang der Probenoberfläche mit einer scharfen Spitze, die an einem Federbalken (engl. *cantilever*) befestigt ist. Der allgemeine Messaufbau eines Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 3-9 dargestellt.

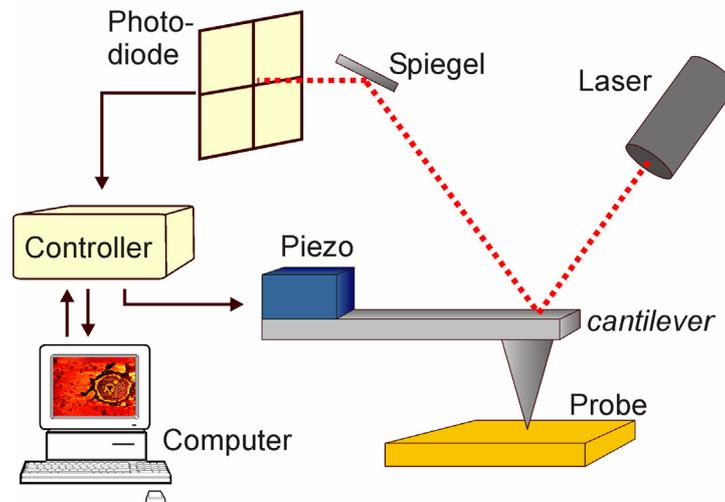


Abb. 3-9: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.

Durch Auslenkung des Federbalkens können die auftretenden Kräfte zwischen Spitze und Probe gemessen werden. Die Bewegung des *cantilevers* über die Probenoberfläche in x-, y- und z-Richtung wird über Piezoelemente gesteuert, so dass sich durch das zeilenweise Abtasten u. a. ein topographisches Bild ergibt. Die Verbiegung des *cantilevers* wird üblicherweise über ein Lichtzeigerprinzip detektiert. Dabei wird ein Laserstrahl auf die reflektierende Rückseite des Federbalkens fokussiert und von dort auf eine Photodiode gespiegelt. Eine Verbiegung des *cantilevers* führt also zu einer Positionsänderung des Laserspots auf der Photodiode. Durch eine Einteilung der Diode in vier Quadranten kann die Verbiegung des Federbalkens in z-Richtung, sowie die Verkippung bezüglich der Längsachse des Federbalkens detektiert werden. Das Photostromsignal der Diode wird elektronisch verstärkt und bei einer Abweichung des Signals zur Regelgröße, welche im einfachsten Fall eine konstante *canilever*-Verbiegung sein kann, wird ein Signal an den z-Piezo weitergeleitet, der die Position der Feder so ändert, dass die Regelgröße wieder erreicht wird. Punkt für Punkt wird also eine Regelgröße über die Rückkopplungsschleife durch einen Controller (PID-Regler = Proportional-Integral-Differential-Regler) konstant gehalten.

3.5.3 Kräfte in der Rasterkraftmikroskopie

Die Kräfte, welche bei der Rasterkraftmikroskopie zwischen Probe und Spitze wirken, können über die Verbiegung des *cantilevers* gemessen werden. Dabei gilt für die wirksame Kraft F nach dem Hook'schen Gesetz:

$$F = k \cdot z_F \quad (3-2)$$

Dabei ist k die Federkonstante und z_F die Auslenkung des *cantilevers*. Attraktive Kräfte ($F < 0$) bewirken somit eine negative Federauslenkung ($z_F < 0$). Die Kräfte, die beim Messen auftreten, kann man unter anderem durch die geeignete Wahl des *cantilevers* mit einer entsprechenden Federkonstante steuern. Derzeit sind handelsübliche *cantilever* mit Federkonstanten zwischen 0,006 N/m und 40 N/m erhältlich. Die Federkonstante für rechteckige Federbalken kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$k = \frac{E \cdot w}{4} \left(\frac{t}{l} \right)^3 \quad (3-3)$$

Dabei ist E das Elastizitätsmodul, w die Breite, t die Dicke und l die Länge des Balkens. Da jedoch der Wert t für die Dicke des *cantilevers* stark fehlerbehaftet sein kann und dieser mit der dritten Potenz in die Berechnung von k eingeht, ist es präziser die Federkonstante zu messen. Sie kann beispielsweise ermittelt werden, indem man mit dem Rasterkraftmikroskop das thermische Rauschen des Federbalkens bestimmt und nach Hutter die Federkonstante berechnet (87). Eine weitere charakteristische Größe des *cantilevers* ist dessen Resonanzfrequenz f_0 . Diese kann ebenfalls über das thermische Rauschen ermittelt oder nach Gleichung

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{m}} \sim \frac{t}{l^2} \cdot \sqrt{\frac{E}{\rho}} \quad (3-4)$$

berechnet werden. ρ steht dabei für die Massendichte und m für die Masse des Federbalkens.

Die auftretenden Kräfte zwischen *cantilever*-Spitze und Probe sind entweder anziehender oder abstoßender Natur und sind abhängig vom Abstand d der Spitze zur Probenoberfläche. Die Kräfte können in erster Näherung durch ein Hartkugelmodell beschrieben werden, welches die Wechselwirkung zweier ungeladener Atome oder Moleküle in Abhängigkeit ihres Abstands durch das Lennard-Jones-Potential beschreibt (79). Dieses

Potential setzt sich aus einem repulsiven und einem attraktiven Term zusammen. Nähern sich die Teilchen an, überwiegen zunächst die attraktiven Kräfte, die durch van-der-Waals-Wechselwirkungen entstehen. Die van-der-Waals-Wechselwirkungen setzen sich aus der Keesom-Wechselwirkung zwischen zwei Dipolen, der Debye-Wechselwirkung zwischen einem Dipol und einem apolaren Molekül und der London'schen Dispersionswechselwirkung zwischen zwei apolaren Molekülen zusammen. Diese Kräfte sind allgemein abhängig vom Dipolmoment und der Polarisierbarkeit der Moleküle. Ab einem bestimmten Abstand der sich nähernden Moleküle steigen die repulsiven Kräfte schnell an und bestimmen das Lennard-Jones-Potential. Die Abstoßung beruht auf der Pauli-Repulsion durch Überlappung der Elektronenorbitale zweier Moleküle. Die bei der Rasterkraftmikroskopie auftretenden Kräfte sind auch vom Messmedium abhängig. So können z. B. bei Messungen an Luft attraktive Kapillarkräfte auftreten und gegenüber den van-der-Waals-Wechselwirkungen dominieren.

Kraft-Abstands-Kurven

Mit der Rasterkraftmikroskopie kann man durch Annäherung des *cantilevers* an die Probenoberfläche das gesamte Wechselwirkungspotential durchlaufen. Es ergeben sich Kraftkurven, in denen die vertikale Auslenkung z_F der Feder gegen die z-Piezoverschiebung z_P aufgetragen ist. Die Auslenkung z_F ist dabei ein Maß für die Wechselwirkungskraft F (siehe Gleichung 3-2). Da das Rohsignal von z_F in Volt gemessen wird, muss zunächst die *cantilever*-Sensitivität (Einheit: nm/V) bestimmt werden, um die vertikale Verbiegung in Nanometer zu erhalten. Durch die Kenntnis der Federkonstante kann damit aus z_F die Kraft F errechnet werden. Um die Kraftkurve ($z_F = f(z_P)$) in eine echte Kraft-Abstands-Kurve ($F = f(d)$) umzuwandeln, muss zusätzlich die Piezobewegung z_P in den Abstand d zwischen Probe und Spitze umgewandelt werden (88). Die Zusammenhänge von z-Piezobewegung z_P , Federauslenkung z_F , des Spitze-Probe-Abstands d und der Länge s der *cantilever*-Spitze werden in Abbildung 3-10 veranschaulicht.

Der Spitze-Probe-Abstand d errechnet sich zu:

$$z_P = d + s - z_F \quad (3-5)$$

$$\Delta z_P = \Delta d - \Delta z_F \quad (3-6)$$

$$\Delta d = \Delta z_P + \Delta z_F \quad (3-7)$$

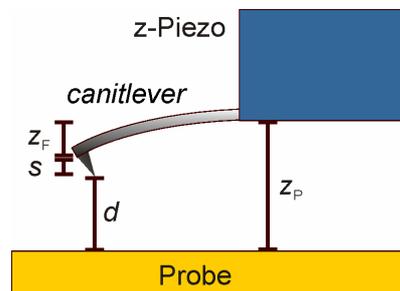


Abb. 3-10: Veranschaulichung der relevanten Parameter für die Beschreibung einer Kraftkurve. z_P ist dabei die Piezobewegung, z_F die Federauslenkung, d der Spitze-Probe-Abstand und s die Länge der Spitze.

Das Hook'sche Gesetz kann mit dem Spitze-Probe-abstandsabhängigen Kraftgradienten

$\frac{\delta F(d)}{\delta d}$ folgendermaßen beschrieben werden:

$$\frac{\delta F(d)}{\delta d} \cdot \Delta d = k \cdot \Delta z_F \quad (3-8)$$

Einsetzen von Gleichung 3-7 ergibt

$$\frac{\delta F(d)}{\delta d} \cdot (\Delta z_P + \Delta z_F) = k \cdot \Delta z_F \quad (3-9)$$

und nach Umformung die Beziehung für die Steigung $\frac{\Delta z_F}{\Delta z_P}$ der Kraftkurve:

$$\frac{\Delta z_F}{\Delta z_P} = \frac{1}{\frac{k}{\frac{\delta F(d)}{\delta d}} - 1} \quad (3-10)$$

Der Verlauf einer Kraftkurve lässt sich anhand von Abbildung 3-11 beschreiben.

Nähert man den *cantilever* der Probe, so wirken bei einem großen Abstand keine Kräfte und die Federauslenkung z_F ist null. Bei weiterer Annäherung machen sich allmählich attraktive Kräfte bemerkbar und bei einem bestimmten Abstand wächst der Kraftgradient auf die Federkonstante an ($\frac{\delta F(d)}{\delta d} = k$), der Nenner von Gleichung 3-10 wird damit null

und es kommt zu einer mechanischen Instabilität (*Snap-on*). Die Tastspitze wird abrupt in mechanischen Kontakt mit der Probe gebracht. Der Abstand d zwischen Spitze und Probe ist null.

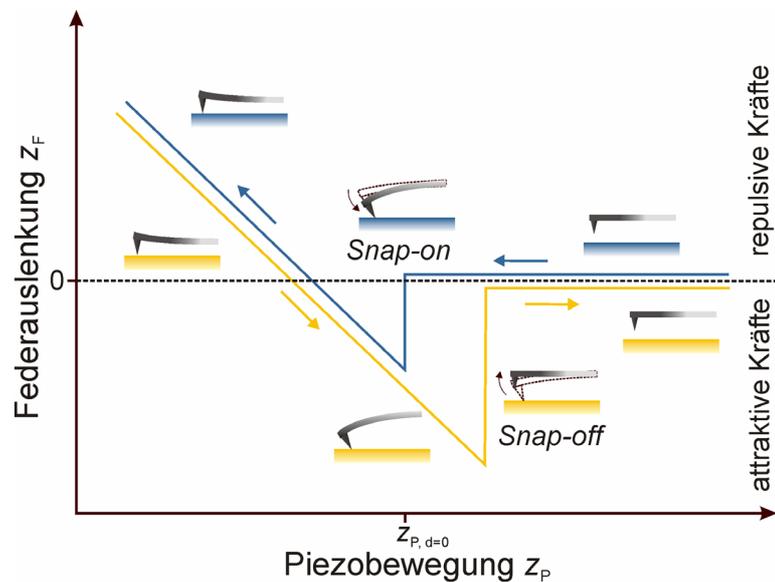


Abb. 3-11: Schematische Darstellung der Federauslenkung z_F als Funktion von z_P (Kraftkurve).

Im weiteren Verlauf steigen die repulsiven Kräfte, und im Falle einer harten Probe geht die Steigung $\frac{\Delta z_F}{\Delta z_P}$ der Kraftkurve gegen -1, da der Betrag des Kraftgradienten die Feder-

konstante bei weitem übersteigt ($\frac{\delta F(d)}{\delta d} \gg k$). Entlang dieser Kontaktgeraden ändert sich der Abstand d zwischen Spitze und Probe nicht mehr.

Die Werte des Abstands d werden folgendermaßen errechnet:

$$d = z_P - z_{P,d=0} + z_F \quad (3-11)$$

Bei $z_{P,d=0}$ handelt es sich um die Position des z -Piezos, bei dem der Abstand d null ist und stellt somit eine Konstante dar. Beim Zurückfahren des z -Piezos nehmen die repulsiven Kräfte zwischen Spitze und Probe kontinuierlich ab. Durch Adhäsionskräfte kommt es beim Entfernen des *cantilevers* in der Regel zu einer größeren negativen Federauslenkung als beim Annähern. Bei einem bestimmten Abstand kommt es wiederum zu einer mechanischen Instabilität (*Snap-off*). Durch *Snap-on* und *Snap-off* werden weite Regionen, in denen attraktive Kräfte wirken, übersprungen. In der Kraftspektroskopie werden Kraftkurven verwendet, um Oberflächeneigenschaften wie beispielsweise Elastizität zu untersuchen (88).

3.5.4 Betriebsmodi

In der Rasterkraftmikroskopie gibt es eine Vielzahl an Messmodi. Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene Arten, die statischen und die dynamischen Modi. Der wichtigste statische Modus ist der *contact mode*, der *intermittent contact mode* ist der wichtigste dynamische Modus.

Der contact mode

Im *contact mode* ist der *cantilever* in ständigem repulsiven Kontakt mit der Probenoberfläche. Dabei kann man zwischen dem *constant height mode* und dem *constant force mode* unterscheiden. Im *constant height mode* ist die Position des z-Piezos z_P bei jedem Punkt gleich. Die variierende vertikale Federverbiegung z_F wird nicht durch das Piezoelement ausgeglichen. Die wirkende Kraft zwischen Federspitze und Probe kann durch einen hohen Wert der Federverbiegung deshalb sehr groß sein. Im *constant force mode* ist die Federverbiegung z_F und damit die wirkende Kraft konstant. Verändert sich die Federauslenkung bei einer Erhöhung auf der Oberfläche, wird dies auf der Photodiode detektiert und das z-Piezoelement erhält das Signal die Position des Piezos z_P so zu ändern, dass die *cantilever*-Verbiegung wieder der gewünschten Verbiegung (*Setpoint*) entspricht. Der *contact mode* ist der einfachste Modus und leicht zu realisieren. Es ist der einzige Modus mit dem man „atomare Auflösung“ erhalten kann. Die Scangeschwindigkeit kann groß gewählt werden, da der Regelkreis recht unempfindlich ist. Einen Nachteil stellen die stark wirkenden lateralen Kräfte dar, da Objekte, die relativ schwach an der Oberfläche immobilisiert sind, weggeschoben werden können. Beim Abbilden von weichen Proben kann sich durch die Kombination von hohen lateralen und vertikalen Kräften die laterale Auflösung verschlechtern und die Probe beschädigt werden, indem die Spitze in die Probe eindringt und Substanz während der Abbildung verschiebt. Um die Kräfte klein zu halten, sollten deshalb in diesem Modus *cantilever* mit sehr kleinen Federkonstanten ($< 0,5 \text{ N/m}$) benutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden *contact mode* Messungen ausschließlich im *constant force mode* durchgeführt.

Die Reibungskraftmikroskopie

In der Reibungskraftmikroskopie (engl. *lateral force microscopy* oder *friction force microscopy*) unterliegt der *cantilever* bei einer lateral wirkenden Kraft einer Torsion. Diese laterale Verbiegung des Federbalkens wird auf der Photodiode detektiert. Es handelt sich um einen statischen Modus. Bereiche mit unterschiedlichen Reibungskoeffizienten ergeben eine unterschiedliche Torsion des *cantilevers*. Die Scanrichtung sollte dabei senkrecht zur Längsachse des *cantilevers* sein. Bei Materialunterschieden ohne topographische Struktur erhält man ein Signal, wobei sich das Vorzeichen der lateralen Verbiegung beim Wechsel der Scanrichtung (*trace* bzw. *retrace*) umkehrt. Man spricht von einer Kontrastinversion. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 3-12 A veranschaulicht.

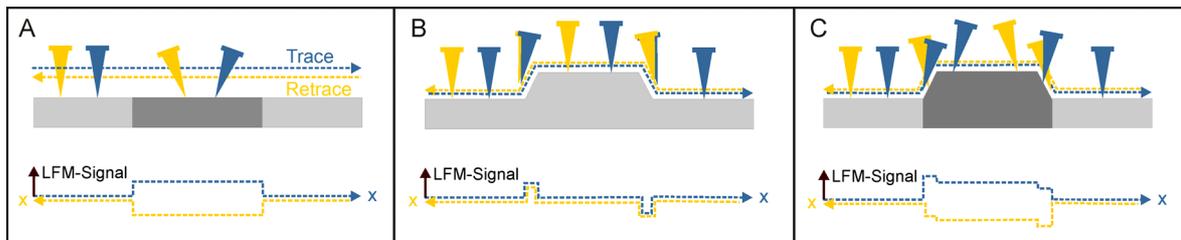


Abb. 3-12: Laterale Auslenkung des *cantilevers* und reibungskraftmikroskopisches Signal (LFM-Signal) in Abhängigkeit der Scanrichtung (*trace* bzw. *retrace*). Dargestellt sind Oberflächen mit **A** Materialunterschieden ohne topographische Struktur, **B** topographischer Struktur ohne Materialunterschiede und **C** topographischer Struktur und Materialunterschieden.

Topographische Strukturen ohne Materialunterschiede können in den Randbereichen der Struktur ebenfalls ein Signal liefern, allerdings tritt hier keine Kontrastinversion auf (siehe Abbildung 3-12 B). Topographische Strukturen mit anderen Reibungskoeffizienten können in der Reibungskraftmikroskopie unterschieden werden, da hier eine Kontrastinversion bei Wechsel der Scanrichtung auftritt (siehe Abbildung 3-12 C).

Der intermittent contact mode

Im *intermittent contact mode*, auch *tapping mode* genannt, wird der *cantilever* durch ein zusätzliches Piezoelement im Bereich seiner Resonanzfrequenz f_0 zur sinusförmigen Schwingung angeregt. Die Messspitze berührt dabei die Probenoberfläche periodisch und durchläuft im Verlauf einer Schwingungsperiode sowohl Bereiche, in denen attraktive Kräfte als auch Bereiche in denen repulsive Kräfte wirken. Vor der Messung wird die

Resonanzfrequenz durch ein sogenanntes *tuning* (auch *frequency sweep*) ermittelt. Dabei wird der Federbalken bei unterschiedlichen Frequenzen angeregt und die Amplitude des *cantilevers* sowie die Phasenverschiebung zwischen Anregung und tatsächlicher Federschwingung detektiert. Beim frei schwingenden *cantilever*, d. h. ohne Kontakt mit der Probe, handelt es sich um eine erzwungene harmonische Schwingung. Die Resonanzfrequenz liegt deshalb im Idealfall bei einer maximalen Amplitude und einer Phasenverschiebung φ von $\pi/2$. Wirken durch die Probenoberfläche auf den schwingenden Federbalken Kräfte, wird die Amplitude gedämpft und die Phase verschoben. Nach dem *tuning* wählt man die Frequenz, mit der die Feder schwingen soll, sowie die Regelgröße, welche im *tapping mode* eine konstant gedämpfte Amplitude ist. Die Frequenz wird gewöhnlich etwas niedriger gewählt als die Frequenz, bei der die Amplitude des frei schwingenden *cantilevers* maximal ist, da es durch Wechselwirkung mit der Probe zu einer leichten Verschiebung der Eigenfrequenz des Systems kommt. Während der Messung regelt der z-Piezo die Position des *cantilevers*, so dass an jedem Punkt die erwünschte Dämpfungsamplitude erreicht wird. Die herrschende Kraft zwischen Spitze und Probe ist damit während der Messung konstant. Die Höheninformation von Strukturen erhält man durch die Nachregelung aus der Piezobewegung z_p . Eine weitere Information in diesem Modus liefert das Signal der Phasenverschiebung, welches zusätzlich zur Höhe aufgezeichnet wird. Bei Unterschieden in Materialeigenschaften der Probe, kann dies zu einer unterschiedlichen Phasenverschiebung zwischen anregender und angeregter Schwingung führen. So können Strukturen visualisiert werden, die keine Höhenunterschiede auf der Oberfläche aufweisen.

Da in diesem Modus die lateralen Kräfte relativ gering sind, ist er besonders gut für die Abbildung von biologischen Proben geeignet (89). Ein Eindringen der Spitze in die Proben und ein Verschieben von Substanz in lateraler Richtung tritt nicht so leicht auf. Die laterale Auflösung ist in diesem Modus für die meisten Proben höher (90). Das Abbilden der Proben muss allerdings meist langsamer als im *contact mode* durchgeführt werden. Das Messen von Proben an Luft wird im *tapping mode* typischerweise mit harten *cantilevern* mit Federkonstanten von 30-50 N/m und Resonanzfrequenzen von 300-400 kHz durchgeführt. Diese *cantilever* führen an Luft zu stabilen Abbildungen. In Flüssigkeiten kann mit Federbalken gemessen werden, wie sie auch im *contact mode* üblich sind. Die Resonanz liegt hier bei niedrigeren Frequenzen (meist < 20 kHz). Die Federkonstante darf

nicht zu klein sein, da sonst keine stabile Resonanzschwingung erhalten wird. Im Vergleich zum *contact mode* sind die auftretenden vertikalen Kräfte bei gleichem *cantilever* allerdings in derselben Größenordnung (89).

3.5.5 Artefakte und technische Schwierigkeiten

Das Messprinzip der Rasterkraftmikroskopie erscheint zunächst einfach. Die Messung von Kräften im Bereich von Nano- und Piconewton und Längen im Nanometermaßstab erfordert allerdings hohe Ansprüche an die technische und elektronische Umsetzung dieser Methode. Technische Schwierigkeiten und dadurch erzeugte Messartefakte sollen im Folgenden erläutert werden.

Messspitzen-Artefakte

Die Geometrie der *cantilever*-Spitze spielt eine Rolle bei der Abbildung von Strukturen, die sich in der gleichen Größenordnung befinden wie die Spitze. Die Höhe des Objekts wird zwar richtig bestimmt, dafür kann es aber zu einer fehlerhaften Abbildung der lateralen Geometrie von Objekten kommen (89). Das Bild setzt sich aus der Spitzenform und der Form des abzutastenden Objektes zusammen. Man spricht von einer Spitze-Probefaltung. Steile Strukturen werden durch mehr oder weniger stumpfe Spitzen in ihrer lateralen Ausdehnung überbestimmt (Abb. 3-13 A).

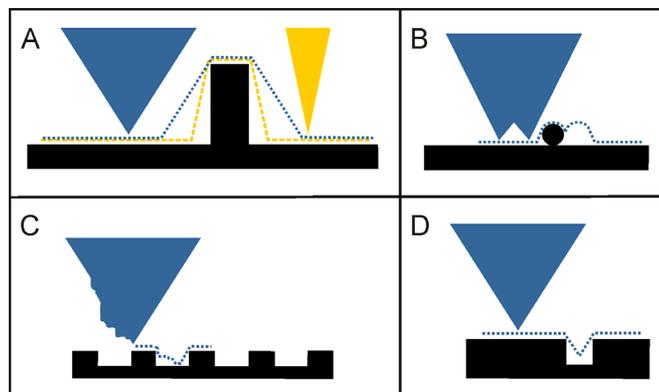


Abb. 3-13: Mögliche Messartefakte in der Rasterkraftmikroskopie bedingt durch die Spitzegeometrie des *cantilevers*.

Beschädigte oder verschmutzte *cantilever*-Spitzen, die eine sogenannte *Doppelspitze* aufweisen, können bei sehr kleinen Strukturen zu einer Wiederholung der Struktur im Bild führen (siehe Abbildung 3-13 **B**), man spricht von „*double image*“. Kleine Partikel können hierbei auch fälschlicherweise als dreieckige oder längliche Objekte dargestellt werden. Bei tiefer liegenden Strukturen kann eine kontaminierte Spitze ebenfalls die Abbildung verfälschen (Abb. 3-13 **C**). Die Abbildung von sehr schmalen, tiefen Löchern kann durch die Geometrie der Spitze zu einer lateralen und auch vertikalen Unterbestimmung des Objekts führen (Abb. 3-13 **D**).

Scanner-Artefakte

Piezoelektrische *Scanner* sind die wichtigsten Steuerelemente in der Rasterkraftmikroskopie. Die feinen Keramiksensoren verformen sich bei Anlegen einer Spannung (inverser Piezoeffekt) und können so die x-, y- und z-Position des *cantilevers* verändern. Die Verformung eines Piezoelementes als Funktion der angelegten Spannung ist nicht linear (77). Außerdem unterliegt die Richtung der Verformung einer Hysterese. Die Effekte der Nichtlinearität und der Hysterese sind in Abbildung 3-14 dargestellt.

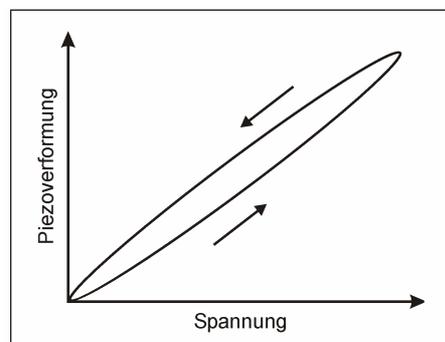


Abb. 3-14: Die Verformung des Piezoelements in Abhängigkeit von der angelegten Spannung unterliegt einem nichtlinearen Zusammenhang und die Richtung der Verformung einer Hysterese.

Nichtlinearität und Hysterese können sich auf die horizontale Darstellung der Oberfläche auswirken, indem Strukturen verzerrt werden. Deshalb ist es wichtig die Piezoelemente zu linearisieren. Dies kann durch Kalibrierung mit einem Gitter bekannter Abmessungen geschehen oder durch einen Sensor, der die tatsächliche Position des Scanners misst. Da

die Größenordnungen bezüglich der Höhe meist viel kleiner als in x-, y-Richtung sind, ist der Effekt der Nichtlinearität des z-Piezoelements viel kleiner. Eine Kalibrierung mit nur einer definierten Höhe ist daher ausreichend. Die Kalibrierungen sollten nach einer gewissen Zeit wiederholt werden, da sich die Sensitivität der Piezoelemente bezüglich der Spannung über einen längeren Zeitraum ändert.

In manchen SFM-Bildern kann ein sogenannter *Creep*-Effekt (engl. „kriechen“) beobachtet werden (Abb. 3-15 A). Dies ist bedingt durch eine schnelle Änderung der Steuerungsspannung und einer zeitlich verzögerten Verformung des Piezoelements bis die der Spannung zugehörige Ausdehnung erreicht ist. Man spricht von einer *Drift*.

Ein weiteres Artefakt bedingt durch die *Scanner*-Elemente wird als *Bow*-Effekt (engl. „Bogen“) bezeichnet (89). In Abbildung 3-15 B zeigt sich dies in einem bogenförmigen Verlauf der Höhe. Dies liegt begründet in der Tatsache, dass die Scanner an einem Ende am Mikroskop befestigt sind und am anderen freien Ende den *cantilever* bewegen. Dieser Effekt ist vor allem bei großen Scanbereichen bemerkbar. Die Korrektur dieses Artefakts kann durch Bildbearbeitung erfolgen, indem ein polynomialer Fit zweiter oder dritter Ordnung angewandt wird (Abb. 3-15 C).

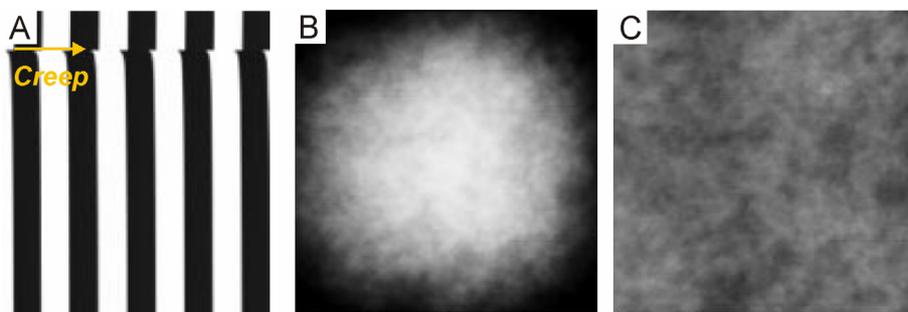


Abb. 3-15: Mögliche Messartefakte in der Rasterkraftmikroskopie bedingt durch die Piezoelemente. Es kann ein **A** *Creep*- oder **B** *Bow*-Effekt beobachtet werden. **C** Der *Bow*-Effekt lässt sich korrigieren.

Sonstige technische Schwierigkeiten

Durch Temperaturgradienten kann eine thermische Drift der Elektronik und der Laserposition eintreten. Deshalb ist es wichtig, das System stabilisieren zu lassen und gegebenenfalls nachjustieren. Da akustische Schwingungen und Gebäudeschwingungen Abbildungsartefakte erzeugen können, ist es sinnvoll SFM-Messungen auf einem Dämpfungstisch mit Akustikbox durchzuführen. Bei jeder Messung ist es wichtig, die

optimalen Parameter (vertikale *cantilever*-Verbiegung, Scangeschwindigkeit, Amplitude, ...) für eine bestmögliche Abbildung zu wählen. Diese können je nach Probe und verwendetem *cantilever* stark variieren. Kraft-Abstands-Kurven können dabei helfen die richtigen Parameter zu finden.

Nach der Messung müssen die gespeicherten Rohdatenbilder durch ein entsprechendes Bildbearbeitungsprogramm angepasst werden, da die vermessene Oberfläche zunächst schlecht zu erkennen ist. Da die tatsächliche Ebene der Probe immer geneigt ist, muss diese Schiefelage durch eine Gleichung ersten Grades von jeder Linie subtrahiert werden. Das bereits erwähnte *Bow*-Artefakt sollte ebenfalls korrigiert werden. Bei der Bearbeitung der Bilder durch Anwendung von Kurven-Fits besteht die Gefahr zusätzlich Artefakte einzuführen, falls zum Beispiel große Objekte auf der Oberfläche nicht von der Korrektur ausgenommen werden.

Durchführung

Die rasterkraftmikroskopischen Messungen wurden mit einem JPK NanoWizard I/II (JPK Instruments, Berlin) durchgeführt. Als Probenkammer diente eine Flüssigkeitszelle aus Teflon, in der sich die Lipiddoppelschicht immobilisiert auf *Mica* oder Silizium befand. Das Volumen der Kammer betrug ca. 1 ml. Alle Messungen fanden in PBS-haltigem Puffer (2,7 mM KCl, 136,9 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) statt. Im *contact mode* wurde mit Silizium-*cantilevern* (CSC38) der Firma Mikromasch (Tallinn, Estonia) mit einer typischen Resonanzfrequenz von 10 kHz und einer nominalen Federkonstante von 0,03 N/m gemessen. Im *tapping-mode* wurden Silizium-*cantilever* (CSC37) der Firma Mikromasch mit einer Resonanzfrequenz von 21 kHz und einer Federkonstante von 0,3 N/m verwendet. Die Scangeschwindigkeit wurde an die Scangröße angepasst und lag zwischen 0,6 und 2 Hz. Die Bildauflösung betrug 512x512 Pixel.

4 Ergebnisse

Das Protein Shiga Toxin hat die Möglichkeit, durch Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose in die Zelle transportiert zu werden (10-12, 16). Neue Studien an Zellen und *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) beschreiben in diesem Zusammenhang die Ausbildung von Membraninvaginationen (16). Durch die Bindung von STxB an Globotriaosylceramid Gb₃ bilden sich STxB-Gb₃-Cluster, die zu einer negativen Membrankrümmung und damit zu Invaginationen führen können (20, 91). Diese Invaginationen gehen vermutlich mit einer Reorganisation der Lipide induziert durch die Proteinbindung einher, was aus Experimenten an Zellsystemen mit dem polarisationssensitiven Membranfarbstoff Laurdan abgeleitet wurde (17).

In dieser Arbeit wurde die STxB-Bindung an das Rezeptorlipid Gb₃ mittels planarer, artifizieller Membransysteme mit hochauflösenden Methoden untersucht. Von Interesse waren dabei die laterale Organisation des Proteins auf der Membran sowie die Lipidreorganisation durch die Proteinbindung. Durch Kombination der Rasterkraft- (SFM) mit der Fluoreszenzmikroskopie konnten simultan die Bindung des Proteins und die Organisation von Membranstrukturen mit hoher lateraler Auflösung visualisiert werden. Die Proteinbindung wurde an Membranen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung charakterisiert. Im Speziellen wurde dabei auch die molekulare Struktur des Rezeptorlipids Gb₃ variiert, so dass der Einfluss verschiedener Gb₃-Lipide auf die Proteinbindung und auf eine möglicherweise auftretende Membranreorganisation untersucht werden konnte.

4.1 STxB-Bindung an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40/35/20/5)-Lipiddoppelschichten

Um sich der Zusammensetzung der biologischen Plasmamembran anzunähern, wurden artifizielle Lipiddoppelschichten zusammengesetzt aus DOPC, Sphingomyelin, Cholesterin und Gb₃ verwendet. Sphingomyelin und Glycosphingolipide sind überwiegend in der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Derzeit wird die Existenz von Membranmikrodomänen, auch *rafts* genannt, in biologischen Membranen diskutiert (siehe

Kapitel 1.3). Es handelt sich dabei um Bereiche, angereichert mit Sphingolipiden und Cholesterin, die sich im Zustand der flüssig-geordneten (engl. *liquid-ordered*, l_o) Phase befinden (92). Es wird vermutet, dass Gb₃ und Shiga Toxin in *rafts* lokalisiert sind (19, 20, 22, 24). Deshalb wurde die Bindung von STxB an typische „raft“-Lipiddoppelschichten untersucht.

Kontrollexperiment

Um eine unspezifische Proteinbindung an die Lipiddoppelschichten auszuschließen, wurde zuerst eine auf *Mica* immobilisierte Membran bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (45:35:20) mit 60 nM STxB inkubiert. Die Lipiddoppelschicht wurde, wie bei allen Lipidmischungen, durch Spreiten von ca. 50 nm großen unilamellaren Vesikeln in Ca²⁺-haltigem Puffer (20 mM TRIS/HCl, 1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,4) auf *Mica* erzeugt. Für die Untersuchungen wurde die Membran mit PBS-Puffer (1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 136,9 mM NaCl, pH 7,4) gespült, da die Messungen mit Protein in PBS-Puffer durchgeführt werden. Vor Proteinzugabe wurde die Membran rasterkraftmikroskopisch untersucht. In der topographischen Abbildung kann eine Struktur visualisiert werden, die auf die Koexistenz zweier Lipidphasen schließen lässt. Der Höhenunterschied zwischen beiden Lipidphasen beträgt 0,4 nm ($\pm 0,1$ nm, n = 12) (Abb. 4-1 A/C). Die Höhendifferenz wurde mittels detaillierter Pixelanalyse über mehrere Bilder von verschiedenen Proben bestimmt. In Abbildung. 4-1 C ist ein repräsentatives Histogramm einer Bildstelle dargestellt.

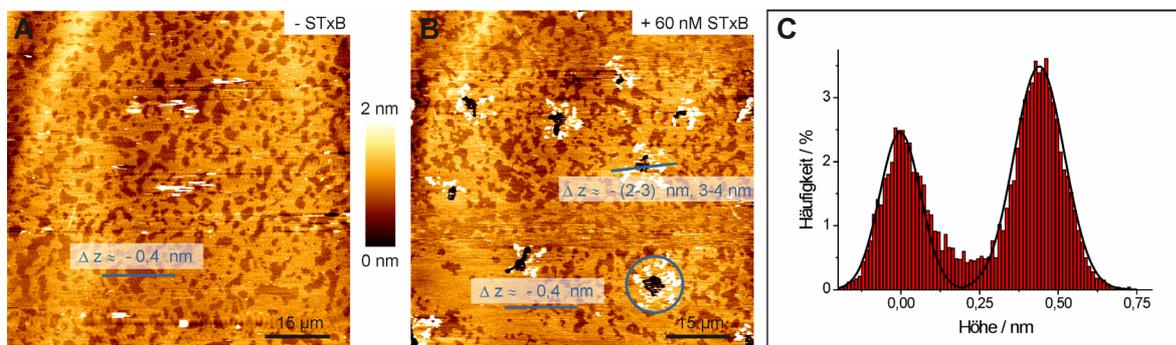


Abb. 4-1: Inkubation einer Membran bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (45:35:20) mit 60 nM STxB (Kontrollexperiment). Topographische SFM-Aufnahmen (*contact mode*) **A** vor und **B** nach Proteinzugabe. **C** Durch Pixelanalyse wurde der Höhenunterschied zwischen den Lipidphasen zu 0,4 nm ($\pm 0,1$ nm, n = 12) bestimmt. Gezeigt ist ein typisches Histogramm. Substrat: *Mica*.

Die tiefer liegenden Bereiche werden der flüssig-ungeordneten (engl. *liquid-disordered*, l_d) Phase zugewiesen, welche mit DOPC angereichert ist. Die flüssig-geordnete Phase ist angereichert mit Sphingomyelin und Cholesterin (44), und weist durch eine stärker geordnete Packung der Lipide eine größere Membrandicke auf (93). Nach Inkubation der Membran mit Protein wurde im topographischen Bild neben den unveränderten Lipiddomänen eine zusätzliche Struktur beobachtet, die in ihrer lateralen Ausdehnung die der Lipiddomänen deutlich übertrifft (Abb. 4-1 **B**, Kreis). Die Mitte dieser Struktur liegt ca. 2-3 nm tiefer als die umgebende Membran und im Randbereich ist 3-4 nm hohes Material angeordnet.

Nach Zugabe von Cy3-markiertem STxB konnte die entstandene Struktur durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dem Protein zugeordnet werden (Abb. 4-2 **A**). Es lagert sich unspezifisch in Membrandefekte ein, was sich durch Vergleich der Cy3- mit den Perylen-Fluoreszenzbildern an derselben Stelle, ableiten lässt (Abb. 4-2 **B**). Die Perylen-Fluoreszenz ist an diesen Stellen schwarz, was die Existenz von Membrandefekten erkennen lässt.

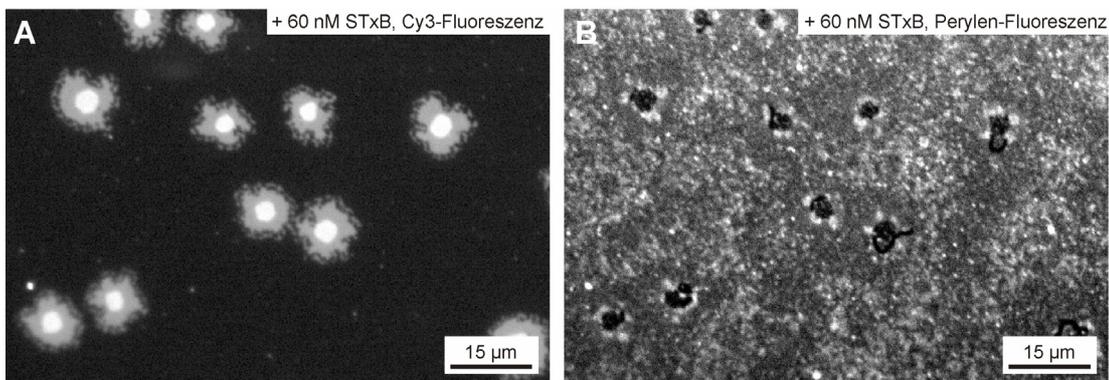


Abb. 4-2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (45:35:20) dotiert mit 0,5 mol% Perylen nach Inkubation mit 60 nM Cy3-gelabeltem Protein. **A** Cy3- und **B** Perylen-Fluoreszenzaufnahme. Substrat: *Mica*.

Die Membrandefekte entstehen größtenteils erst durch Inkubation der Membran mit STxB. Um die Membrandefekte ist auf der Membranoberfläche ebenfalls unspezifisch gebundenes Protein angehäuft, was im SFM-Bild als Höhe detektiert wurde, und im Cy3-Fluoreszenzbild als zweite Graustufe, die eine geringere Fluoreszenzintensität aufweist. Die unspezifische Bindung des Proteins in Membrandefekten ist auf das Substrat *Mica* zurückzuführen und wird in Kapitel 4.3 genauer beschrieben. Intakte Bereiche der

Lipiddoppelschicht weisen in Perylen-Fluoreszenzaufnahmen zwei Graustufen auf, was an der ungleichmäßigen Verteilung des Fluorophors in den existierenden Lipidphasen liegt. Eine unspezifische Bindung von STxB an intakte Membranbereiche von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin-Lipiddoppelschichten konnte nicht beobachtet werden. Die Cy3-Fluoreszenz ist in diesen Bereichen schwarz, da kein Protein gebunden hat. Außerdem ändert sich der Höhenunterschied zwischen den existierenden Lipidphasen nach Proteinzugabe nicht, was aus topographischen SFM-Bildern ersichtlich wird.

Bindung von STxB-wt an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen auf dem Substrat Mica

Auf Glimmer immobilisierte DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen wurden mit STxB inkubiert, um die laterale Organisation des spezifisch an Gb₃ gebundenen Shiga Toxins zu charakterisieren. Zunächst wurde die Lipiddoppelschicht vor Proteinzugabe untersucht. Das topographische SFM-Bild zeigt die Existenz zweier Lipidphasen (Abb. 4-3 A). Die tiefer liegenden Bereiche werden der l_d -Phase zugewiesen, die umgebende höher liegende Struktur der l_o -Phase. Eine Höhenanalyse mehrerer SFM-Aufnahmen ergab, dass die l_o -Phase 0,5 nm ($\pm 0,1$ nm, $n = 20$) höher ist als die l_d -Phase (Abb. 4-3 B).

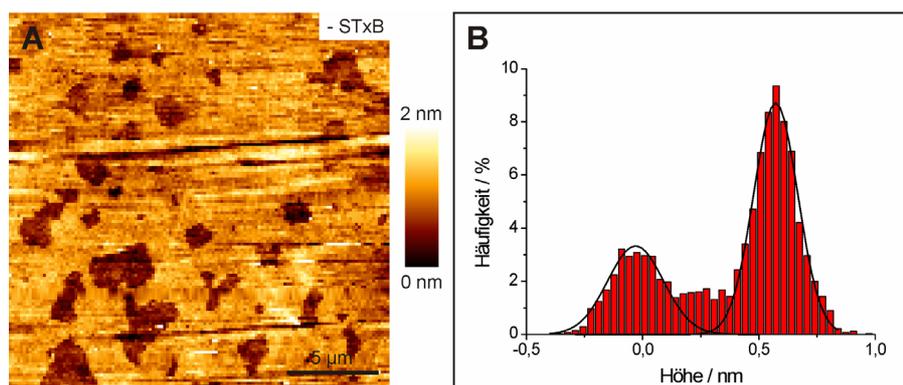


Abb. 4-3: **A** Topographische Aufnahme (*contact mode*) einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht. **B** Die statistische Höhenanalyse ergibt einen Höhenunterschied zwischen l_o - und l_d -Phase von 0,5 nm ($\pm 0,1$ nm, $n = 20$). Substrat: *Mica*.

Die Größe der Membrandomänen der phasenseparierten Doppelschichten variierte bei den verschiedenen Membranpräparationen stark. Außerdem war es teils schwierig, die phasenseparierten Strukturen mit dem Rasterkraftmikroskop abzubilden. Bei geringfügiger Erhöhung der auf die Probe wirkenden Kräfte, konnte kaum ein Höhenunterschied zwischen l_o - und l_d -Phase detektiert werden.

Die Lipiddoppelschicht wurde mit 100 nM Cy3-gelabeltem STxB 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Spülen mit PBS-Puffer wurde ungebundenes Protein entfernt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Proteins zeigen eine inhomogene Verteilung des STxB auf der Oberfläche (Abb. 4-4 A). Während große Gebiete des Fluoreszenzbildes hell erscheinen, sind auch dunkle Bereiche sichtbar, die die Abwesenheit von gebundenem Protein kennzeichnen.

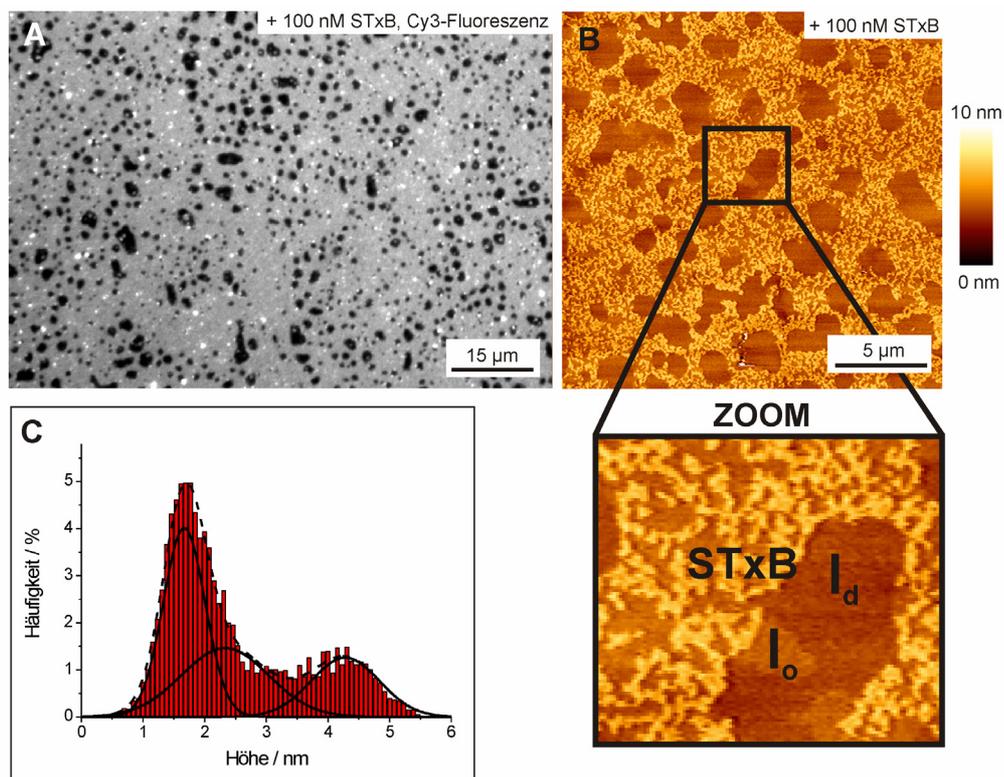


Abb. 4-4: Bindung von STxB an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen. **A** Fluoreszenzbild des markierten Proteins. **B, Zoom** Das topographische SFM-Bild (*tapping mode*) zeigt STxB-Cluster lokalisiert auf der l_o -Phase. **C** Durch Pixelanalyse wurde der Höhenunterschied des STxB zur l_o -Phase zu 2,2 nm ($\pm 0,2$ nm, $n = 26$) bestimmt. Der Höhenunterschied zwischen l_o - und l_d -Phase beträgt 0,6 nm ($\pm 0,1$ nm, $n = 10$). Substrat: *Mica*.

Um die Regionen mit gebundenem STxB näher zu betrachten, wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die topographischen Bilder zeigen drei Strukturen mit unterschiedlichen Höhen (Abb. 4-4 B). Die niedrigste Struktur kann der l_d -Phase zugeordnet werden und entspricht hinsichtlich Form, Verteilung und Anzahl den dunklen Domänen des Cy3-Fluoreszenzbildes. Da in diesen Bereichen keine Proteinfluoreszenz beobachtet wurde, kann daraus geschlossen werden, dass STxB nicht an diese Bereiche bindet.

Die höchste Struktur der SFM-Abbildung kann den hellen Gebieten des Fluoreszenzbildes zugewiesen werden. Daher kann gefolgert werden, dass diese Struktur durch an Gb_3 gebundenes Protein, lokalisiert in der l_o -Phase, entsteht (siehe Zoom). Nur kleine l_o -Bereiche, an denen kein STxB gebunden hat, können beobachtet werden. Dies könnte aus lokaler Verarmung des Rezeptorlipids Gb_3 resultieren. STxB bildet gut definierte Proteincluster auf der l_o -Phase. Der Höhenunterschied zwischen der niedrigsten (l_d -Phase) und der beobachteten mittleren (l_o -Phase ohne Protein) Höhenstruktur beträgt 0,6 nm ($\pm 0,3$ nm, $n = 10$), und ist damit im Rahmen des Fehlers gleich groß wie die ermittelte Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase vor Proteinzugabe. Von Bereichen, in denen nur die l_o -Phase und gebundenes Protein zu sehen sind, wurde der Höhenunterschied zwischen STxB und l_o -Phase zu 2,2 nm ($\pm 0,2$ nm, $n = 26$) bestimmt. Die aus der Kristallstruktur abgeleitete Höhe des STxB beträgt 2 nm (4, 6). Ein Histogramm eines Bildausschnitts, welches die drei verschiedenen Höhen repräsentiert (l_o -, l_d -Phase und Proteinschicht), veranschaulicht zwar die erhaltenen Höhendifferenzen, es ist aber schwieriger sie eindeutig zu separieren (Abb. 4-4 C). Da der bestimmte Höhenunterschied größer ist als die aus der Kristallstruktur ermittelte Höhe des STxB und das Protein auf der l_o -Phase in bestimmten Bereichen lokalisiert ist, lassen sich STxB- Gb_3 -Cluster vermuten, wobei die Lipide in diesen Bereichen anders gepackt sein könnten, was zu einer Erhöhung der Membrandicke unterhalb der STxB-Cluster führen könnte. Allgemein sind Proteinhöhen, die mittels rasterkraftmikroskopischer Abbildung ermittelt wurden, auf Grund der applizierten Kraft des *cantilevers* auf die Probe häufig unterbestimmt (81). Nach Proteinzugabe war die Abbildung der Membranoberfläche weniger empfindlich bezüglich kleiner Änderungen, der durch den *cantilever* auf die Probe wirkende Kräfte, was bedeuten könnte, dass das gebundene Protein die Membran stabilisiert.

Beim Abtasten von kleinen Ausschnitten der Membranoberfläche konnte die laterale Struktur des gebundenen Proteins noch detaillierter visualisiert werden, allerdings werden die Ränder der Proteincluster teilweise nicht mehr scharf abgebildet und der Höhenunterschied zwischen l_o - und l_d -Phase wird sehr klein (Abb. 4-5 **A**). Im rasterkraftmikroskopischen Phasenbild kann sehr deutlich die Struktur der Proteincluster visualisiert werden (Abb. 4-5 **B**). Es zeigt damit einen deutlichen Unterschied in den Materialeigenschaften zwischen gebundenem Protein und der Membran.

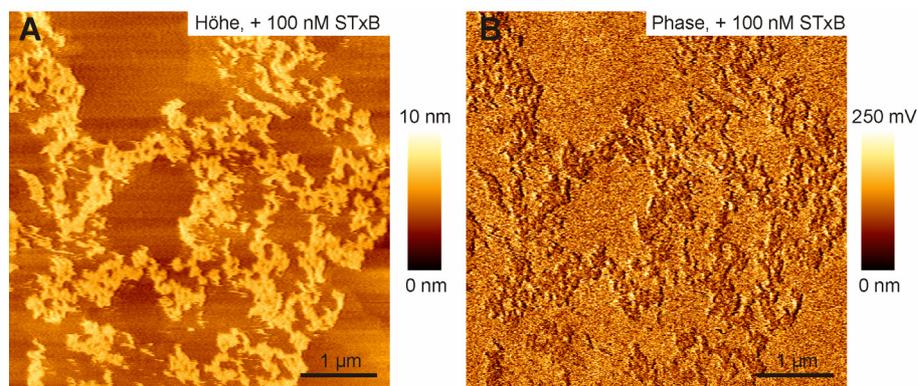


Abb. 4-5: **A** Topographisches Bild einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membran nach Inkubation mit 100 nM STxB, gemessen im *tapping mode* mit **B** zugehörigem Phasenbild. Substrat: *Mica*.

Die Oberflächenbelegung von STxB an Lipiddoppelschichten zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) variierte bei verschiedenen Präparationen. Zum Teil bedeckte das Protein die gesamte flüssig-geordnete Phase (Abb. 4-6 **A**). Bei kleineren Scanausschnitten konnte allerdings auch eine Feinstruktur dieser Bereiche beobachtet werden (Abb. 4-6 **B**), die Höhendifferenzen bis zu 2,5 nm aufweist (Abb. 4-6 **C**) und durch den Höhenunterschied zwischen STxB und der fast bedeckten l_o -Phase bedingt ist. Außerdem wird aus dem in Abbildung 4.6 **C** gezeigten Linienprofil eine Höhendifferenz von STxB zur l_d -Phase von ca. 3 nm ersichtlich.

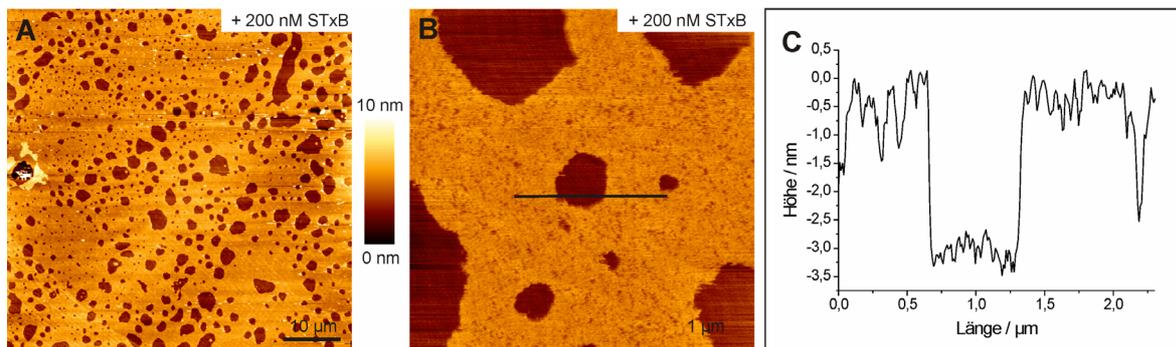


Abb. 4-6: **A** Topographische SFM-Aufnahme (*contact mode*) einer Membran bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) nach Inkubation mit STxB mit nahezu kompletter Belegung des Proteins auf der *l*_o-Phase. **B** Feinstruktur des gebundenen STxB mit **C** zugehörigem Linienprofil. Substrat: *Mica*.

Lipidreorganisation in planaren Membranen durch die Bindung von STxB-wt

Es stellte sich die Frage, ob die Bindung des STxB an Gb₃-haltige Membranen zu einer Reorganisation der Lipide innerhalb der Membranen führt. Dazu wurden DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten mit 0,1 mol% Texas Red DHPE und 0,2 mol% Perylen markiert. In Abbildung 4-7 **A** ist ein repräsentatives Perylen-Fluoreszenzbild der Membran vor Proteinzugabe dargestellt. Große Bereiche erscheinen hell. Dazwischen sind dunkle Domänen sichtbar, aus denen der Fluorophor ausgeschlossen wird, die in ihrer Verteilung, Form und Anzahl der niedrigen Struktur im SFM-Bild vor STxB-Zugabe ähneln (siehe Abb. 4-3 **A**). Diese Struktur wurde der flüssig-ungeordneten Phase zugeordnet. Die kleinen weißen Punkte werden Vesikeln, die auf der Doppelschicht adsorbiert sind, zugeschrieben. Die dunklen Bereiche des Perylen-Fluoreszenzbildes erscheinen in der Texas Red DHPE-Fluoreszenz hell (Abb. 4-7 **B**). Dies kann auch gut im Overlay der Perylen- und Texas Red DHPE-Fluoreszenzaufnahmen beobachtet werden (Abb. 4-7 **C**). Das Overlay-Bild entsteht durch eine Überlagerung der Falschfarben-Fluoreszenzen von Perylen (grün) und Texas Red DHPE (rot). Texas Red DHPE reichert sich besonders in fluiden Bereichen von Membranen an und markiert somit die *l*_d-Phase. Perylen ist dagegen hauptsächlich in der *l*_o-Phase lokalisiert.

Nach Inkubation mit STxB hat sich die Erscheinung der Fluoreszenzbilder deutlich verändert. Besonders auffällig ist, dass Perylen und Texas Red DHPE nun in denselben Regionen der Membran angereichert sind und die zugehörigen Bilder fast deckungsgleich

sind (Abb.4-7 **F**). Im Overlay-Bild erscheinen diese deckungsgleichen Flächen daher gelb. Es sind annähernd runde Domänen, die bis zu 10 μm groß sind, sichtbar, welche der l_d -Phase entsprechen (Abb. 4-7 **D/E**).

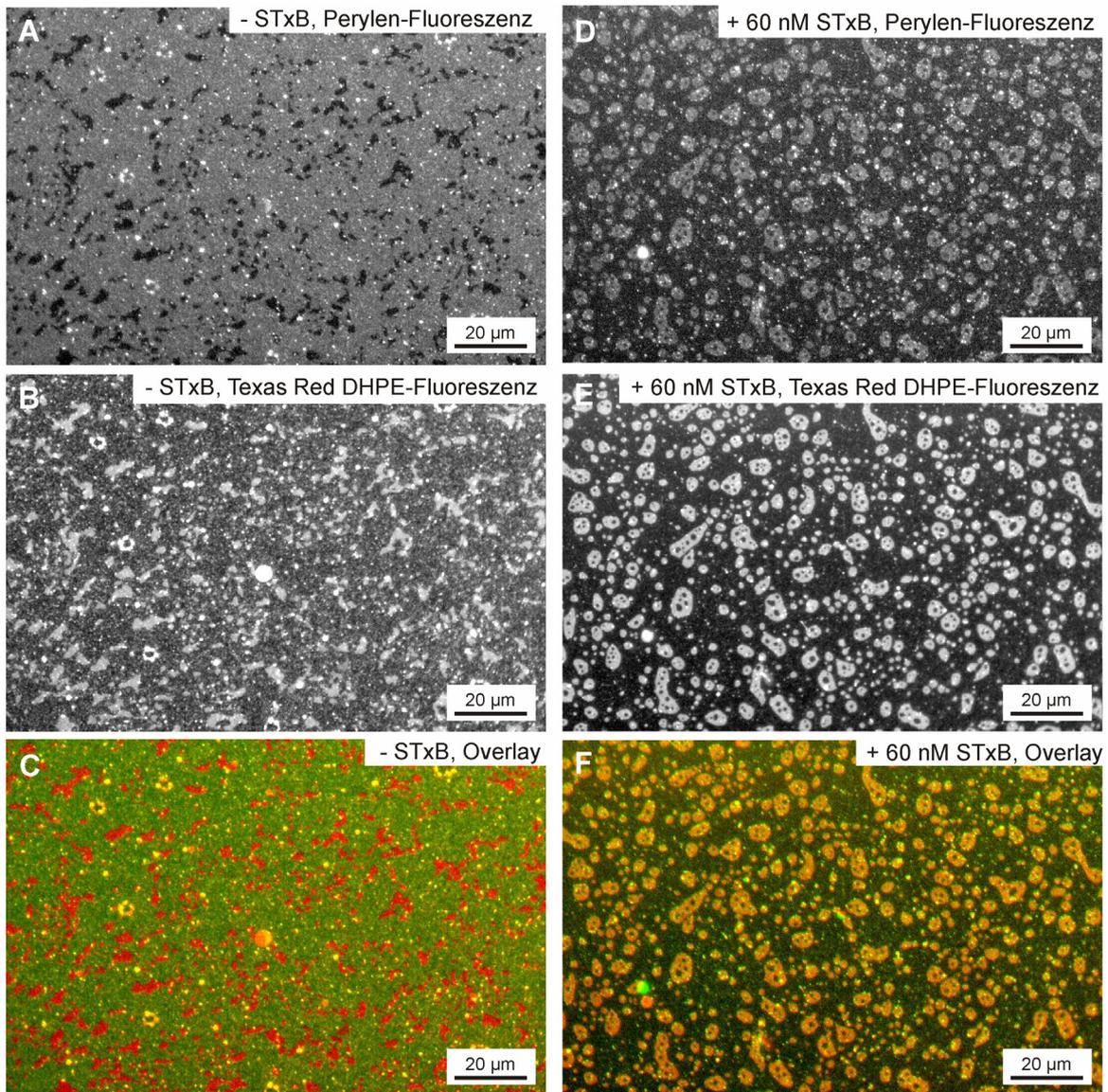


Abb. 4-7: Fluoreszenzaufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten dotiert mit 0,2 mol% Perylen und 0,1 mol% Texas Red DHPE. **A/B/C** Vor Proteinzugabe kann eine Phasenseparation beobachtet werden. **A** Die Perylen-Fluoreszenz visualisiert die l_o -Phase, während **B** die l_d -Phase derselben Stelle durch den Fluorophor Texas Red DHPE detektiert wird. **C** Overlay der Falschfarnebilder von **A** und **B** mit roter Texas Red DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz. **D/E/F** Fluoreszenzbilder nach Inkubation der Membran mit 60 nM STxB. **D** Der Fluorophor Perylen ist, wie **E** Texas Red DHPE, angereichert in der l_d -Phase, was **F** gut im Overlay-Bild zu sehen ist. Substrat: *Mica*.

Die Aussage, dass sich beide Fluorophore nach Proteinzugabe in der l_d -Phase anreichern, wird untermauert durch das Fluoreszenzbild des Cy3-gelabelten Proteins (siehe Abb. 4-4 **A**). Dort bindet das markierte Protein an Gb₃ in der l_o -Phase, was zu dunklen, nicht fluoreszierenden l_d -Domänen führt.

Nach STxB-Zugabe zeigt die Texas Red DHPE-Fluoreszenz einen deutlich höheren Kontrast zur Umgebung als vor Proteinbindung (vgl. Abb. 4-7 **B/E**). Dies weist auf eine verstärkte Phasenseparation zwischen der l_o - und der l_d -Phase hin, da der Texas Red DHPE-Fluorophor stärker in der l_d -Phase angereichert ist. Der Vergleich von Fluoreszenzintensitäten aus verschiedenen Experimenten ist oft nicht direkt durch die Betrachtung der Fluoreszenzbilder erkennbar, da bei den Bildern unterschiedliche Kontraste eingestellt sind. Dies kann nicht vermieden werden, da bei verschiedenen Proben Variationen der Fluoreszenzintensität auftreten und diese auf die zu beobachtende Struktur angepasst werden muss um eine optimale Bildaufnahme zu erzielen. Eine Information über die Bildkontraste kann deshalb nur durch direkte Beobachtung der Fluoreszenzintensität mit dem Okular des Mikroskops gewonnen werden.

Die Lipidorganisation innerhalb der Lipiddoppelschicht vor und nach Proteinzugabe wurde durch eine Pixelanalyse der Fluoreszenzbilder mit der Software ImageJ näher charakterisiert. Die Circularität C und der prozentuelle Flächenanteil der l_d -Membrandomänen wurden bestimmt (Abb. 4-8). Die Circularität C wird aus der Fläche einer Domäne A_D und deren Perimeter P (Umfang) folgendermaßen berechnet:

$$C = 4\pi \cdot \frac{A_D}{P^2} \quad (4-1)$$

Sie besitzt keine Einheit und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Bei einem Kreis ist der Wert für die Circularität $C = 1$.

Der Flächenanteil der l_d -Phase der Lipiddoppelschicht steigt von 18 % vor Proteinbindung auf 27 % nach Proteinbindung (Abb. 4-8 **A/B**). Gleichzeitig steigt die durchschnittliche Circularität der l_d -Domänen von $(0,66 \pm 0,21)$ auf $(0,81 \pm 0,17)$. Die gleiche Circularität von $(0,83 \pm 0,15)$ wurde für die l_d -Domänen nach Proteinbindung aus dem STxB-Cy3-Fluoreszenzbild berechnet. Der Flächenanteil der l_d -Phase liegt hier bei 17 % (Abb. 4-8 **C**). Der Vergleich der Flächenanteile von Domänen ist allerdings nur sinnvoll bei Vergleich von Membranen derselben Präparation, da eine gewisse Variation in der Domänengröße vorliegt. Die l_d -Domänen veränderten durch die Proteinbindung ihre Gestalt, indem sie

größer und runder wurden. Durch die Bindung von STxB an fluoreszenzmarkierte Membranen aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) konnte somit gezeigt werden, dass durch die Bindung des Proteins eine Reorganisation der Lipide innerhalb der Membran stattfindet.

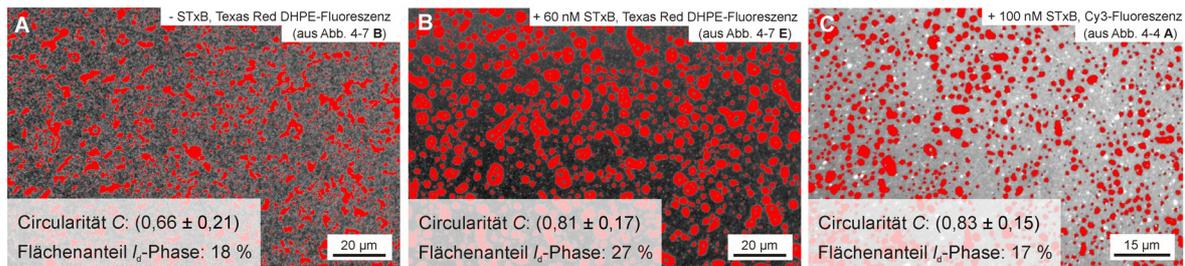


Abb. 4-8: Bestimmung der Circularität und des Flächenanteils der l_d -Domänen in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen durch Pixelanalyse mit der Software ImageJ. Texas Red DHPE-Fluoreszenzbild **A** vor und **B** nach Proteinzugabe derselben Probe. **C** Cy3-Fluoreszenzbild nach der Inkubation mit STxB. Substrat: *Mica*.

In dieser Arbeit wurden zum einen Messungen mit fluoreszenzmarkierten Membranen und zum anderen mit Membranen ohne Fluorophor durchgeführt. Die Verwendung von verschiedenen fluoreszenzgelabelten Lipiden (Perylen, Texas Red DHPE, Bodipy-PC) hatte keinen Einfluss auf die Proteinbindung an Gb₃ sowie auf die Membranstrukturen vor und nach Proteinzugabe. Dies konnte durch Vergleich der Resultate aus unterschiedlichen Versuchsansätzen abgeleitet werden. So zeigten die mittels SFM-Messungen erhaltenen topographischen Abbildungen keine Unterschiede in den Membranstrukturen und Proteinclustern bei fluoreszenzmarkierten und unmarkierten Lipiddoppelschichten.

Ähnliches gilt für die Verwendung von Cy3-gelabeltem STxB und unmarkiertem Protein. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte kein Einfluss des Fluorophors Cy3 auf die laterale Organisation des gebundenen Proteins festgestellt werden. SFM-Messungen mit ungelabeltem und gelabeltem Protein führten zu den gleichen Beobachtungen.

Bindung von STxB-wt an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5-Membranen) auf dem Substrat Silizium

Da der Einfluss des Substrates auf die Ausbildung von Lipiddoppelschichten und auf die Proteinbindung nicht vollständig geklärt ist (94), wurden die Messungen zum Teil auf dem Substrat Silizium durchgeführt. Die STxB-Bindung an Lipiddoppelschichten bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) immobilisiert auf dem Substrat Silizium wurden untersucht. Ohne gebundenes Protein koexistieren in der Membran zwei Phasen. In der topographischen SFM-Aufnahme können tiefer liegende Bereiche visualisiert werden, die der l_d -Phase zugeordnet werden (Abb. 4-9 A). Der Höhenunterschied zwischen der l_d -Phase und der umgebenden, höher liegenden l_o -Phase wurde zu 0,7 nm ($\pm 0,1$ nm, $n = 13$) bestimmt (Abb. 4-9 B), und ist damit ca. 0,2 nm höher als bei SFM-Messungen auf Glimmer.

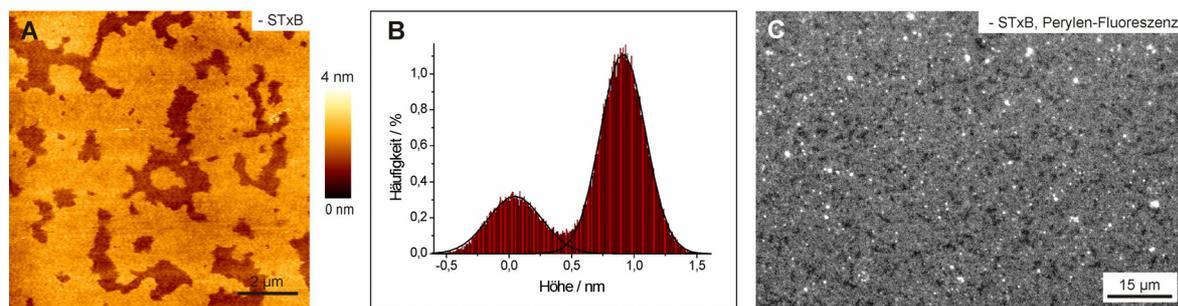


Abb. 4-9: Charakterisierung einer Lipiddoppelschicht zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen auf dem Substrat Silizium. **A** In der topographischen SFM-Aufnahme (*contact mode*) kann eine Phasenseparation in die l_o - und l_d -Phase beobachtet werden, wobei **B** die l_d -Membrandomänen 0,7 nm ($\pm 0,1$ nm, $n = 13$) tiefer liegen als die l_o -Phase. Gezeigt ist ein typisches Histogramm einer Bildstelle. **C** Die Perylen-fluoreszierenden Bereiche markieren die l_o -Phase.

In der Fluoreszenzaufnahme der mit 0,5 mol% Perylen markierten Membran ist ebenfalls eine Phasenseparation zu beobachten (Abb. 4-9 C). Dunkle Bereiche, in denen das Perylen verarmt ist und die meist kleiner als 5 μ m in ihrer Ausdehnung sind, werden beobachtet. Die weißen Punkte sind vermutlich adsorbierte Vesikel. Durch Vergleich mit dem rasterkraftmikroskopischen Bild können die hell fluoreszierenden Bereiche der l_o -Phase und die dunklen Bereiche l_d -Domänen zugeordnet werden. Vergleicht man die auf Silizium ausgebildeten Membranen dieser Lipidzusammensetzung mit denen auf *Mica*, so konnte

festgestellt werden, dass sich die Membranen auf Silizium mit nur wenigen Membrandefekten viel homogener auf der Oberfläche ausbilden.

Nach Inkubation der auf Silizium immobilisierten Membran aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen mit 60 nM Cy3-gelabeltem STxB wurde die Belegung mit gebundenem Protein fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Cy3-Fluoreszenzaufnahme zeigt eine inhomogene Fluoreszenz des Proteins auf der Lipiddoppelschicht (Abb. 4-10 A). Dunkle Bereiche sind sichtbar, die im Perylen-Fluoreszenzbild hell erscheinen, und in denen somit Perylen angereichert ist (Abb. 4-10 B). In diesen Bereichen ist kein Protein gebunden. Dies lässt sich auch im Overlay-Bild der Falschfarbenbilder der grünen Perylen- und roten Cy3-Fluoreszenz erkennen (Abb. 4-10 C).

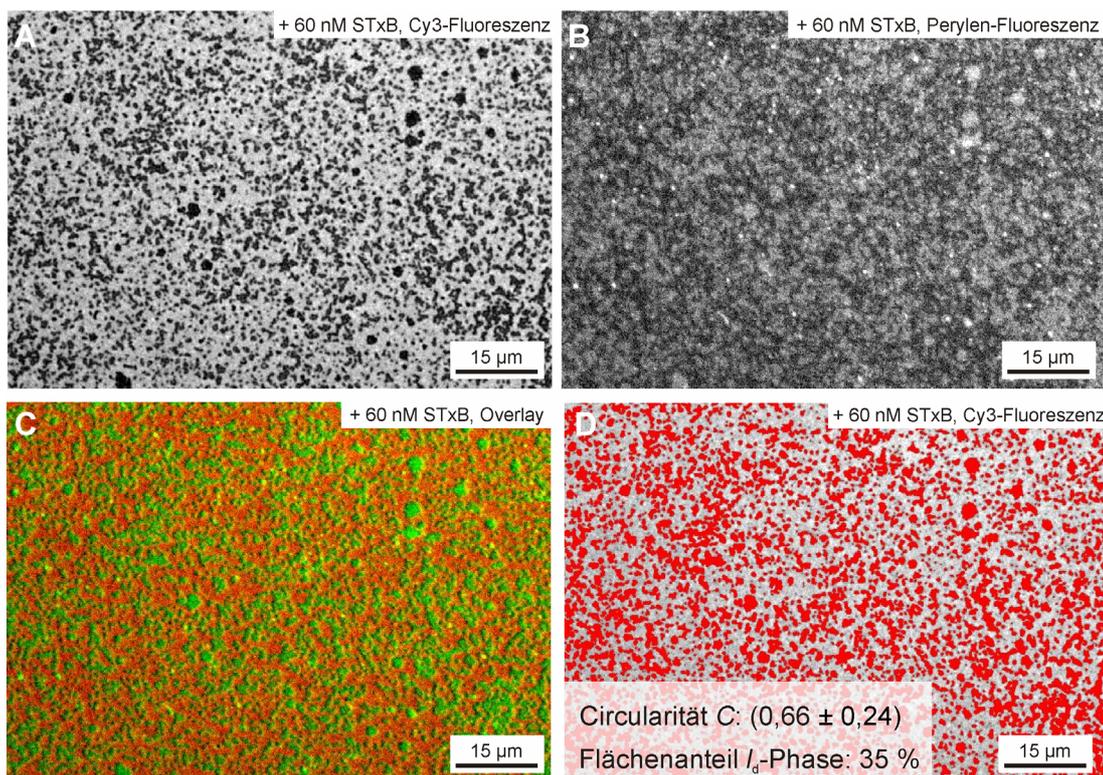


Abb. 4-10: Charakterisierung einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht dotiert mit 0,5 mol% Perylen auf dem Substrat Silizium nach Proteinzugabe. **A** Fluoreszenzbild des markierten Proteins, sowie **B** Perylen-Fluoreszenzaufnahme derselben Stelle. **C** Overlay der Falschfarbenbilder mit roter Cy3- und grüner Perylen-Fluoreszenz. **D** Mittels Pixelanalyse wurde die Circularität und der Flächenanteil der *l_d*-Domänen bestimmt.

In rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen können tiefer liegende Bereiche abgebildet werden (Abb. 4-11 A), die einen Höhenunterschied von 2,6 nm ($\pm 0,3$ nm, $n = 12$) zur Umgebung aufweisen (Abb. 4-11 B). Diese niedrigen Strukturen sind der l_d -Phase zuzuordnen, an der kein Protein gebunden hat und in der sich Perylen nach Proteinzugabe bevorzugt einlagert. STxB bindet an Gb₃ in der l_o -Phase und belegt nahezu komplett diese Lipidphase. Die dunklen Bereiche der Cy3-Fluoreszenz und die hellen Bereiche der Perylen-Fluoreszenz visualisieren folglich die l_d -Phase.

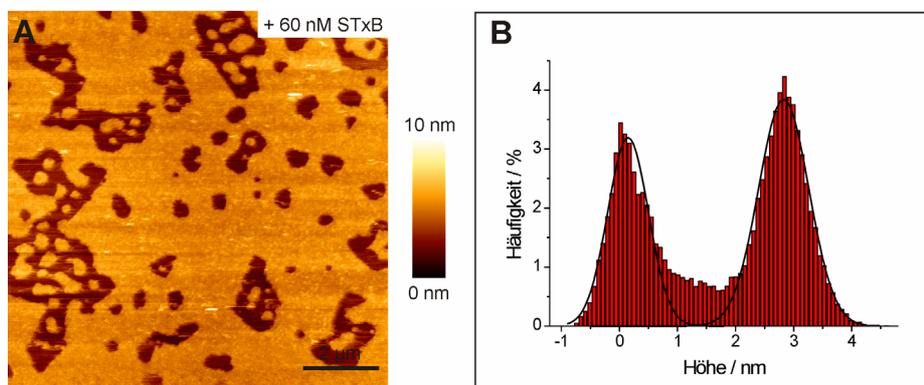


Abb. 4-11: **A** Topographische SFM-Aufnahme (*contact mode*) einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht dotiert mit 0,5 mol% Perylen nach Inkubation mit 60 nM STxB auf dem Substrat Silizium. **B** Die l_o -Phase mit gebundenem Protein liegt 2,6 nm ($\pm 0,3$ nm, $n = 12$) höher als die l_d -Membrandomänen.

Der Höhenunterschied zwischen Bereichen mit und ohne gebundenem Protein von 2,6 nm ($\pm 0,3$ nm, $n = 12$) resultiert aus der Differenz von l_d -Phase und der Höhe des STxB auf der höherliegenden l_o -Phase. Im SFM-Bild werden innerhalb der l_d -Membrandomänen kleine l_o -Domänen mit gebundenem STxB beobachtet, die sich erst nach Proteinzugabe gebildet haben (vgl. Abb. 4-9 A vor Proteinzugabe). Eine unspezifische Einlagerung von STxB in Membrandefekten (siehe Abschnitt ‚Kontrollexperiment‘) konnte auf Silizium nicht beobachtet werden, was ein Vorteil gegenüber Glimmer war.

An Hand des Cy3-Fluoreszenzbildes wurde mittels Pixelanalyse die Circularität der l_d -Domänen und der Flächenanteil der l_d -Phase bestimmt. Die l_d -Domänen nehmen 35 % der Fläche ein und besitzen eine Circularität von ($0,66 \pm 0,24$) (Abb. 4-10 D). Die Flächenbelegung der l_d -Phase und die Circularität der Domänen vor Proteinzugabe konnte nicht bestimmt werden, da der Kontrast des Perylen-Fluoreszenzbildes (Abb. 4-9 C) zu

schwach ist. Die Circularität der l_d -Domänen nach STxB-Zugabe ist bei Membranen auf Silizium etwas niedriger als bei Membranen auf *Mica* (vgl. Abb. 4-8 **B/C**).

Bindung von STxB-W34A an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen

Neben den Bindungseigenschaften des Wildtyp STxB (STxB-wt) wurde die Bindung der Mutante STxB-W34A an Gb₃ untersucht werden. Durch den Austausch der Aminosäure Tryptophan an Position 34 durch Alanin besitzt das STxB-Monomer nur noch zwei statt drei Gb₃-Bindungsstellen. Die Bindung der Mutante STxB-W34A an phasenseparierten Lipiddoppelschichten bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) wurde auf dem Substrat Glimmer untersucht. Nach Inkubation der Membran mit 60 nM STxB-W34A können in rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen ca. 0,6 nm tiefe Strukturen beobachtet werden (Abb. 4-12). Dies entspricht der Höhendifferenz zwischen der l_d - und der l_o -Phase. Eine Struktur, welche auf gebundenes Protein hinweist, konnte nicht abgebildet werden. Die beiden höheren Strukturen im SFM-Bild sind vermutlich auf unspezifische Proteinaggregate zurückzuführen. Fluoreszenzaufnahmen, die die Belegung des Cy3-markierten Proteins visualisieren sollten, gestalteten sich schwierig, da die Intensität des gebundenen STxB-W34A sehr schwach war und durch die Existenz von stark fluoreszierenden Bereichen mit unspezifisch eingelagertem Protein in Membrandefekten, überstrahlt wurde.

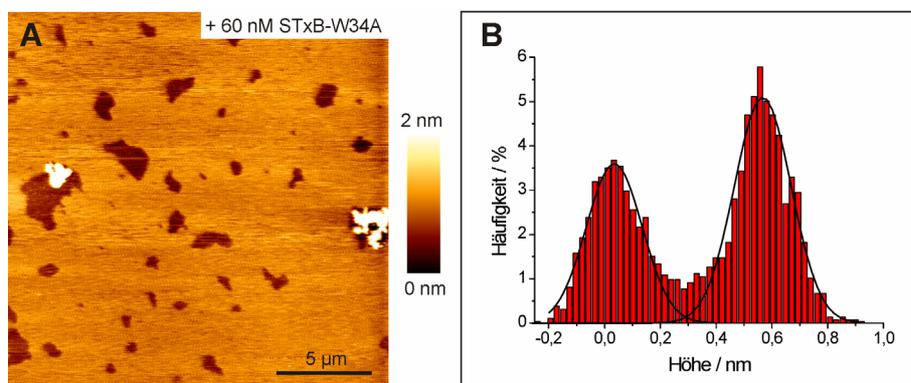


Abb. 4-12: Bindung der Mutante STxB-W34A an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten. **A** SFM-Aufnahmen (*contact mode*) nach Inkubation mit 60 nM Protein zeigen **B** ca. 0,6 nm tiefe l_d -Membrandomänen. Gebundenes Protein konnte nicht abgebildet werden. Substrat: *Mica*.

4.2 STxB-Bindung an DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Lipiddoppelschichten

Da derzeit die Existenz von Membranmikrodomänen, die mit Sphingomyelin und Cholesterin angereichert sind, in biologischen Membranen nicht geklärt ist, wurde die Bindung von STxB an einem Membransystem untersucht, welches nicht aus Lipiden einer typischen *raft*-Mischung zusammengesetzt ist. Deshalb wurden Membranen bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ verwendet. Cholesterin gilt als wichtiger Bestandteil von biologischen Membranen und reguliert unter anderem die Membranfluidität.

Kontrollexperiment

Zunächst wurde ein Kontrollexperiment mit einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Cholesterin (70:30) durchgeführt, um unspezifische Wechselwirkungen mit der Membran auszuschließen. Eine auf Glimmer präparierte Lipiddoppelschicht mit 0,5 mol% Perylen wurde mit 60 nM Cy3-gelabeltem STxB für 1 h inkubiert. Es ist eine homogen fluoreszierende Membranoberfläche zu beobachten (Abb. 4-13 A). Schwarze Bereiche werden Membrandefekten zugeordnet, in denen sich, STxB unspezifisch einlagert (Abb. 4-13 B). Die hellen Punkte des Perylen-Fluoreszenzbildes (Abb. 4-13 A) sind vermutlich auf der Membranoberfläche adsorbierte Vesikel, die durch Spülen mit PBS-Puffer nicht entfernt werden konnten.



Abb. 4-13: Kontrollexperiment einer DOPC/Cholesterin (70:30)-Membran dotiert mit 0,5 mol% Perylen, die mit 60 nM Cy3-gelabeltem STxB inkubiert wurde. Gezeigt sind **A** die Perylen-Fluoreszenz der Membran, **B** die Cy3-Fluoreszenz von STxB und **C** die topographische Struktur (*contact mode*) der Membran nach Proteinzugabe. Substrat: *Mica*.

In intakten Membranbereichen mit homogener Perylen-Fluoreszenz wurde keine Cy3-Fluoreszenz des Proteins beobachtet. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zeigen eine nahezu unstrukturierte Oberfläche (Abb. 4-13 C). Unspezifische Bindung von STxB an intakte DOPC/Cholesterin-Membranbereiche kann damit ausgeschlossen werden.

Bindung von STxB-wt an DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen

Nach Immobilisierung einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) auf *Mica*, wurde die Membran zunächst vor Proteinzugabe charakterisiert. Durch Dotierung der Membran mit 0,5 mol% Perylen und 0,1 mol% Texas Red DHPE konnte die Ausbildung der Membran sowie die laterale Organisation der Lipide untersucht werden. In Abbildung 4-14 A/B sind Aufnahmen der Perylen- und Texas Red DHPE-Fluoreszenz derselben Stelle einer typischen Membran dargestellt. Die beiden Bilder sind nahezu identisch. Durch die Existenz vieler kleiner heller Punkte erscheint die Fluoreszenz nicht homogen. Es könnte sich dabei um adsorbierte Vesikel oder um eine inhomogene Verteilung beider Fluorophore handeln. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen der Membranoberfläche zeigen zunächst keine topographischen Strukturen (Abb. 4-14 C), d. h. eine Phasenseparation in der Membran konnte nicht beobachtet werden. Beim Abtasten eines größeren Membranausschnittes werden höhere Strukturen von ca. 4-5 nm sichtbar (Abb. 4-14 D). Diese können nicht scharf abgebildet werden, was dafür spricht, dass Material schwach adsorbiert ist. Es handelt sich dabei vermutlich um Membranpatches oder auch adsorbierte Vesikel. Das Auftreten dieser unerwünschten Strukturen ließ sich bei den meisten präparierten Membranen auf Glimmer nicht vermeiden.

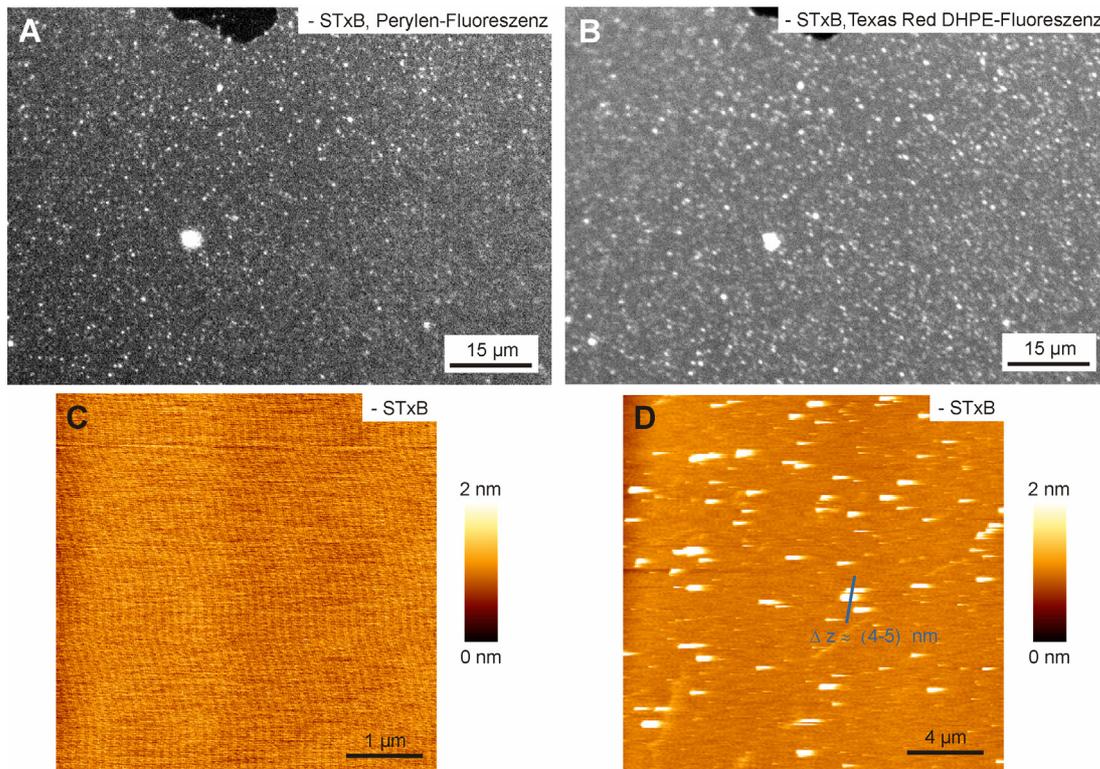


Abb. 4-14: Charakterisierung einer DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membran vor Proteinzugabe. Die **A** Perylen- und **B** Texas Red DHPE-Fluoreszenzaufnahmen zeigen kleine helle Punkte, die wahrscheinlich durch adsorbiertes Material entstehen. Topographische SFM-Aufnahmen (*contact mode*) zeigen **C** eine homogene topographische Struktur mit **D** schwach adsorbiertem Material. Substrat: *Mica*.

Membranen zusammengesetzt aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) wurden mit 100 nM Cy3-markiertem STxB inkubiert. Nicht und reversibel gebundenes Protein wurde nach 1 h durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine relativ homogene Fluoreszenz des Proteins beobachtet werden (Abb. 4-15 A), was aus einer hohen Belegung von membrangebundenem STxB resultiert. Selten wurden dunkle Bereiche detektiert, die Membrandefekten zugeordnet werden, was rasterkraftmikroskopische Bilder belegen (Daten hier nicht gezeigt). Membrandefekte ohne und auch mit unspezifisch eingelagertem STxB wurden beobachtet, wobei Defekte mit eingelagertem Protein tendenziell häufiger auftraten. Die weißen Punkte, die im Fluoreszenzbild zu sehen sind, können größeren Proteinaggregaten, angelagert an die Oberfläche, zugewiesen werden. Durch die Rasterkraftmikroskopie wird die laterale Organisation des STxB mit einer höheren lateralen Auflösung zugänglich. Es sind Cluster des Proteins im Größenbereich einiger Mikrometer sichtbar (Abb. 4-15 B/C), die homogen

auf der Membran verteilt sind. In Abbildung 4-15 C bedecken die STxB-Cluster ca. 52 % der Oberfläche. Der Höhenunterschied zwischen den STxB-Clustern und der proteinfreien Membranoberfläche wurde mittels detaillierter Pixelanalyse zu 2,2 nm ($\pm 0,4$ nm, $n = 35$) bestimmt (Abb. 4-15 D, repräsentatives Histogramm einer Bildstelle). Allgemein war das Abbilden von gebundenem Protein mit dem Rasterkraftmikroskop schwierig, da die Proben sehr empfindlich gegenüber kleinen Änderungen der wirkenden Kräfte sind. Der Fehler in der Höhenmessung entsteht überwiegend durch die herrschenden vertikalen Kräfte, da weiche Bereiche der Proben, auch Stellen mit gebundenem Protein, eingedrückt werden können.

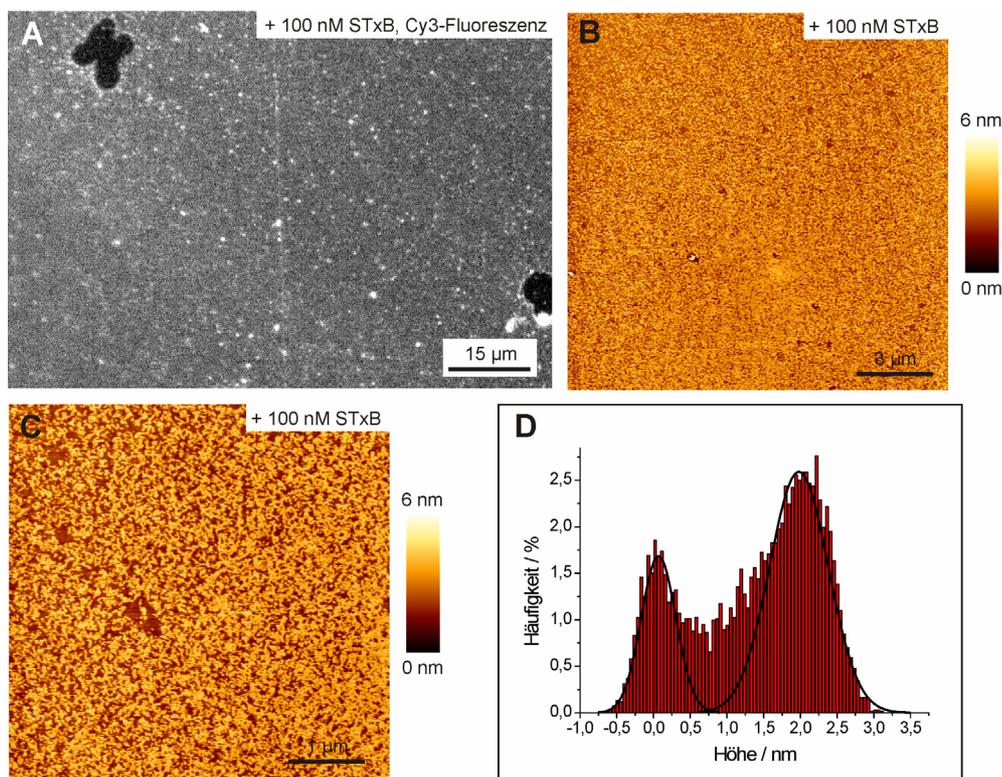


Abb. 4-15: Bindung von STxB an planare Lipiddoppelschichten bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) in PBS-Puffer. **A** Das Fluoreszenzbild des Cy3-markierten Proteins zeigt eine homogene Verteilung auf der Oberfläche. **B/C** In SFM-Aufnahmen (*contact mode*) werden homogen verteilte STxB-Cluster beobachtet. **D** Der Höhenunterschied zwischen proteinfreier Membran und STxB-Clustern wurde mittels Pixelanalyse zu 2,2 nm ($\pm 0,4$ nm, $n = 35$) bestimmt. Gezeigt ist ein typisches Histogramm einer Bildstelle. Substrat: *Mica*.

Außerdem wird das Protein zum Teil in lateraler Scanrichtung verschoben, da im *contact mode* verstärkt laterale Kräfte zum Tragen kommen (Abb. 4-16 A). Die Proteinstruktur erscheint dadurch nicht scharf abgebildet. Durch dieses teilweise unkorrekte Abbilden der STxB-Struktur ergeben sich mehr oder weniger große Unterschiede in der Oberflächenbelegung des Proteins. Manche Proben weisen innerhalb eines SFM-Bildes Bereiche mit unterschiedlichen Mengen an gebundenem Protein auf (Abb. 4-16 B), die nicht auf eine fehlerhafte Abbildung zurückzuführen sind. Bei dem Ausschnitt einer Stelle mit wenig STxB-Clustern bedeckt das Protein nur ca. 6 % der Oberfläche (Abb. 4-16 C) im Vergleich zu 52 % Proteinbelegung in Abbildung 4-15 C. Die Oberflächenbelegung des STxB an DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen erstreckt sich demnach über einen großen Bereich.

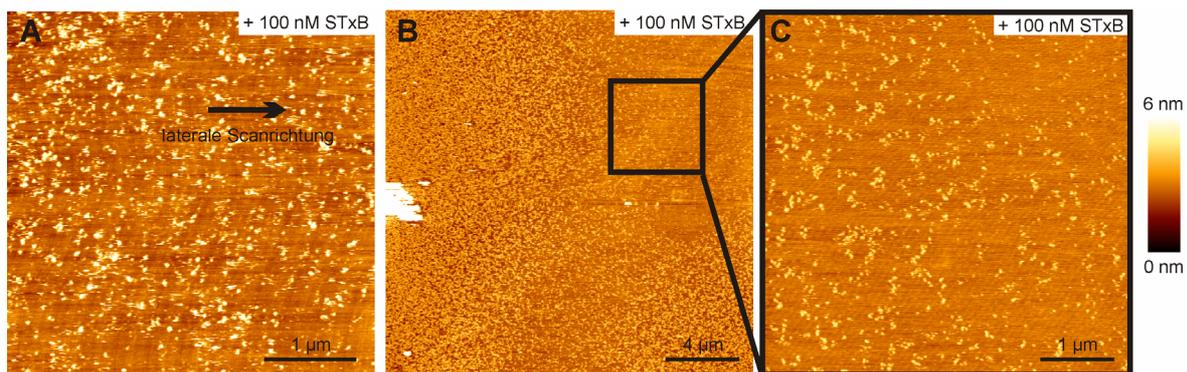


Abb. 4-16: Variationen in der Oberflächenbelegung von STxB an Membranen aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5). **A** SFM-Messungen (*contact mode*) können zu einer unkorrekten Darstellung der Struktur in lateraler und vertikaler Richtung führen. **B** Bestimmte Bereiche zeigen unterschiedliche Oberflächenbelegungen des Proteins. **C** Die STxB-Cluster belegen bei dem hier vergrößerten Ausschnitt nur ca. 6 % der Oberfläche. Substrat: *Mica*.

Die STxB-Bindung wurde zusätzlich an einer auf Silizium immobilisierten Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) untersucht. Vor Proteinzugabe konnte durch rasterkraftmikroskopische Messungen eine homogen ausgebildete Membran ohne Strukturunterschiede abgebildet werden (Abb. 4-17 A). Dies wird auch durch 4-5 nm tiefe Membrandefekte belegt. Die Oberflächenrauigkeit, bedingt durch das Siliziumsubstrat, liegt mit ca. 0,4-0,6 nm deutlich höher als bei Membranen auf *Mica* (<0,1 nm). Nach einstündiger Inkubation mit 60 nM STxB, kann eine nahezu komplette Belegung der Oberfläche mit fluoreszierendem Protein beobachtet werden

(Abb. 4-17 **B**). Die SFM-Messung der Membran mit gebundenem STxB gestaltete sich schwieriger als bei Membranen immobilisiert auf *Mica*, da die Proteincluster teilweise leichter durch die *cantilever*-Spitze deformiert wurden (Abb. 4-17 **C**). Der Höhenunterschied der STxB-Cluster zur Membran beträgt in der gezeigten Abbildung ca. 1,2 nm (Abb. 4-17 **D**), welcher deutlich geringer ist als der Höhenunterschied auf *Mica*, der zu 2,2 nm bestimmt wurde. Da die Oberflächenbelegung des Proteins hier sehr hoch ist, ist es naheliegend, dass die Proteinhöhe durch die SFM-Messung unterbestimmt wird. Stellt man sich die Proteincluster als dichte Kugelpackung vor, so kann eine fehlerhafte Abbildung entstehen, da die *cantilever*-Spitze die Membranoberfläche nicht erreichen kann (Abb. 4-17 **D**, Skizze).

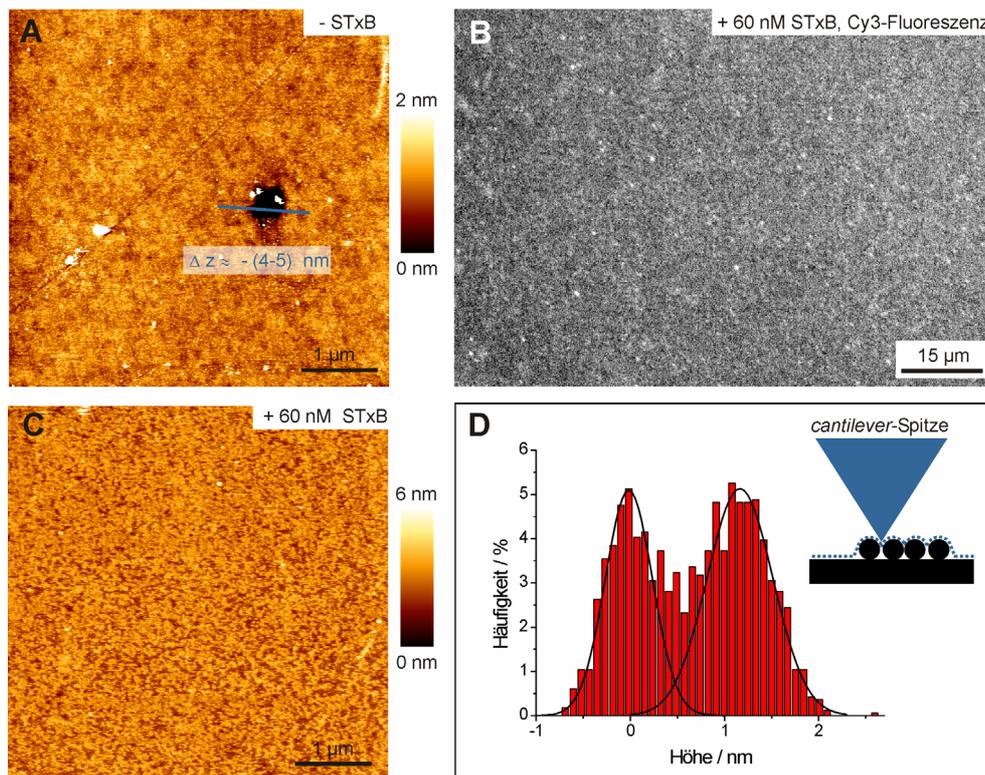


Abb. 4-17: Charakterisierung der STxB-Bindung an DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Lipiddoppelschichten auf dem Substrat Silizium. **A** SFM-Aufnahme (*contact mode*) vor Proteinzugabe. **B** Fluoreszenzaufnahme des markierten Proteins nach Inkubation mit 60 nM STxB-Cy3. **C** SFM-Aufnahme (*contact mode*) des gebundenen STxB mit **D** einem Höhenunterschied zur Membran von ca. 1,2 nm. Die Skizze veranschaulicht die Höhenunterbestimmung der Proteincluster bei Annahme einer dichten Kugelpackung des Proteins.

Bei DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen immobilisiert auf Silizium wurden deutlich weniger Vesikel beobachtet als bei entsprechenden Membranen auf *Mica*. Es konnte die laterale Organisation der Lipide vor und nach STxB-Zugabe mittels Fluoreszenzmikroskopie durch Dotierung der Membran mit 0,2 mol% Bodipy-PC charakterisiert werden. Die Bodipy-PC-Fluoreszenzaufnahme einer DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membran zeigt ein homogenes Leuchten der Oberfläche (Abb. 4-18 A). Nach der Inkubation der Membran mit 60 nM STxB ist die Fluoreszenzaufnahme des Bodipy-PC unverändert (Abb. 4-18 B). Es konnte kein Unterschied in der lateralen Organisation der Lipide vor und nach Proteinzugabe beobachtet werden. Die Lipide sind wahrscheinlich homogen in der Membran verteilt. Die Bindung von STxB an die Membran führte nicht zu einer Reorganisation der Lipide.

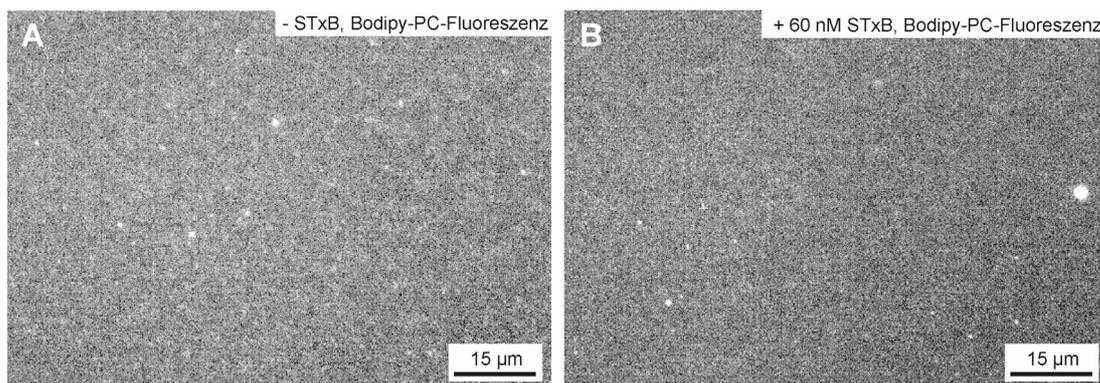


Abb. 4-18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) dotiert mit 0,2 mol% Bodipy-PC **A** vor Proteinzugabe und **B** nach Inkubation mit 60 nM STxB. Substrat: Silizium.

Bindung von STxB-W34A an DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen

DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen wurden mit der Mutante STxB-W34A inkubiert, um mögliche Unterschiede in der lateralen Organisation des Proteins im Vergleich zum Wildtypen zu untersuchen. Nach Inkubation mit 60 nM Cy3-markiertem STxB-W34A wurde die Belegung des Proteins auf der Membran fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Im Vergleich zu STxB-wt ist eine schwächere Proteinfloreszenz auf der gesamten Oberfläche zu beobachten (Abb. 4-19 A). Die hellen, runden Strukturen sind einer unspezifischen Bindung des Proteins in Membrandefekten zuzuordnen (siehe auch Kapitel 4.3, *Kontrollexperimente*). Rasterkraftmikroskopische

Untersuchen zeigen homogen verteilte Cluster von STxB-W34A (Abb. 4-19 B/C), deren Höhenunterschied zur Membranoberfläche 1,6 nm ($\pm 0,3$ nm, $n = 12$) beträgt (Abb. 4-19 D). Dieser Höhenunterschied liegt 0,6 nm unterhalb des bestimmten Wertes für die Clusterhöhe des STxB-wt. Die laterale Form der Proteincluster ähnelt dagegen den Clustern des STxB-wt. Die Bindungsstelle III, welche an der Aminosäure Tryptophan an Position 34 des STxB lokalisiert ist, nimmt somit Einfluss auf die Höhe der STxB-Cluster.

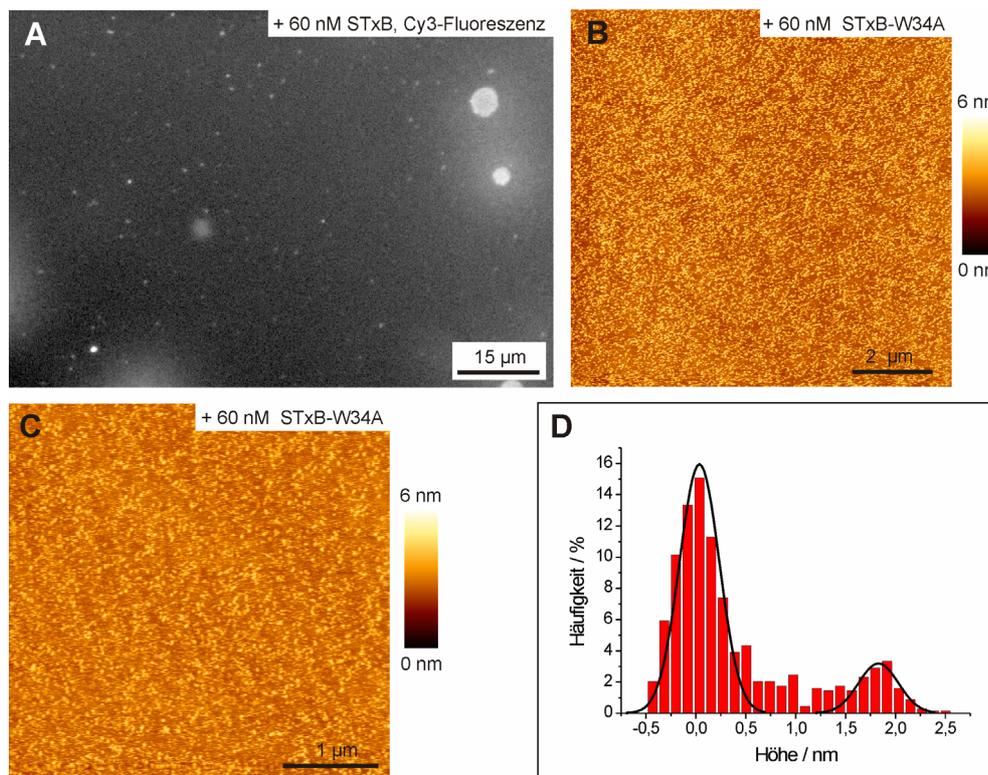


Abb. 4-19: Bindung der Mutante STxB-W34A an planare DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Lipiddoppelschichten. **A** Fluoreszenzbild des Cy3-markierten STxB-W34A. **B/C** SFM Aufnahmen (*contact mode*) zeigen homogen verteilte Proteincluster. **D** Der Höhenunterschied zwischen Membran und STxB-Clustern wurde mittels Pixelanalyse zu 1,6 nm ($\pm 0,3$ nm, $n = 12$) bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm einer Bildstelle. Substrat: *Mica*.

Bindung des Antikörpers anti-Gb₃ an DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen

Durch die spezifische Bindung eines weiteren Proteins an Gb₃ soll die strukturelle Spezifität der beobachteten STxB-Gb₃-Cluster untersucht werden. Dazu wurden Lipiddoppelschichten aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) mit dem Antikörper anti-Gb₃,

welcher spezifisch an Gb₃ bindet, 2 h bei einer Proteinkonzentration von 40 µg/ml inkubiert. Nach dem Spülen mit PBS-Puffer wurde die Membranoberfläche rasterkraftmikroskopisch charakterisiert. Im topographischen Bild lassen sich zusammenhängende Strukturen, die einen hohen Anteil der Oberfläche ausmachen und in ihrer horizontalen Ausdehnung weit über 10 µm groß sind, erkennen (Abb. 4-20 A). Bezüglich der Höhendifferenz zu proteinfreien Membranbereichen, zeigen diese anti-Gb₃-Aggregate zwei typische Stufen. In der Mitte der Proteinaggregate wurde eine Höhe von bis zu 40 nm ermittelt (Abb. 4-20 B). Am Rand der Struktur ergibt sich eine Höhendifferenz zur Membran von ca. 4-5 nm (Abb. 4-20 C). Die anti-Gb₃-Antikörpercluster, gebunden an Gb₃-haltige Membranen, unterscheiden sich in Form und Höhe deutlich von den beobachteten STxB-Clustern. Die anti-Gb₃-Aggregate sind einer spezifischen Bindung an Gb₃ zuzuordnen, da eine zweistündige Inkubation einer DOPC/Cholesterin (70:30)-Membran mit 40 µg/ml anti-Gb₃ diese Strukturen nicht aufweist (Daten hier nicht gezeigt).

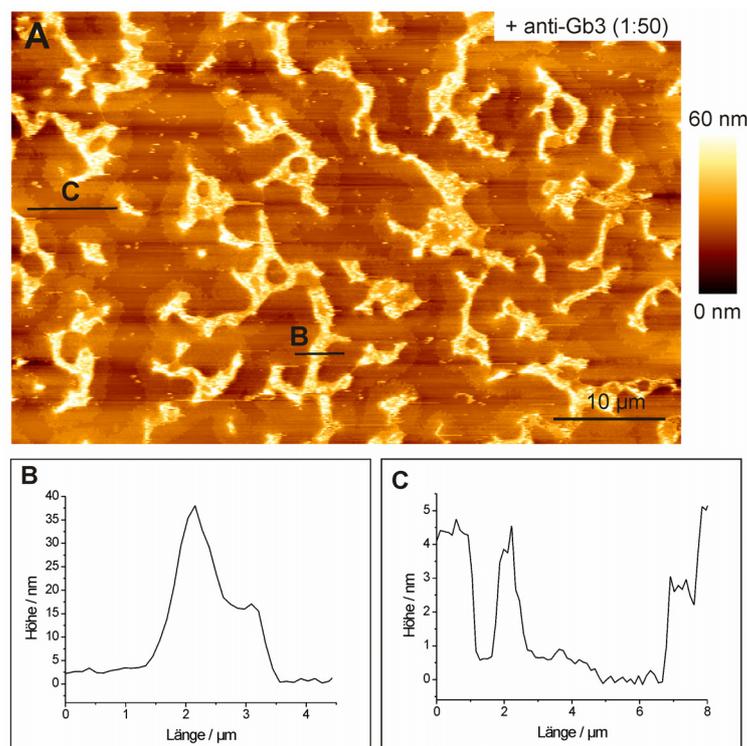


Abb. 4-20: A Topographische SFM-Aufnahme (*contact mode*) des gebundenen Antikörpers anti-Gb₃ an eine Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5). Die Höhenunterschiede der anti-Gb₃-Aggregate zur Membran betragen B bis zu 40 nm, C in den Randbereichen der Struktur zwischen 4-5 nm. Substrat: *Mica*.

4.3 STxB-Bindung an DOPC/Gb₃ (95:5)-Lipiddoppelschichten

Die STxB-Bindung an Gb₃ wurde an einem stark vereinfachten Lipidsystem charakterisiert. Dazu wurden 5 mol% Gb₃ in eine planare Lipiddoppelschicht, bestehend aus DOPC, eingebaut. Das Phospholipid DOPC besitzt eine Hauptphasenumwandlungstemperatur von -20°C und liegt deshalb in wässriger Umgebung bei Raumtemperatur in der fluiden bzw. flüssig-kristallinen Phase L_α vor. Die laterale Diffusion der Lipide innerhalb der Membran ist hoch im Vergleich zu Membranen, die sich im kristallinen Zustand bzw. in der Gelphase befinden. Da in der Lipidmischung kein Cholesterin enthalten ist, wird die Rotationsfreiheit der fluiden Lipide nicht eingeschränkt. Die planaren Lipiddoppelschichten wurden mittels Vesikelspreittechnik auf den Substraten Glimmer und Silizium hergestellt. Die unspezifische Bindung des STxB an Membranen, die kein Gb₃ enthalten, sowie an die reinen Substrate wird in diesem Kapitel ausführlich erläutert. Die Resultate der Kontrollexperimente lassen sich zum Teil auch auf die anderen Lipidmischungen übertragen.

Kontrollexperimente und technische Schwierigkeiten bei SFM-Messungen

Zuerst wurde eine reine DOPC-Membran rasterkraftmikroskopisch untersucht. In Abbildung 4-21 ist die topographische Struktur einer reinen DOPC-Membran immobilisiert auf Glimmer dargestellt. Das rasterkraftmikroskopische Bild zeigt auffällig viele tiefer liegende, runde Bereiche, die im gezeigten Höhenprofil eine Tiefe von ca. 2-3 nm aufweisen. Intakte Membranbereiche in der Defektumgebung zeigen eine planare Oberfläche, was für eine homogen ausgebildete DOPC-Membran ohne Strukturunterschiede spricht. Die Höhe einer Lipiddoppelschicht beträgt je nach Lipidbestandteilen typischerweise 5-6 nm (95). Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Membrandefekte Lipidsubstanz enthalten. Abbildung 4-22 stützt diese Vermutung. Sie zeigt einen kleinen Ausschnitt einer DOPC-Lipiddoppelschicht mit einem Membrandefekt. Anhand dieser Abbildung sollen auch kurz die technischen Herausforderungen und Schwierigkeiten der rasterkraftmikroskopischen Messungen, der in dieser Arbeit untersuchten artifiziellen Lipiddoppelschichten, erläutert werden. Die folgenden

Erkenntnisse waren essenziell für viele in dieser Arbeit durchgeführten AFM-Messungen, um zwischen spezifischer und unspezifischer STxB-Bindung zu unterscheiden.

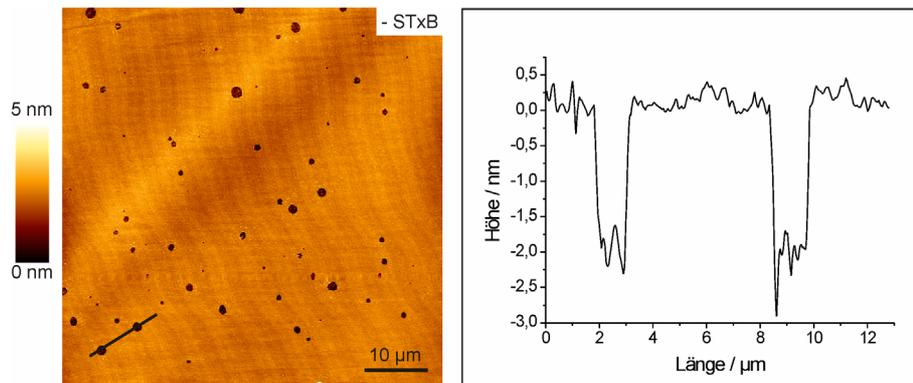


Abb. 4-21: Rasterkraftmikroskopisches Höhenbild einer reinen DOPC-Lipiddoppelschicht (links) gemessen im *contact mode* mit zugehörigem Höhenprofil (rechts). Substrat: *Mica*.

In Abbildung 4-22 **A** ist ein topographisches SFM-Bild gezeigt, welches mit einem polynomialen Linienfit dritter Ordnung korrigiert wurde. Bei einem Linienfit wird für jede Scanlinie eine Gleichung berechnet, die von der entsprechenden Scanlinie subtrahiert wird. Die beiden runden Strukturen werden in manchen Bildregionen als Höhen dargestellt und in manchen als Tiefen. Dieses generelle Abbildungsproblem dieser Strukturen tritt auch bei anderen in dieser Arbeit untersuchten Lipidmischungen auf. Vor allem bei auf *Mica* immobilisierten Membranen wurden diese häufig beobachtet. In der näheren Umgebung dieser Bereiche sind höhere Strukturen zu erkennen, welche ungeordnetes Lipidmaterial auf der Lipiddoppelschicht sein könnten. Um die tatsächliche Struktur ohne Veränderung durch den Abtastvorgang zuordnen zu können, ist es sinnvoll, das in Abbildung 4-22 **B** gezeigte Höhenbild ohne Korrektur zu betrachten. Es zeigt die tatsächliche Bewegung des *cantilevers* beim Abrastern der Oberfläche. Es ist zu erkennen, dass ab einer bestimmten Linie, in denen die Struktur als Tiefe dargestellt wird, die absolute Position des *cantilevers* abrupt höher liegt. Dies bedeutet, dass in diesen Regionen geringere vertikale Kräfte zwischen Probe und Spitze herrschen. Die Federkonstante des verwendeten *cantilevers* betrug ca. 0,03 N/m und die plötzlich variierende vertikale Verbiegung lag weit unter 0,1 V. Da die Sensitivität des *cantilevers* nicht bestimmt wurde, können die auftretenden Kräfte zwischen Spitze und Probe nicht in der Einheit Newton quantifiziert werden.

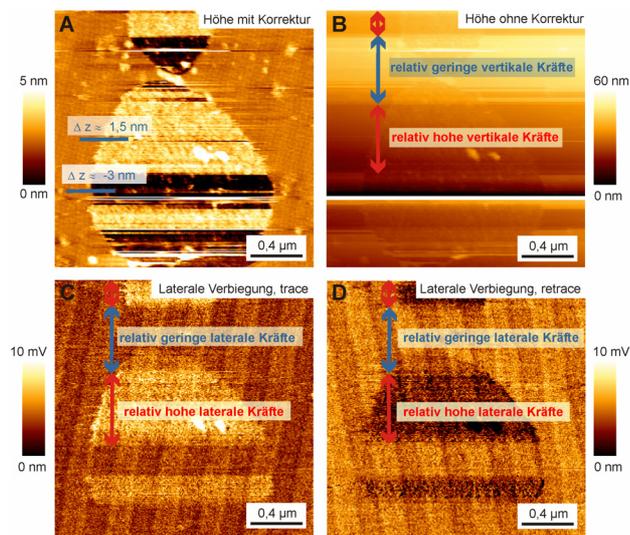


Abb. 4-22: Veranschaulichung der technischen Schwierigkeiten beim Abbilden von Lipiddoppelschichten bei der Rasterkraftmikroskopie. Topographische Aufnahme (*contact mode*) **A** nach Korrektur mit einem polynomialen Fit, **B** ohne Korrektur, sowie das Signal der lateralen Verbiegung für **C** Hinscan (*trace*) und **D** Rückscan (*retrace*). Substrat: *Mica*.

Die laterale Verbiegung des Hinscans (*trace*) und des Rückscans (*retrace*) sind in Abbildung 4-22 **C/D** dargestellt. Es ergibt sich nur ein Signal in der lateralen Verbiegung falls die lateralen Kräfte hoch genug sind. Regionen, in denen die in Abb. 4-22 **A** gezeigte Struktur als Höhe dargestellt ist, weisen in der Reibungskraftmikroskopie ein Signal auf, was auf Reibungsunterschiede zurückzuführen ist. Es tritt eine Kontrastinversion bei *trace* und *retrace* auf. Aus den durchgeführten Experimente kann geschlossen werden, dass bei einer geringfügig zu hohen Kraft (in vertikaler und lateraler Richtung) die Strukturen falsch dargestellt werden können. „Weichere“ Strukturen, wie hier die Membran, werden stärker niedergedrückt als „härtere“ Bereiche, was in einer Fehldarstellung der Oberfläche resultiert. Bei richtiger Abbildung wird die in Abbildung 4-22 gezeigte Struktur somit als Tiefe dargestellt, und kann Membrandefekten, welche Lipidsubstanz enthalten, zugeordnet werden. Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Messungen wurde deshalb versucht, die Oberfläche mit möglichst wenig Kraft abzutasten, um die fluiden Membransysteme nicht niederzudrücken. Diese Erkenntnisse sind essentiell um unspezifische STxB-Bindungen an Lipiddoppelschichten zu verifizieren, da Membrandefekte

dabei eine entscheidende Rolle spielen. Zur Untersuchung der unspezifischen Proteinbindung an Membranen wurde die DOPC-Membran mit 60 nM Cy3-gelabelten STxB 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und ungebundenes Protein durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt. Unspezifisch gebundenes STxB konnte direkt im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden (Abb. 4-23 A). Helle Bereiche mit fluoreszierendem Protein sind sichtbar, die zum Teil bis zu 20 μm groß sind. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zeigen tiefer liegende Strukturen, in deren näheren Umgebung Substanz angehäuft ist (Abb. 4-23 B). Die Tiefen und die umgebenden, höherliegenden Strukturen, sind den hellen Bereichen der Fluoreszenzaufnahme des STxB-Cy3 ähnlich. Durch Kombination von Fluoreszenzbildern nach Proteinzugabe mit SFM-Bildern vor und nach Proteinzugabe, kann somit eine unspezifische Bindung des Proteins in Membrandefekten und eine unspezifische Anlagerung des STxB in der näheren Umgebung der Membrandefekte abgeleitet werden.

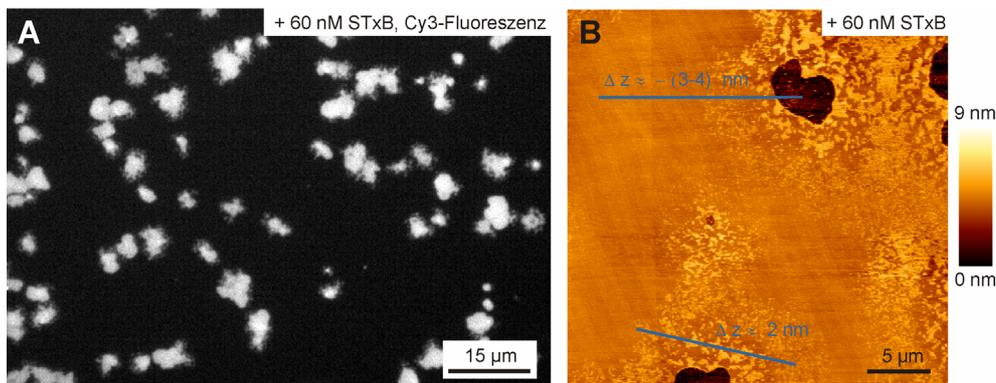


Abb. 4-23: A Fluoreszenzmikroskopische und B topographische Abbildung (*contact mode*) der unspezifischen Bindung von STxB an eine DOPC-Membran. Substrat: *Mica*.

Da bei Anwesenheit von Membrandefekten die Oberfläche des jeweiligen Substrates gut für das Protein zugänglich ist, wurde die direkte Affinität von STxB an Glimmer- und Siliziumträger ohne immobilisierte Lipiddoppelschichten untersucht. Nach einer jeweils einstündigen Inkubationszeit des gelabelten Proteins wurde das Substrat mit PBS-Puffer gespült. Im Fluoreszenzmikroskop ist auf dem *Mica*-Substrat eine sehr helle homogene Fluoreszenz des Proteins und damit eine nahezu komplette Belegung auf der Oberfläche zu erkennen (Abb. 4-24 A). Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zeigen eine

regelmäßige Struktur mit einer Höhe zwischen 1,5 bis 2 nm (Abb. 4-24 B/C), die auf unspezifisch adsorbiertes Protein zurückzuführen ist.

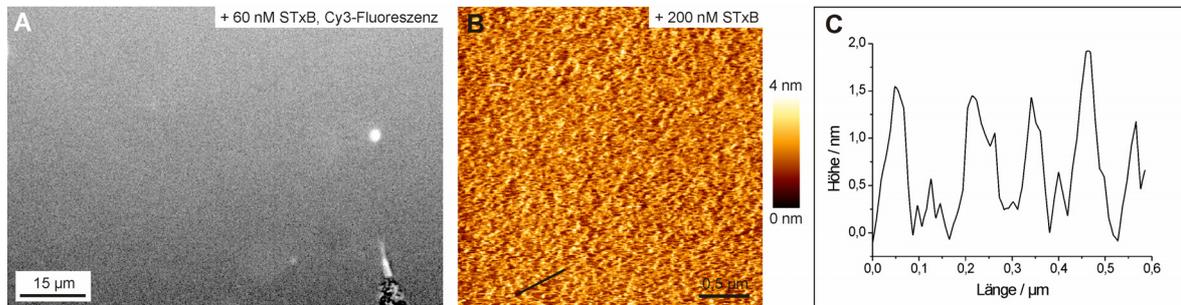


Abb. 4-24: **A** Fluoreszenzmikroskopische und **B** topographische Abbildung (*contact mode*) der unspezifischen Bindung von STxB an das Substrat *Mica* ohne immobilisierte Membran. **C** Das Linienprofil des SFM-Bildes zeigt eine Proteinhöhe zwischen 1,5 und 2 nm.

Auf dem Siliziumträger ist nach STxB-Zugabe eine kaum fluoreszierende Oberfläche zu beobachten (Abb. 4-25 A). In der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme konnte eine nahezu glatte Oberfläche abgebildet werden (Abb. 4-25 B). STxB zeigt somit eine deutlich stärkere Affinität zu *Mica* als zum Siliziumsubstrat. Die unspezifische Bindung des Shiga Toxins in den Defekten von auf Glimmer immobilisierten DOPC-Membranen (siehe Abb. 4-23), sowie weiteren in dieser Arbeit auf *Mica* immobilisierten Membranen, ist auf diesen Sachverhalt zurückzuführen.

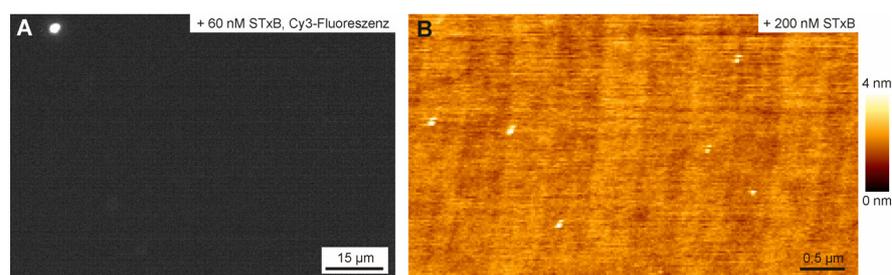


Abb. 4-25: **A** Fluoreszenzmikroskopische und **B** topographische Abbildung (*contact mode*) der unspezifischen Bindung von STxB an das Substrat Silizium ohne immobilisierte Membran.

Bindung von STxB-wt an DOPC/Gb₃ (95:5)-Membranen

Durch Charakterisierung der unspezifischen Bindung des STxB kann die spezifische Bindung des Proteins an Gb₃ an artifiziellen Membranen untersucht und zugeordnet werden. Es wurden Lipiddoppelschichten, bestehend aus DOPC/Gb₃ (95:5) mit 0,5 mol% Perylen, auf Glimmer präpariert. Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine homogene Verteilung des Fluorophors (Abb. 4-26 A). Dunkle, nicht fluoreszierende Bereiche können mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie Membrandefekten zugeordnet werden (Abb. 4-26 B), welche bis zu 5 nm tief sind (Abb. 4-26 C). In der Umgebung der Defekte treten keine strukturellen Unterschiede der Membran auf.

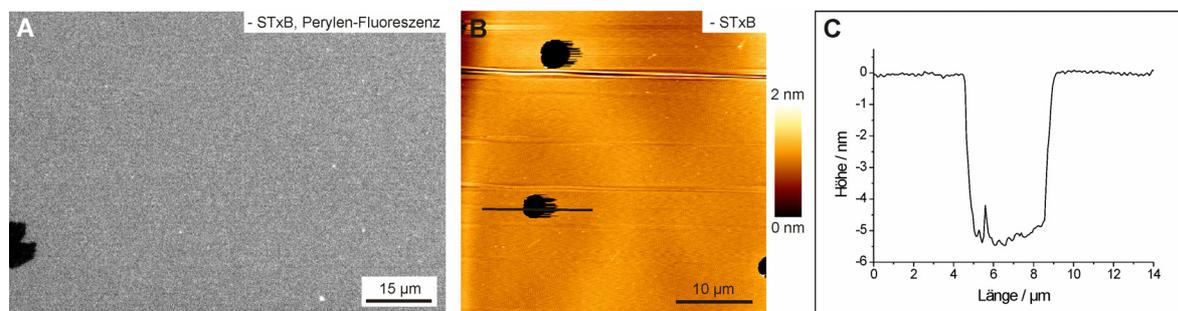


Abb. 4-26: Repräsentative **A** Fluoreszenz- und **B** SFM-Aufnahmen (*contact mode*) einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Gb₃ (95:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen mit **C** zugehörigem Linienprofil. Substrat: *Mica*.

Die Membran wurde mit 60 nM Cy3-markiertem STxB für 1 h inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt. Von derselben Stelle der Probe konnte die Perylen- sowie die Cy3-Fluoreszenz beobachtet werden. Die Fluoreszenz des Perylens zeigt keinen Unterschied zur Fluoreszenz vor Proteinzugabe (Abb. 4-27 A). In den Membrandefekten lagert sich STxB ein, was deutlich im Cy3-Fluoreszenzbild zu erkennen ist (Abb. 4-27 B). In Bereichen intakter Membran lässt sich eine homogene Cy3-Fluoreszenz beobachten, die der spezifischen Wechselwirkung zwischen STxB und Gb₃ zuzuordnen ist. Durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen können die Bereiche mit unspezifisch und spezifisch gebundenem Protein gut zugeordnet werden (Abb. 4-27 C). Es sind Membrandefekte zu beobachten, in denen sich Substanz eingelagert hat, sowie eine Anreicherung von Substanz in der näheren Umgebung der Defekte. Diese Anlagerung kann mit Hilfe des Fluoreszenzbildes dem unspezifisch gebundenen Protein zugeordnet werden. In intakten Membranbereichen werden strukturelle Unterschiede auf der Membran

beobachtet, die homogen verteilt sind und Höhenunterschiede zwischen 1 bis 1,5 nm aufweisen (Abb. 4-27 D/E). Das Abbilden dieser Struktur auf dem sehr fluiden Membransystem gestaltet sich als schwierig, da sie bei geringfügigen Änderungen der Kräfte zwischen *cantilever* und Probenoberfläche niedergedrückt wird. Die Struktur kann auf spezifisch gebundenes STxB zurückgeführt werden, welches in der Kristallstruktur eine Höhe von 2 nm aufweist (4, 6). Die Höhe dieser Proteincluster wird dabei durch die in der SFM auftretenden Kräfte unterbestimmt.

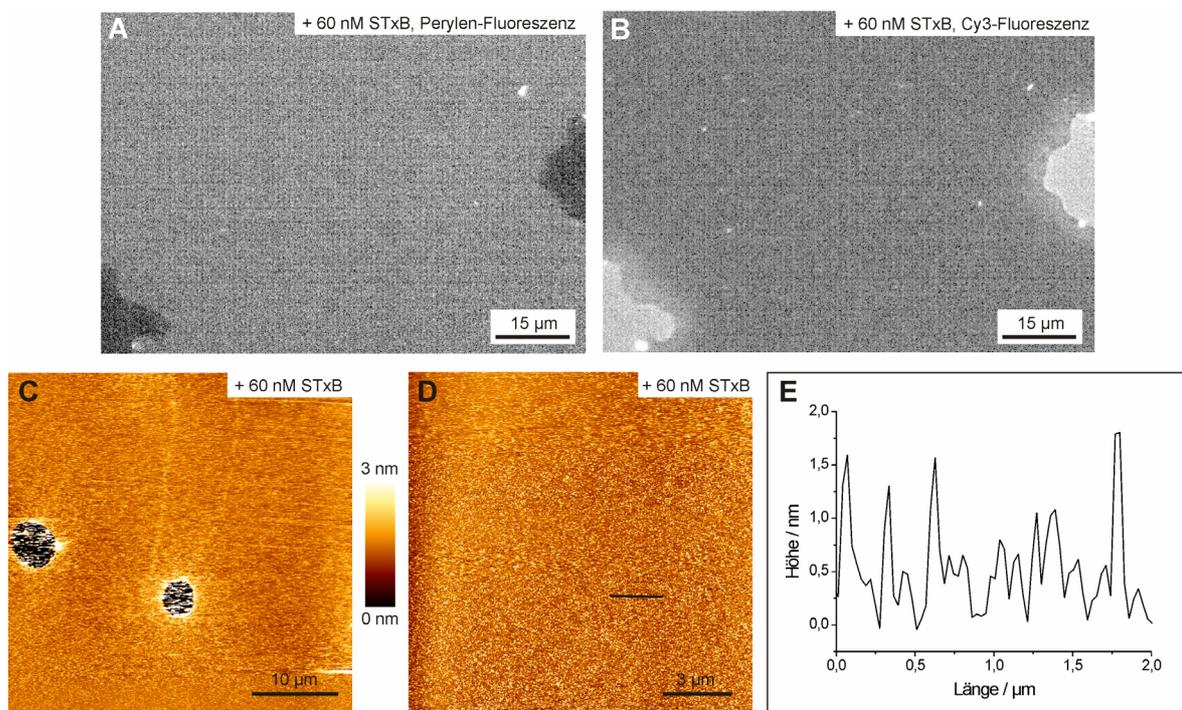


Abb. 4-27: Repräsentative Fluoreszenz- und SFM-Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Gb₃ (95:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen nach Inkubation mit 60 nM Cy3-markiertem STxB. Dargestellt sind **A** die Perylen-Fluoreszenz und **B** die Cy3-Fluoreszenz derselben Stelle, sowie **C**, **D** SFM-Aufnahmen (*contact mode*) mit **E** zugehörigem Linienprofil. Substrat: *Mica*.

Eine DOPC/Gb₃ (95:5)-Membran wurde zusätzlich auf dem Substrat Silizium mit 60 nM STxB-Cy3 inkubiert. Nach Spülen mit PBS-Puffer konnte eine nahezu homogene Fluoreszenz des Proteins auf der Membran beobachtet werden (Abb. 4-28). Vergrößert man einen Ausschnitt des Fluoreszenzbildes erkennt man, dass weite Bereiche mit Protein belegt sind. Nur selten sind schwarze Stellen sichtbar, an die kein Protein gebunden hat. Diese Stellen sind sehr klein und liegen nahe der Auflösungsgrenze des Mikroskopes.

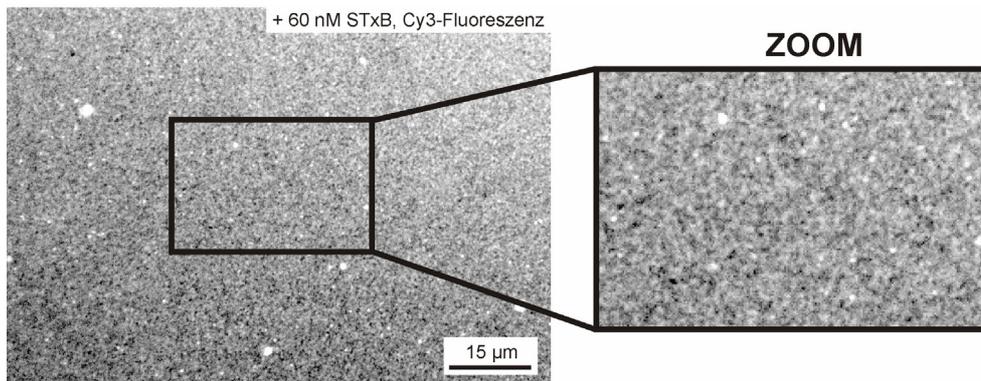


Abb. 4-28: Repräsentative Fluoreszenzaufnahme einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Gb₃ (95:5) nach Inkubation mit 60 nM STxB-Cy3 auf dem Substrat Silizium.

Bindung von STxB-W34A an DOPC/Gb₃ (95:5)-Membranen

Auf Glimmer immobilisierte DOPC/Gb₃ (95:5)-Lipiddoppelschichten dotiert mit 0,5 mol% Perylen, wurden mit 60 nM Cy3-gelabeltem STxB-W34A inkubiert. Nach Proteinzugabe zeigt sich eine nahezu homogene Perylen- und somit Membranfluoreszenz (Abb. 4-29 **A**). Das fluoreszenzmarkierte STxB-W34A fluoresziert ebenfalls homogen auf der Membran (Abb. 4-29 **B**), allerdings ist die Intensität der Cy3-Fluoreszenz deutlich geringer als nach Zugabe der gleichen Menge an fluoreszenzmarkiertem STxB-wt (siehe Abb. 4-27 **B**).

In topographischen SFM-Aufnahmen konnte gebundenes Protein nur zum Teil abgebildet werden. Es zeigt sich eine geringere Belegung der Membran mit der Proteinmutante (Abb. 4-29 **C**), was sich mit der Aussage der geringeren Cy3-Fluoreszenz deckt. Die Höhe des gebundenen Proteins beträgt ungefähr 1 nm (Abb. 4-29 **D**). Gebundenes STxB-W34A bildet wie STxB Proteincluster auf DOPC/Gb₃-Membranen aus. Die Ergebnisse aus den Kontrollexperimenten zur unspezifischen Bindung des STxB an reine DOPC-Membranen gelten auch für STxB-W34A. Die Mutante bindet ebenfalls unspezifisch an das Substrat Glimmer und lagert sich in Membrandefekten ein.

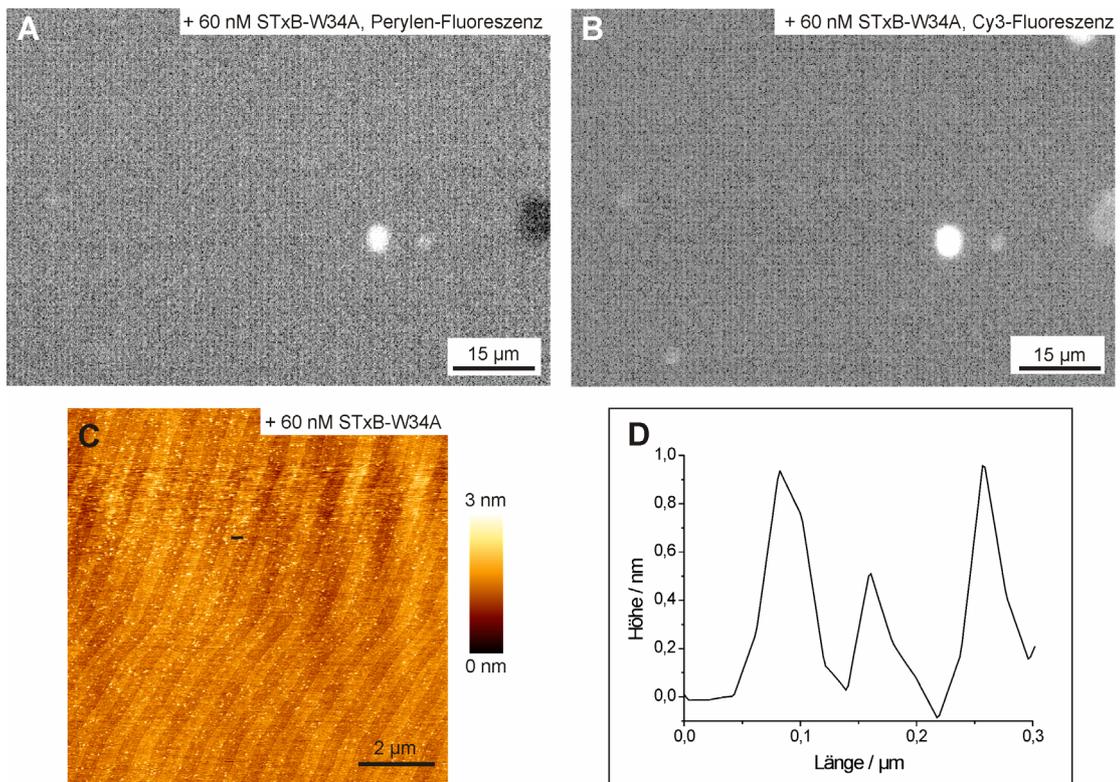


Abb. 4-29: Repräsentative Fluoreszenz- und SFM-Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Gb₃ (95:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen nach Inkubation mit 60 nM Cy3-markiertem STxB-W34A. Dargestellt sind **A** die Perylen-Fluoreszenz und **B** die Cy3-Fluoreszenz derselben Stelle, sowie eine **C** SFM-Aufnahme (*contact mode*) mit **D** zugehörigem Linienprofil. Substrat: *Mica*.

4.4 Einfluss der molekularen Struktur des Rezeptorlipids Gb₃ auf die STxB-Bindung

Bei der Charakterisierung der lateralen Organisation des STxB auf planaren Lipiddoppelschichten, bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) konnten STxB-Gb₃-Cluster, lokalisiert in der flüssig-geordneten Phase, sowie eine Lipidreorganisation, induziert durch die Proteinbindung, beobachtet werden. Das in diesen Membranen immobilisierte native Gb₃ wurde aus Schweinegewebe isoliert und besteht aus einem Gemisch verschiedener Gb₃-Moleküle. 70 % der Gb₃-Moleküle sind aufgebaut aus gesättigten Fettsäuren, 30 % aus ungesättigten Fettsäuren (genaue Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.1). Es stellte sich die Frage, welchen Einfluss die molekulare Struktur des Rezeptorlipids Gb₃ auf die laterale Organisation des gebundenen STxB und die Lipidreorganisation, induziert durch die Proteinbindung, hat. Dazu wurden zwei verschiedene, synthetisch hergestellte Gb₃-Moleküle in Lipidmembranen immobilisiert. Das synthetische Gb₃ (C22:0) ist mit der Behensäure verknüpft, welche aus 22 Kohlenstoffatomen aufgebaut ist, und nur gesättigte Kohlenstoffbindungen enthält. Das synthetische Gb₃ (C22:1¹³) ist mit der Erucasäure verknüpft, welche ebenfalls 22 Kohlenstoffatome enthält, und an Position 13 eine Doppelbindung aufweist. Es wurden Lipiddoppelschichten bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (synthetisch) (40:35:20:5) auf dem Substrat Silizium präpariert und jeweils vor und nach Proteinzugabe fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopisch charakterisiert. Die Membranzusammensetzung wurde gewählt, da diese bereits mit nativem Gb₃ charakterisiert wurde und die Experimente so wichtige Informationen bezüglich der STxB-Clusterbildung und der Lipidreorganisation durch STxB durch Vergleich mit nativem Gb₃ enthaltenen Membranen liefern können.

Bindung von STxB-wt an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:1¹³) (40:35:20:5)-Membranen

Zunächst wurden planare Lipiddoppelschichten zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:1¹³) (40:35:20:5) auf Silizium gebildet und nach Spülen mit PBS-Puffer rasterkraftmikroskopisch untersucht. Es konnte eine

topographische Struktur visualisiert werden (Abb. 4-30 **A/B**), in der ca. 0,6-0,8 nm tiefe Bereiche sichtbar sind (Abb. 4-30 **C**). Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm einer Bildstelle. Die SFM-Aufnahmen in Abbildung 4-30 **A** und 4-30 **B** stammen von unterschiedlichen Membranproben. In Abbildung 4-30 **A** nimmt die niedrige Struktur einen sichtbar geringeren Anteil der Fläche ein. Die höhere Struktur wird der flüssig-geordneten Phase (l_o -Phase) zugeordnet, die niedrige der flüssig-ungeordneten Phase (l_d -Phase). Die mittels Rasterkraftmikroskopie abgebildeten l_d -Lipiddomänen zeigen an deren Grenzlinien keine so abrupte Höhenänderung zur Membranumgebung (l_o -Phase) wie bei analogen Messungen von Membranen mit nativem Gb₃ (vgl. Abb. 4-9 **A/B**). Diesbezüglich sind die Bereiche der Lipidphasen nicht so gut definiert, was eine geringere Entmischung der Lipide und damit eine geringer ausgeprägte Phasenseparation vermuten lässt.

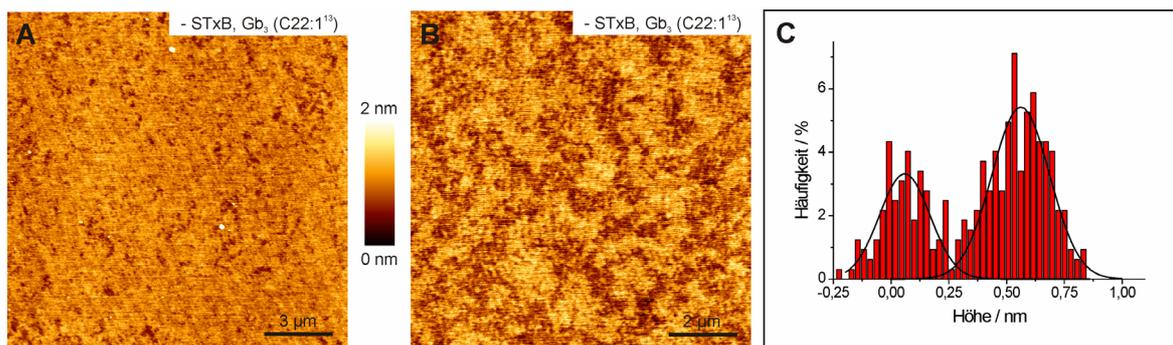


Abb. 4-30: Topographische SFM-Aufnahmen einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:1¹³) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht. **A/B** Topographische SFM-Aufnahmen (*contact mode*) von zwei unterschiedlichen Proben visualisieren **C** ca. 0,6-0,8 nm tiefe Strukturen, die der l_d -Phase zugeordnet werden. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm einer Bildstelle. Substrat: Silizium.

Die Lipiddoppelschicht wurde mit 60 nM STxB für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und ungebundenes Protein durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Membranen mit gebundenem Protein mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht. In den Aufnahmen lässt sich eine topographische Struktur erkennen (Abb. 4-31 **A/B**). Die Höhenunterschiede liegen zwischen 1 bis 1,5 nm und resultieren aus dem Unterschied von gebundenem Protein und proteinfreier Membran (Abb. 4-31 **C**). In der Aufnahme des kleineren Größenausschnittes (Abb. 4-31 **B**) kann sehr gut gezeigt werden, dass sehr wenig Bereiche ohne gebundenes Protein existieren und STxB fast die komplette Oberfläche belegt. Es war schwierig das Protein gut abzubilden, was im unteren

Bereich von Abb. 4-31 **B** zu erkennen ist, da dort durch die Kräfte des *cantilevers* auf die Probe die Oberfläche deformiert wurde.

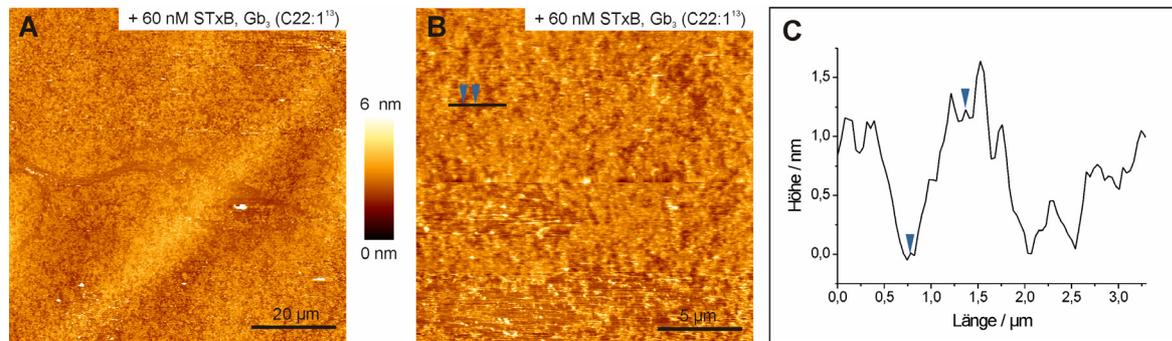


Abb. 4-31: A/B Topographische SFM-Aufnahmen (*contact mode*) einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:1¹³) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht nach der Inkubation mit 60 nM STxB. C Der Höhenunterschied zwischen gebundenem STxB und Protein-freier Membran beträgt ca. 1-1,5 nm. Substrat: Silizium.

Weiterhin wurde die Bindung des STxB an das gleiche Membransystem dotiert mit 0,5 mol% Perylen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Nach der Inkubation mit 60 nM STxB konnte eine nahezu homogene Fluoreszenz des Cy3-markierten Proteins auf der Membranoberfläche beobachtet werden (Abb. 4-32 **B**). Weiße Punkte sind vermutlich auf Proteinaggregate zurückzuführen. Die hohe Belegung der Oberfläche mit Protein deckt sich gut mit den Ergebnissen der rasterkraftmikroskopischen Messungen (siehe Abb. 4-31). Das Perylen fluoresziert an derselben Stelle der Membran ebenfalls in allen Bereichen (Abb. 4-32 **A**). Es können nur sehr leichte Nuancen von etwas helleren bzw. dunkleren Stellen beobachtet werden. Eine Anreicherung des Fluorophors in einer Lipidphase wird allerdings nicht detektiert. Im Overlay-Bild wurden die Falschfarbenbilder der Perylen (grün) und Cy3-Fluoreszenz (rot) übereinander gelegt (Abb. 4-32 **C**). Beide Fluoreszenzen überlagern sich stark auf der gesamten Oberfläche, weshalb diese insgesamt gelblich erscheint. Allerdings sind auch kleine Bereiche sichtbar, in denen ein Fluorophor jeweils heller erscheint, was in grünen und roten Stellen resultiert.

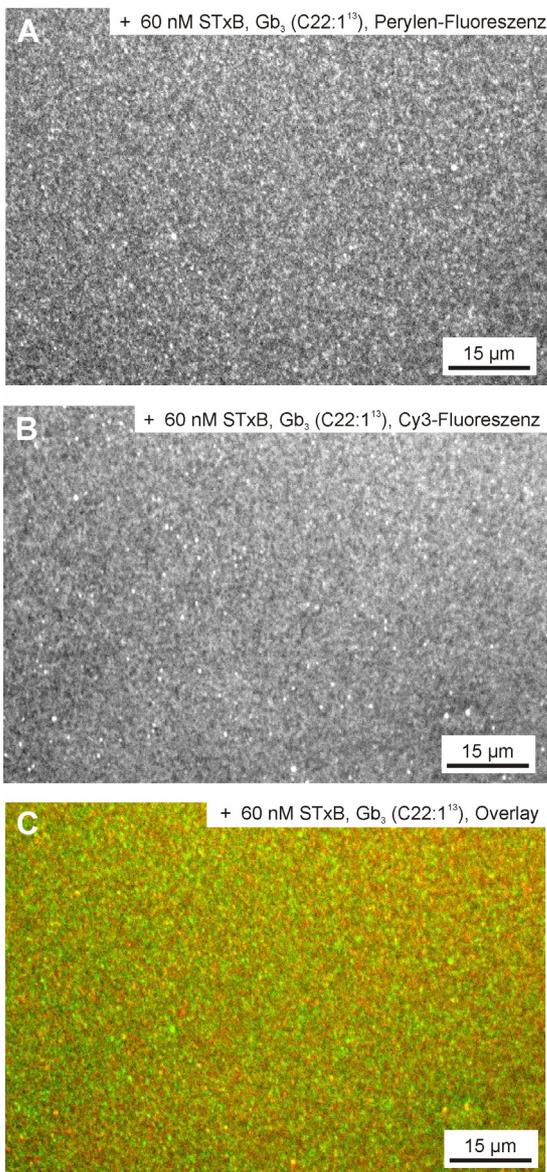


Abb. 4-32: Fluoreszenzaufnahmen einer Lipiddoppelschicht zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (C22:1¹³) (40:35:20:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen nach der Inkubation mit 60 nM Cy3-markiertem STxB. **A** Perylen-Fluoreszenzaufnahme der Membran. **B** Cy3-Fluoreszenzbild des gebundenen Proteins und **C** Overlay der Falschfarbenbilder mit grüner Perylen- und roter Cy3-Fluoreszenz. Substrat: Silizium.

Um die Lipidorganisation vor und nach Proteinzugabe fluoreszenzmikroskopisch näher zu charakterisieren, wurde das Membransystem mit den Fluorophoren Perylen (0,5 mol%) und Texas Red DHPE (0,1 mol%) zugleich dotiert. Vor Proteinzugabe war eine homogene Fluoreszenz des Perylens in der Membran zu beobachten (Abb. 4-33 **A**). Nur sehr selten sind dunklere Bereiche zu sehen, die meist sehr klein sind. Das Fluoreszenzbild des Texas Red DHPE derselben Stelle weist eine vergleichsweise inhomogenere Fluoreszenz auf (Abb. 4-33 **B**). Dunkle Bereiche, in denen der Fluorophor verarmt ist, sind sichtbar. Da in den Perylen- und Texas Red DHPE-Fluoreszenzaufnahmen keine gut definierten Strukturen sichtbar sind, gibt das entsprechende Overlay-Bild wenig Aufschluss über die

Lokalisation der Fluorophore in bestimmten Phasen (Abb. 4-33 C). Es lässt sich eine Überlagerung beider Fluoreszenzen in weiten Bereichen der Membranoberfläche vermuten, da das Overlay-Bild insgesamt gelb gefärbt erscheint. Es sind allerdings auch Stellen, in denen nur einer der beiden Fluorophore zu finden ist, sichtbar.

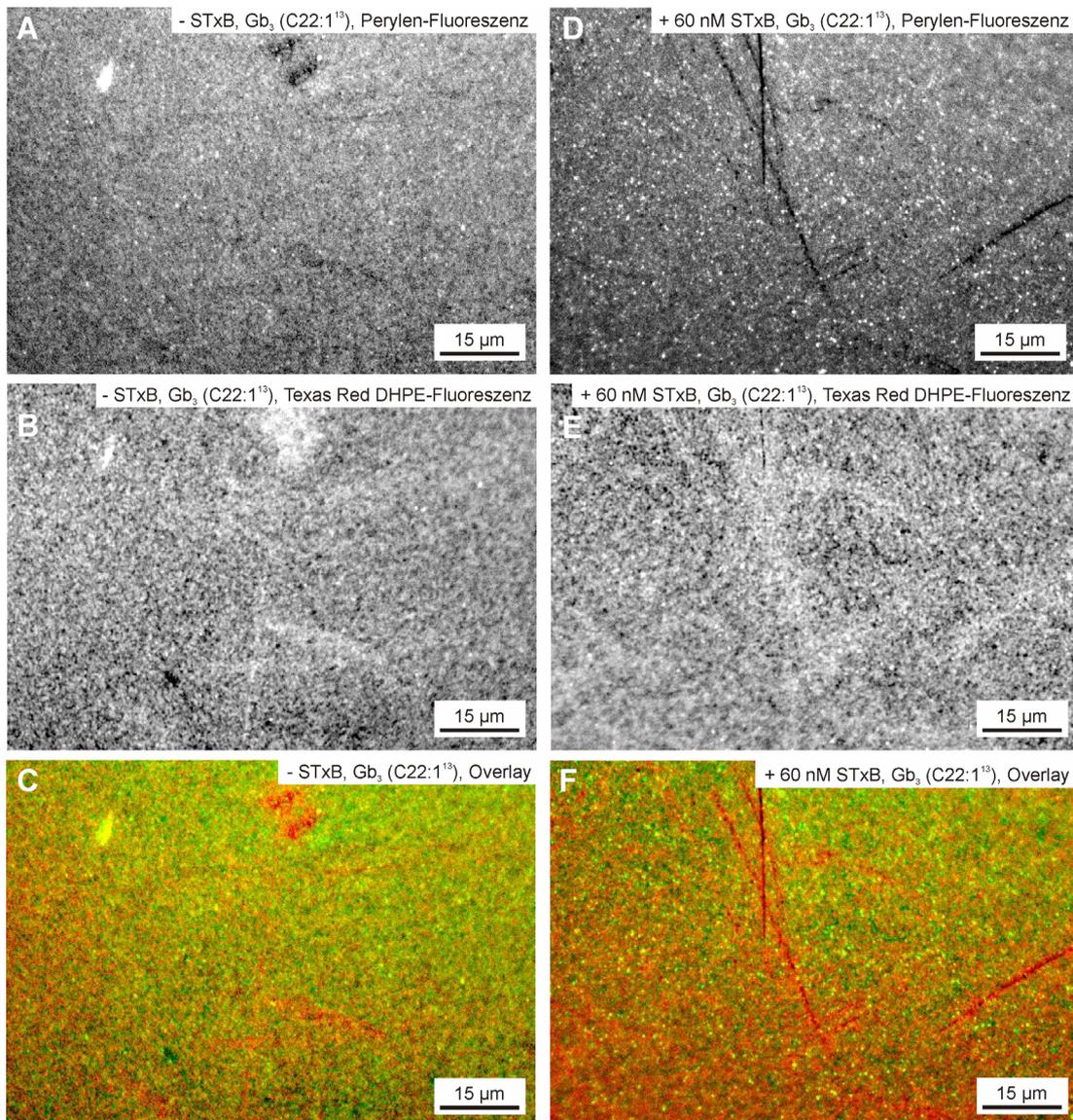


Abb. 4-33: Fluoreszenzaufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:1¹³) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten dotiert mit 0,5 mol% Perylen und 0,1 mol% Texas Red DHPE. **A** Perylen- und **B** Texas Red DHPE-Fluoreszenz vor Proteinzugabe. **C** Overlay der Falschfarbenbilder von **A** und **B** mit roter Texas Red DHPE- und grüner Perylen-Fluoreszenz. **D** Perylen- und **E** Texas Red DHPE-Fluoreszenzbilder nach Inkubation der Membran mit 60 nM STxB. **F** Overlay nach Proteinzugabe. Substrat: Silizium.

Nach Inkubation der Lipiddoppelschicht mit 60 nM STxB ist kein Unterschied in den jeweiligen Fluoreszenzaufnahmen zu erkennen (Abb. 4-33 **D-F**). Es sind eine nahezu homogene Perylen-Fluoreszenz (Abb. 4-33 **D**) und eine inhomogenere Texas Red DHPE-Fluoreszenz (Abb. 4-33 **E**) mit dunklen Bereichen zu beobachten. Durch Überlagerung beider Fluoreszenzbilder lässt sich kein Unterschied zur Membranorganisation vor Proteinzugabe ableiten (Abb. 4-33 **F**).

Bindung von STxB-wt an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5)-Membranen

Im nächsten Schritt wurden Lipiddoppelschichten auf dem Substrat Silizium zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5) mit Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie charakterisiert. In den topographischen SFM-Aufnahmen der Membran konnten tieferliegende Bereiche visualisiert werden (Abb. 4-34 **A**), die eine Höhendifferenz zur Umgebung von ca. 0,6-0,8 nm aufweisen (Abb. 4-34 **B**). Diese werden der *l_d*-Phase zugeordnet, die höherliegende Umgebung der *l_o*-Phase. Die Koexistenz der Membranphasen *l_d/l_o* konnte damit in allen Membranen, die aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (nativ, synthetisch) (40:35:20:5) aufgebaut sind, nachgewiesen werden. Die Lipiddoppelschichten mit immobilisiertem synthetischen Gb₃ weisen allerdings tendenziell eine etwas schwächer ausgebildete Phasenseparation auf. Eine geringer ausgeprägte Phasenseparation wird, wie bereits vorher beschrieben, aus rasterkraftmikroskopischen Abbildungen von Lipiddomänen, deren Bereiche nicht so gut definiert sind, abgeleitet. Die Membran DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5) wurde eine Stunde mit 100 nM STxB inkubiert und nach dem Spülen mit PBS-Puffer rasterkraftmikroskopisch untersucht. Die topographische Abbildung weist drei Strukturen mit unterschiedlichen Höhen auf (Abb. 4-34 **C**). Die Strukturen sind nicht scharf voneinander abgegrenzt, da sie durch die Abbildung mit dem *cantilever* in Scanrichtung leicht verschoben wurden. Die höchste Struktur weist eine Höhendifferenz zur umgebenden Struktur mittlerer Höhe von 1,5 bis 2,5 nm auf (Abb. 4-34 **D**). Sie wird dem Protein, gebunden an Gb₃ in der *l_o*-Phase, zugeschrieben. Die mittlere Höhe resultiert aus der umgebenden *l_o*-Phase und liegt ca. 0,5-0,6 nm höher als die dritte, tiefste Struktur, welche der *l_d*-Phase zugeordnet wird. Das SFM-Bild nach der STxB-Zugabe ähnelt der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme der mit Protein inkubierten Membran DOPC/

Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (nativ) (40:35:20:5) (siehe Abb. 4-4 **B**). Allerdings konnten die unterschiedlichen Bereiche aus proben- und messtechnischen Gründen nicht scharf abgebildet werden.

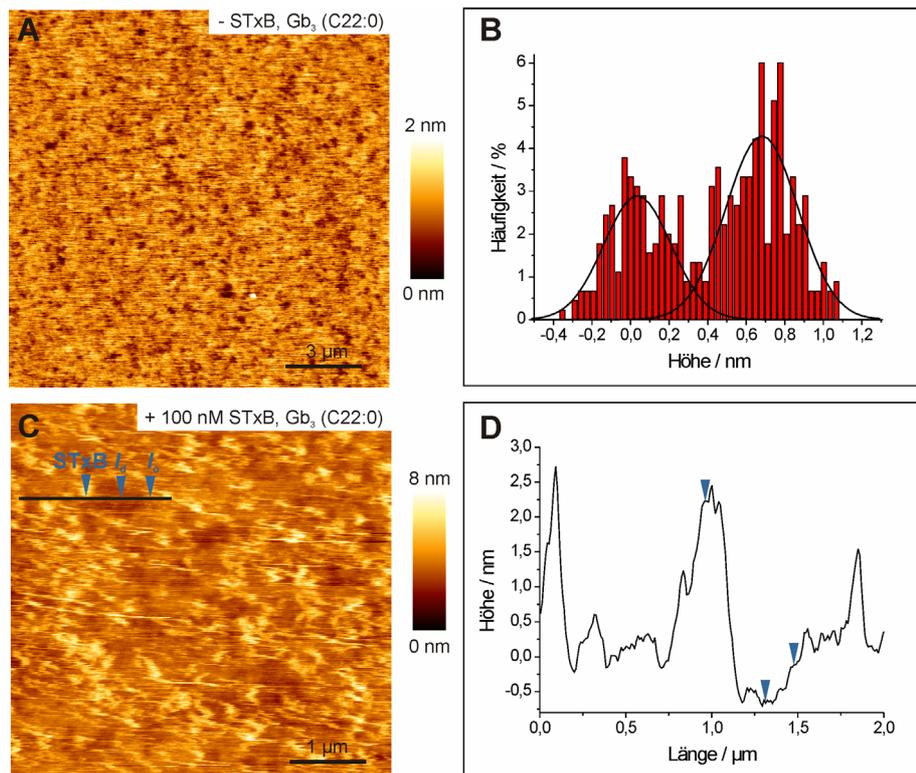


Abb. 4-34: Repräsentative topographische SFM-Aufnahmen einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht **A** vor und **C** nach Inkubation mit 100 nM STxB (*contact mode*). **B** Vor Proteinzugabe koexistiert die 0,6-0,8 nm tiefere *l_d*-Phase mit der *l_o*-Phase. **D** Nach Inkubation mit Protein ist dieses auf der *l_o*-Phase lokalisiert und weist eine Höhendifferenz zwischen 1,5 und 2,5 nm zu dieser Phase auf. Die *l_d*-Phase liegt 0,5-0,6 nm tiefer als die *l_o*-Phase. Substrat: Silizium.

Zusätzlich wurde die Membran dotiert mit 0,5 mol% Perylen nach Inkubation mit 60 nM STxB-Cy3 fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert. Die Fluoreszenzaufnahme des Perylens zeigt eine inhomogene Verteilung des Fluorophors (Abb. 4-35 **A**). Es sind dunkle Bereiche, in denen weniger Perylen vorliegt, sichtbar. Weiße punktförmige Strukturen sind vermutlich auf adsorbierte Vesikel zurückzuführen. Die Fluoreszenz des Cy3-markierten STxB zeigt ebenfalls eine inhomogene Verteilung des Proteins (Abb. 4-35 **B**). Im Vergleich zu Cy3-Fluoreszenzaufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/

Gb₃ (C22:1¹³) (40:35:20:5)-Membranen (siehe Abb. 4-32 **B**), ist das STxB hier in gut definierten Bereichen der Membranoberfläche lokalisiert, was zu einem starken Kontrast des Bildes führt. Dies korreliert gut mit der entsprechenden SFM-Aufnahme nach Proteinzugabe (siehe Abb. 4-34 **C**).

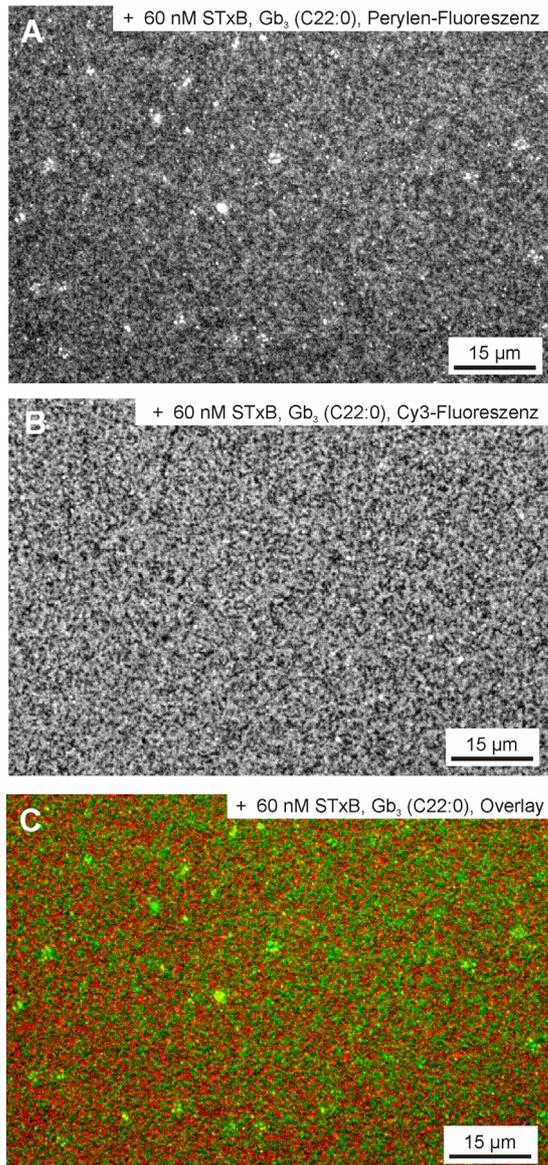


Abb. 4-35: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht dotiert mit 0,5 mol% Perylen nach Inkubation mit 60 nM Cy3-markiertem STxB. **A** Perylen-Fluoreszenzaufnahme der Membran. **B** Cy3-Fluoreszenzbild des gebundenen Proteins und **C** Overlay der Falschfarbenbilder mit grüner Perylen- und roter Cy3-Fluoreszenz. Substrat: Silizium.

Die Überlagerung der Falschfarbenbilder mit grüner Perylen- und roter Cy3-Fluoreszenz (Abb. 4-35 **C**) zeigt, dass das Proteins in dunklen Bereichen der Perylen-Fluoreszenz angereichert ist. Diese Stellen erscheinen deshalb rot. Die fluoreszierenden Bereiche des Perylen sind in der Cy3-Fluoreszenz dunkel, sie erscheinen im Overlay grün. Die

rasterkraftmikroskopische Detektion von STxB in der l_o -Phase lässt daher eine Anreicherung des Perylens in der l_d -Phase nach Proteinzugabe vermuten.

Im Anschluss sollte mittels Fluoreszenzbeobachtungen eine mögliche Lipidreorganisation dieser Membranen, induziert durch die Bindung von STxB an Gb₃ (C22:0), in 0,5 mol Perylen- und 0,2 mol% Texas Red DHPE-dotierten Lipiddoppelschichten untersucht werden. Vor Proteinzugabe konnte eine relativ homogene Perylen-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 4-36 A). Es sind nur ansatzweise dunklere Bereiche zu sehen, die aber einen schwachen Kontrast zur Umgebung aufweisen. Die Fluoreszenz des Texas Red DHPE ist dagegen in definierten Bereichen lokalisiert (Abb. 4-36 B). Es sind dunkle Stellen zu beobachten, die wahrscheinlich der l_d -Phase zuzuordnen sind. Da die Perylen-Fluoreszenz homogen ist, liefert das Overlay-Bild kaum Information (Abb. 4-36 C).

Nach Inkubation mit 60 nM STxB erscheint die Perylen-Fluoreszenz etwas weniger homogen (Abb. 4-36 D), die Texas Red DHPE-Fluoreszenz ist ebenfalls inhomogen. Im Vergleich zum Aussehen der Membran vor Proteinzugabe scheint die Phasenseparation etwas stärker ausgeprägt zu sein, da die dunklen Bereiche des Texas Red DHPE-Fluoreszenzbildes etwas größer sind und einen stärkeren Kontrast zur Umgebung aufweisen (Abb. 4-36 E). Im Overlay beider Fluoreszenzenbilder sind sowohl grüne, rote als auch gelbe Bereiche sichtbar, wobei diese gute definierte Formen aufweisen (Abb. 4-36 F). Im Vergleich zu Membranen bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:1¹³) (40:35:20:5) ist die durch die Texas Red DHPE detektierte Phasenseparation vor und nach Proteinzugabe stärker ausgeprägt (siehe Abb. 4-33), was durch die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung von größeren Bereichen, in denen sich Fluorophor stärker angereichert hat, gefolgert werden kann.

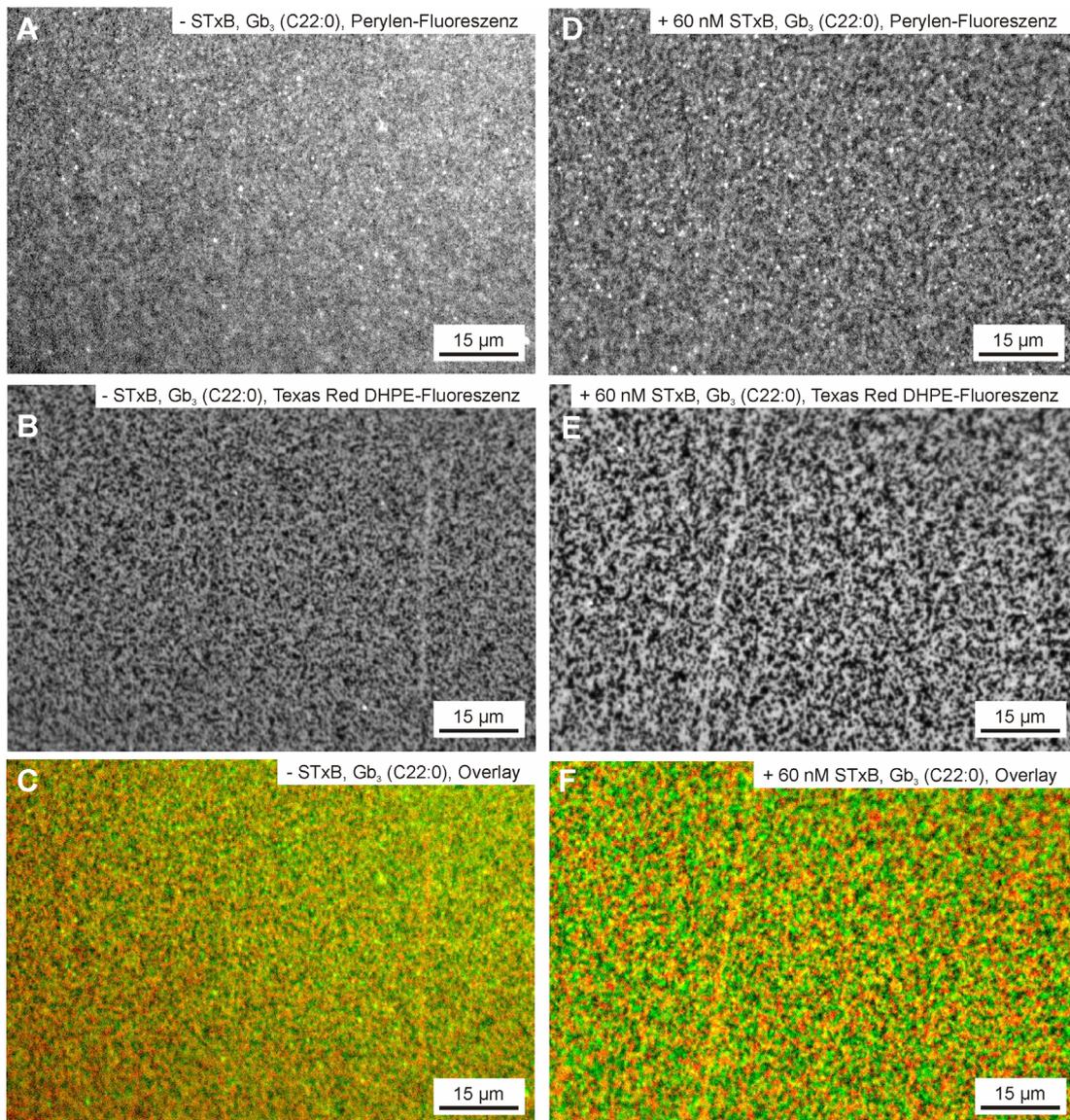


Abb. 4-36: Fluoreszenzaufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5)-Membranen markiert mit 0,5 mol% Perylen und 0,1 mol% Texas Red DHPE. **A** Perylen- und **B** Texas Red DHPE-Fluoreszenzaufnahmen vor STxB-Zugabe. **C** Overlay der Falschfarbenbilder von **A** und **B** mit roter Texas Red DHPE- und grüner Perylen-Fluoreszenz. **D** Fluoreszenzbilder des Perylens und **E** des Texas Red DHPE nach Inkubation der Membran mit 60 nM STxB. **F** Overlay nach Proteinzugabe. Substrat: Silizium.

Bei wenigen Membranpräparationen mit der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen wurden zum Teil Abweichungen zu den vorher beschriebenen Resultaten beobachtet. Die in Abbildung 4-37 **A** dargestellte topographische SFM-Aufnahme einer solchen Membran

lässt eine Phasenseparation in eine l_o -Phase und eine ca. 0,6-1 nm tiefere l_d -Phase ableiten (Abb. 4-37 B).

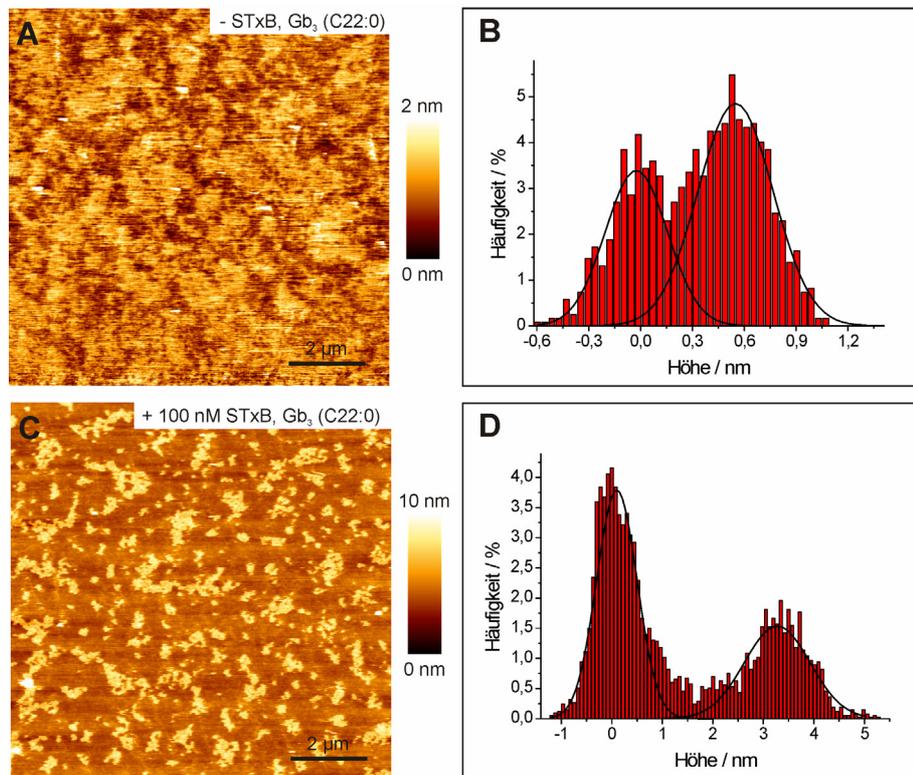


Abb. 4-37: Topographische SFM-Aufnahmen (*contact mode*) einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5) **A** vor und **C** nach Inkubation mit 100 nM STxB mit **B/D** zugehörigen Linienprofilen. Substrat: Silizium.

Der Flächenanteil der l_o -Phase ist im Vergleich zu der in Abbildung 4-34 **A** gezeigten Membran deutlich kleiner. Nach Zugabe von 100 nM Cy3-markiertem STxB konnten sehr gut definierte Bereiche mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet werden (Abb. 4-37 **C**), die ca. 3,3 nm hoch sind (Abb. 4-37 **D**). Diese Struktur ist auf gebundenes Protein zurückzuführen.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dieser Membran zeigte, dass in dunklen Bereichen der Perylen-Fluoreszenz (Abb. 4-38 **A**) die Fluoreszenz des Cy3-markierten Proteins hell erscheint (Abb. 4-38 **B**), weshalb diese im Overlay als rote Bereiche zu erkennen sind (Abb. 4-38 **C**). Die mittlere Graustufe des Cy3-Fluoreszenzbildes überlappt mit der Perylen-Fluoreszenz und erscheint im Overlay gelblich. Die dunklen Bereiche der

Proteinfluoreszenz sind im Overlay-Bild grün, da auch in diesen Bereichen das Perylen fluoresziert. Die hell leuchtenden Strukturen des fluoreszierenden Proteins sind kleiner als $3\ \mu\text{m}$ und ähneln bezüglich Größe und Form den ca. $3,3\ \text{nm}$ hohen Strukturen des zugehörigem SFM-Bildes (Abb. 4-37 **B**). Vermutlich konnten somit Bereiche, welche im Cy3-Fluoreszenzbild eine mittlere Graustufe aufwiesen, nicht mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet werden. Möglich wäre, dass der geringere Anteil der l_0 -Phase vor Proteinzugabe, zu einer anderen lateralen Organisation der STxB-Cluster auf der Membran führt.

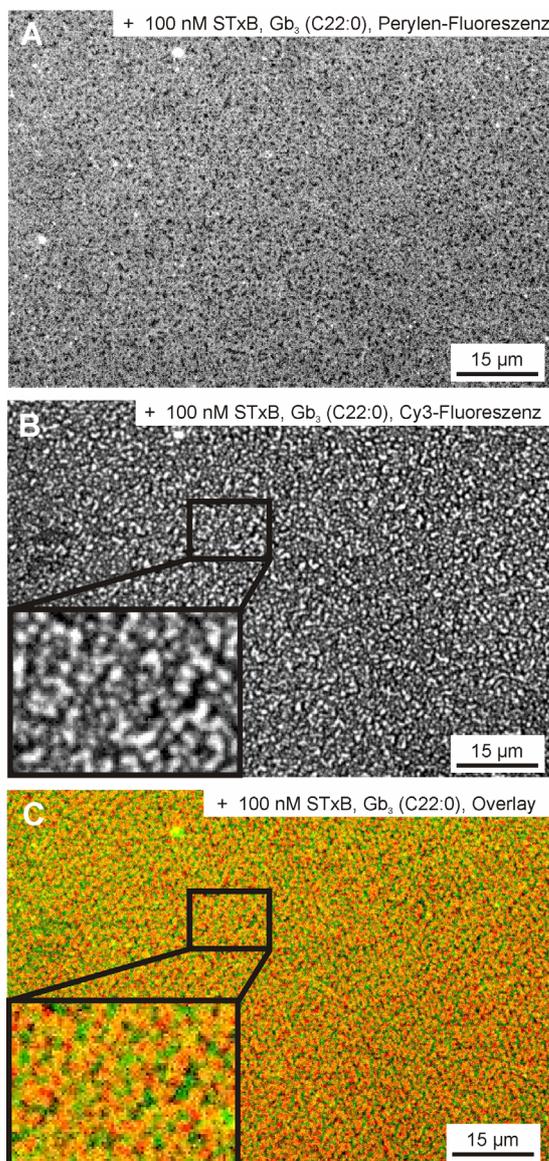


Abb. 4-38: Fluoreszenzaufnahmen der in Abbildung 4-37 gezeigten Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:0) (40:35:20:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen nach Inkubation mit 100 nM Cy3-markiertem STxB. **A** Perylen-Fluoreszenzbild der Membran. **B** Cy3-Fluoreszenzaufnahme des gebundenen Proteins und **C** Overlay der Falschfarbenbilder mit grüner Perylen- und roter Cy3-Fluoreszenz. Substrat: Silizium.

4.5 STxB-Bindung an Lipidmonoschichten

Die Mobilität von Membran- und Proteindomänen planarer Lipiddoppelschichten, die auf einem festen Substrat immobilisiert sind, ist relativ gering. Um Veränderungen der Membrandomänen, sowie die mögliche Bildung von Membrandomänen auf einer kleineren Zeitskala beobachten zu können, wurde ein dynamischeres System genutzt. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit planaren Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche mittels Filmwaagetechnik durchgeführt.

Bindung von STxB-wt an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Monoschichten

Eine in Chloroform gelöste Lipidmischung bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC wurde auf einer Subphase, bestehend aus PBS-Puffer, gespreitet. Die Lipidmonoschicht wurde bis zu einem Druck von 30 mN/m komprimiert. Eine typische Isotherme, welche den Oberflächendruck in Abhängigkeit der mittleren Fläche pro Molekül darstellt (Π/A -Isotherme), ist in Abbildung 4-39 gezeigt. Die Isotherme beschreibt einen kontinuierlichen Anstieg des Oberflächendrucks im Verlauf der Kompression. Ein Phasenübergang, der durch die Existenz eines Knickes oder Plateaus detektiert wird, kann nicht beobachtet werden. Bei 30 mN/m besitzen die Lipidmoleküle eine mittlere Fläche von 55 Å².

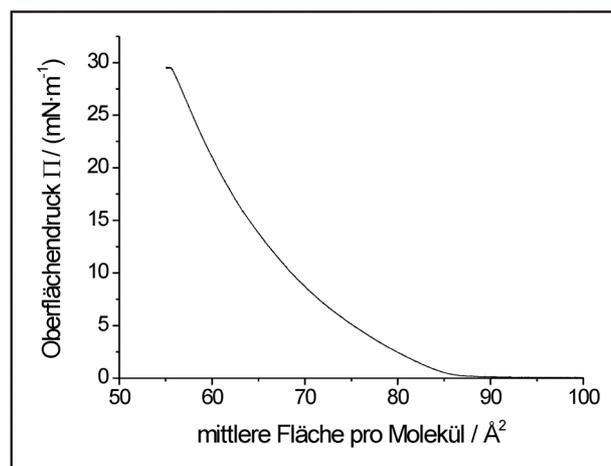


Abb. 4-39: Π/A -Isotherme einer Lipidmonoschicht bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde das Phasenverhalten der Lipidmonoschichten analysiert. Monoschichten bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) wurden deshalb mit 1 mol% Bodipy-PC bzw. 0,5 mol% Perylen dotiert. Bei einem Oberflächendruck von 5 mN/m werden in der mit Bodipy-PC markierten Monoschicht runde, dunkle, Domänen, die der flüssig-geordneten Phase zugeordnet werden, beobachtet. (Abb. 4-40 A). Der Durchmesser der Domänen liegt meist unterhalb von 10 µm. Die *l*₀-Phase ist angereichert mit Sphingomyelin und Cholesterin (96, 97). Der Fluorophor Bodipy-PC ist lokalisiert in der umgebenden *l*_d-Phase (38), welche sich hauptsächlich aus DOPC zusammensetzt. Membranen, welche mit 0,5 mol% Perylen dotiert sind, zeigen bei einem Oberflächendruck von 5 mN/m eine Anreicherung des Fluorophors in der *l*₀-Phase (Abb. 4-40 B). Der Kontrast zur *l*_d-Phase ist nicht so stark ausgeprägt wie beim entsprechenden Bodipy-PC-Fluoreszenzbild, woraus man schließen kann, dass ein gewisser Anteil des Perylens in der *l*_d-Phase lokalisiert ist.

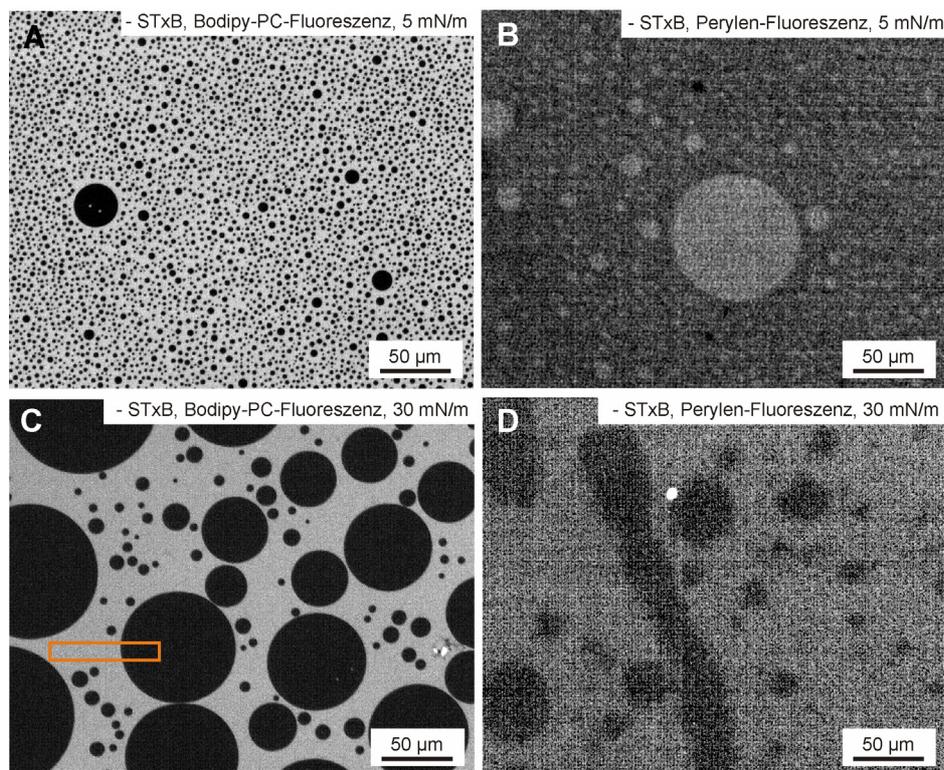


Abb. 4-40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidmonoschichten bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC bzw. 0,5 mol% Perylen. Bodipy-PC-Fluoreszenzaufnahme bei **A** 5 mN/m und **C** 30 mN/m. Perylen-Fluoreszenzaufnahme bei **B** 5 mN/m und **D** 30 mN/m.

Bei weiterer Komprimierung der Monoschicht wächst die Größe der runden l_o -Domänen an, was durch Fluoreszenz des Bodipy-PC beobachtet werden kann. Bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m ist der Durchmesser der Domänen zum Teil größer als 100 μm (Abb. 4-40 C). Aus der Beobachtung der Perylen-Fluoreszenz im Verlaufe der Kompression der Monoschicht, lässt sich eine Abhängigkeit der Perylenverteilung in den koexistierenden Lipidphasen vom Oberflächendruck, und damit von der Lipidpackung, ableiten. Unterhalb eines Oberflächendrucks von 10 mN/m, bei der die Lipide eine mittlere Fläche pro Molekül größer als 70 \AA^2 aufweisen, ist Perylen überwiegend in der l_o -Phase lokalisiert. Ein Anstieg des Oberflächendrucks bis zu 20 mN/m (mittlere Fläche pro Molekül: 60 \AA^2) resultiert in einer homogenen Verteilung des Fluorophors in beiden Lipidphasen. Oberhalb von 20 mN/m ist Perylen bevorzugt in der l_d -Phase lokalisiert. Die Anreicherung von Perylen bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m in der l_d -Phase ist in Abbildung 4-40 D dargestellt.

Die Bindung von STxB an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipidmonoschichten dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC wurde durch die Injektion von 60 nM des Cy3-gelabelten Proteins bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m in die Subphase initiiert. Die Fluoreszenz von Bodipy-PC und STxB-Cy3 wurde simultan über die Zeit beobachtet. Nach ca. 30 min sind erste Veränderungen innerhalb der Monoschicht sichtbar (Abb. 4-41 A). Viele kleine Domänen, sowie Veränderungen der Domänenform in deren Randbereichen sind zu beobachten. 60 Minuten nach Proteinzugabe zeigen die Bodipy-PC-Fluoreszenzaufnahmen deutlich, dass sich die Form der l_o -Domänen von vorher runden zu weniger runden Domänen verändert (Abb. 4-41 B). Des Weiteren wurde eine zweite Graustufe innerhalb der Domänen erkennbar, weshalb eine zusätzliche Phasenseparation innerhalb der l_o -Phase angenommen wird (Abb. 4-41 B, Zoom). Die Bestimmung des Durchschnittes von 40 Linienprofilen der Fluoreszenzintensität macht diesen Sachverhalt deutlich (Abb. 4-41 D). Das blaue Rechteck in Abbildung 4-41 B weist drei Stufen der Fluoreszenzintensität auf (Linienprofil blau in Abb. 4-41 D). Vor Proteinzugabe wurden im Bereich des gelben Rechtecks in Abbildung 4-40 C nur zwei Stufen der Fluoreszenzintensität detektiert (Linienprofil orange in Abb. 4-41 D). Fluoreszenzbilder des STxB-Cy3 60 min nach Proteinzugabe zeigen eine Kollokalisierung

des Proteins mit der l_o -Phase, was die Anwesenheit von Gb_3 in dieser Phase nach Proteinzugabe impliziert.

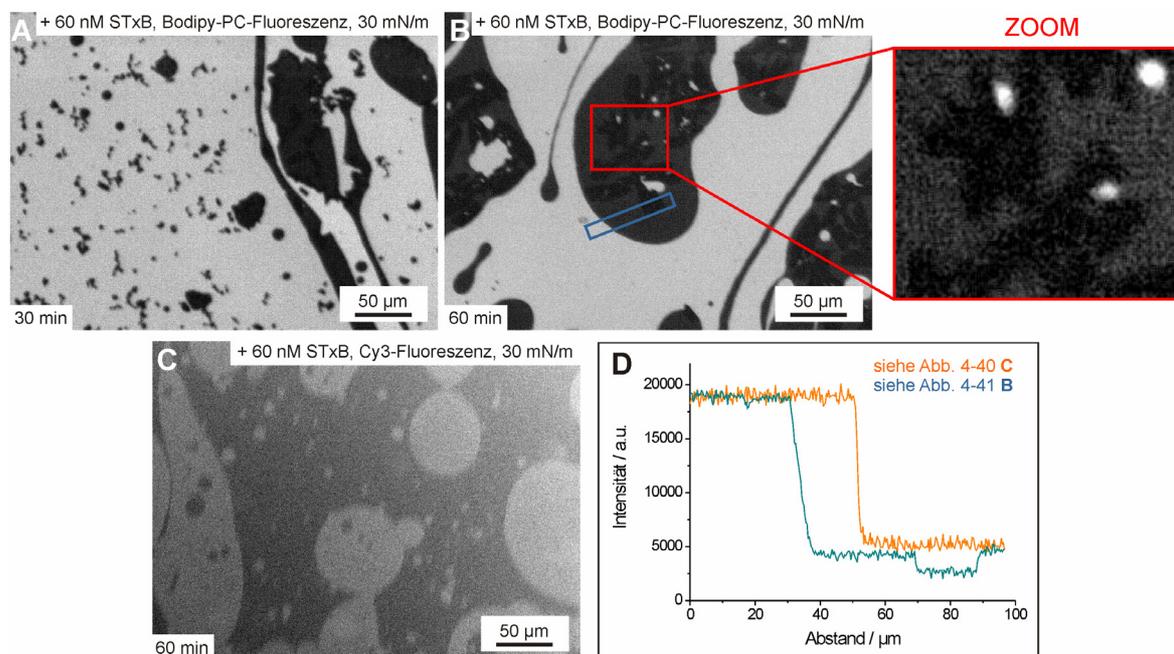


Abb. 4-41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidmonoschichten zusammengesetzt aus DOPC/ Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC nach STxB-Zugabe. **A** Bodipy-PC-Fluoreszenz 30 min, **B** 60 min und **C** Cy3-Fluoreszenz des Proteins 60 min nach STxB-Zugabe. **D** Durchschnittliche Fluoreszenzintensität aus 40 Linienprofilen vor (orange) und nach (blau) Proteinzugabe.

Eine detaillierte Pixelanalyse wurde durchgeführt, um die Veränderungen in der Monoschicht nach Proteinzugabe deutlich zu machen. Die Häufigkeiten der Domänenflächen A_D (l_o -Domänen) sowie der Circularität C vor Proteinzugabe, 30 min und 60 min nach Inkubation mit Protein wurden jeweils aus mehreren Fluoreszenzbildern ermittelt (Abb. 4-42 und 4-43), und daraus verschiedene Parameter abgeleitet (Tabelle 4-1). Die gesamte Fläche der l_o -Phase ändert sich über die Zeit nur sehr wenig. Vor Proteinzugabe betrug der Anteil der l_o -Phase an der Gesamtfläche 32 %, 30 min nach Proteinzugabe 33 % und nach 60 min mit 37 % nur geringfügig mehr. Die Anzahl der l_o -Domänen pro Fläche steigt jedoch nach 30 min von $(332 \pm 66) \text{ mm}^{-1}$ auf $(753 \pm 289) \text{ mm}^{-1}$ stark an, was hauptsächlich aus der Anwesenheit von kleinen Domänen mit einer kleineren Domänenfläche als $1000 \mu\text{m}^2$ resultiert. Vor Proteinzugabe waren 72 % der Domänen kleiner $1000 \mu\text{m}^2$ (Abb. 4-42 A), während 30 min nach Proteinzugabe 94 % aller Domänen unterhalb dieses Wertes lagen (Abb. 4-42 B). 60 min nach Inkubation mit STxB sind nur

noch 88 % aller Domänen kleiner $1000 \mu\text{m}^2$ (Abb. 4-42 C), wobei die Zahl der Domänen auf $(291 \pm 260) \text{mm}^{-1}$ gesunken ist. Der Anteil der Domänen, die kleiner als $1000 \mu\text{m}^2$ sind, an der Gesamtdomänenfläche ($\Sigma A_D(\text{gesamt})$) beträgt nur 14 % vor Proteinzugabe. Dieser Wert sinkt 30 min nach STxB-Zugabe auf 10 % und nach 60 min auf 5 %. Da 30 Minuten nach Proteinzugabe die Zahl der kleinen Domänen ($A_D < 1000 \mu\text{m}^2$) steigt, der Anteil, den diese an der Gesamtdomänenfläche haben, allerdings sinkt, kann gefolgert werden, dass diese Domänen neu und nicht durch Zerfall von bereits bestehenden l_o -Domänen entstehen. Nach 60 min steigt dagegen der Anteil der Domänen $\geq 1000 \mu\text{m}^2$, sowie der Flächenanteil der l_o -Phase an der Gesamtfläche der Monoschicht, woraus sich schließen lässt, dass tatsächlich neue l_o -Domänen durch STxB-Bindung entstehen, die mit der Zeit zu größeren Domänen fusionieren.

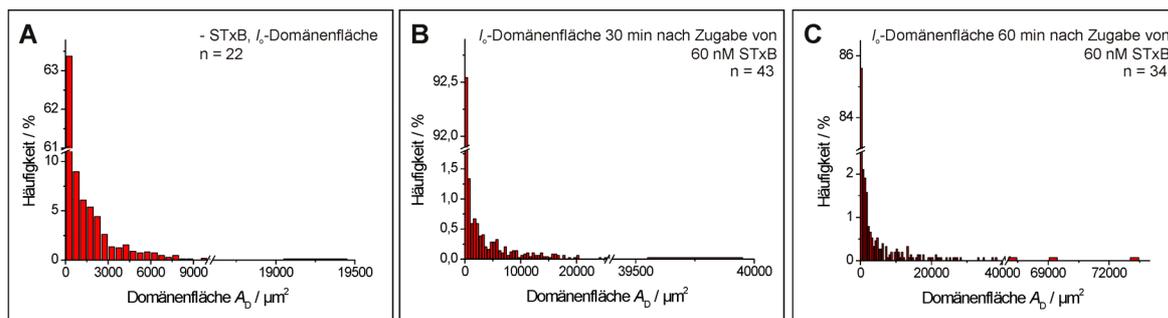


Abb. 4-42: Häufigkeiten der l_o -Domänenflächen A_D in Lipidmonoschichten zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m. **A** Vor Proteinzugabe, **B** 30 min und **C** 60 min nach Zugabe von 60 nM STxB.

Die Circularität C der Domänen ändert sich durch die Proteinbindung nicht wesentlich. Vor Zugabe von Protein beträgt die mittlere Circularität aller Domänen $(0,60 \pm 0,30)$, wobei die kleinen Domänen ($A_D < 1000 \mu\text{m}^2$) mit $(0,71 \pm 0,29)$ eine höhere Circularität aufweisen als die Domänen, deren Fläche $A_D \geq 1000 \mu\text{m}^2$ ist und eine Circularität von $(0,45 \pm 0,30)$ besitzen (Abb. 4-43 A). 30 Minuten nach Proteinzugabe steigt die Circularität aller Domänen auf $(0,78 \pm 0,23)$, was aus dem Anstieg der Circularität der Domänen mit $A_D < 1000 \mu\text{m}^2$ auf $(0,81 \pm 0,19)$ resultiert (Abb. 4-43 B). Nach 60 Minuten Inkubation mit Protein beträgt die mittlere Circularität der gesamten Domänen $(0,74 \pm 0,23)$, die der Domänen mit einer Domänenfläche $A_D < 1000 \mu\text{m}^2$ $(0,79 \pm 0,19)$ (Abb. 4-43 C).

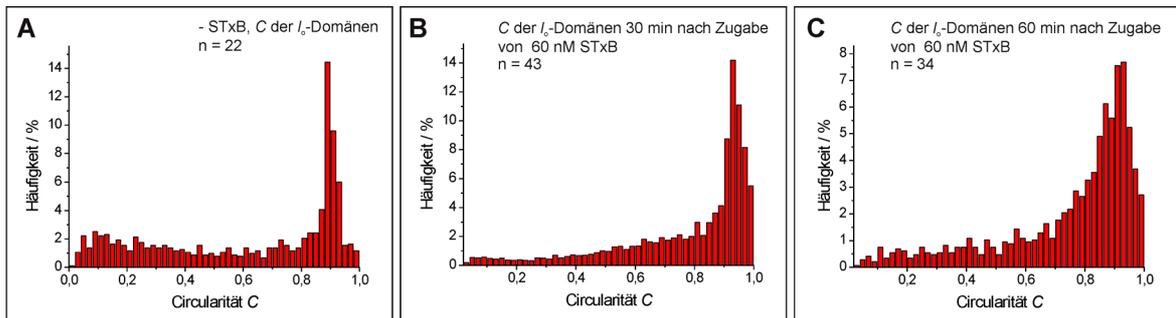


Abb. 4-43: Häufigkeiten der Circularitäten C in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipidmonoschichten dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m. **A** Vor Proteinzugabe, **B** 30 min und **C** 60 min nach Zugabe von 60 nM STxB.

Die Ergebnisse der Pixelanalyse sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Aus den Veränderungen der Domänenflächen und den geringfügigen Änderungen der Circularität C der Domänen mit der Zeit, kann gefolgert werden, dass innerhalb einer Zeitskala von 30 min die Proteinbindung in der Bildung von kleinen l_o -Domänen resultiert, während in einer Zeitspanne von 60 min eine Reorganisation der Lipiddomänen erfolgt, was zu einer geringeren Anzahl von l_o -Domänen führt.

Tab. 4-1: Zusammenfassung der Parameter zur Beschreibung der zeitlichen Veränderungen in Lipidmonoschichten zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC nach Zugabe von 60 nM STxB. Die Parameter wurden aus einer detaillierten Pixelanalyse mehrerer Fluoreszenzbilder erhalten, bei der die Häufigkeiten der l_o -Domänenflächen A_D sowie die Circularität C der l_o -Domänen bestimmt wurde.

	- STxB	+ STxB, nach 30 min	+ STxB, nach 60 min
Bilderanzahl für Statistik	22	43	34
$\Sigma A_D(\text{gesamt}) \cdot 100 / \Sigma A_{\text{Gesamt}}$ [%]	32	33	37
l_o -Domänen/Fläche [mm^{-1}]	332 ± 66	753 ± 289	291 ± 260
l_o -Domänen ($A_D < 1000 \mu\text{m}^2$) [%]	72	94	88
l_o -Domänen ($A_D \geq 1000 \mu\text{m}^2$) [%]	28	6	12
$\Sigma A_D(< 1000 \mu\text{m}^2) \cdot 100 / \Sigma A_D(\text{gesamt})$ [%]	14	10	5
$\Sigma A_D(\geq 1000 \mu\text{m}^2) \cdot 100 / \Sigma A_D(\text{gesamt})$ [%]	86	90	95
mittlere Circularität C	0,60 ± 0,30	0,78 ± 0,23	0,74 ± 0,23
mittlere Circularität C ($A_D < 1000 \mu\text{m}^2$)	0,71 ± 0,29	0,81 ± 0,19	0,79 ± 0,19
mittlere Circularität C ($A_D \geq 1000 \mu\text{m}^2$)	0,45 ± 0,30	0,43 ± 0,29	0,48 ± 0,27

Bindung von STxB-wt DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5)-Monoschichten

Zusätzlich wurden Monoschichten zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC, die durch veränderte Lipidverhältnisse ein anderes Phasenverhalten aufweisen, fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert. Bei einem Oberflächendruck von 10-35 mN/m konnte keine Phasenseparation der Lipide beobachtet werden (Abb. 4-44 **A**). Das Bodipy-PC-Fluoreszenzbild zeigt eine homogene Verteilung des Fluorophors. Die Zugabe von 60 nM STxB-Cy3 bewirkt nach 60 min Proteininkubation die Bildung von kondensierten dunklen Domänen, in denen der Fluorophor ausgeschlossen wird (Abb. 4-44 **B**). Diese Bereiche leuchten hell im Cy3-Fluoreszenzbild (Abb. 4-44 **C**). Durch die Entstehung dieser geordneten Phase, die wahrscheinlich mit Gb₃ angereichert ist, konnte eindeutig gezeigt werden, dass STxB fähig ist, durch Bindung an Gb₃ eine Phasenseparation zu induzieren.

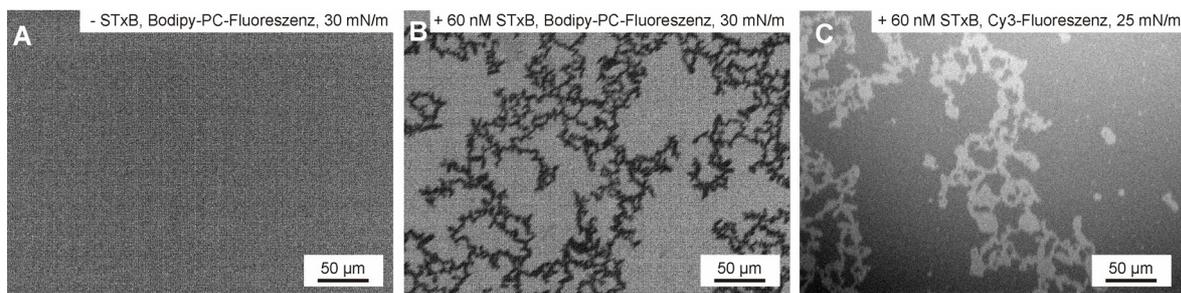


Abb. 4-44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5)-Lipidmonoschichten dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC bei Oberflächendrücken zwischen 25 und 30 mN/m. **A** Vor Proteinzugabe ist der Fluorophor Bodipy-PC homogen verteilt. **B** 60 min nach Inkubation mit STxB sind dunkle Domänen sichtbar, **C** induziert durch STxB-Bindung an Gb₃.

5 Diskussion

Shiga Toxin kann Clathrin-unabhängig über den retrograden Transportweg von der Plasmamembran zum endoplasmatischen Reticulum transportiert werden (10-14). Kürzlich wurde ein neuer Clathrin-unabhängiger Endozytoseweg für STxB beschrieben, bei dem tubuläre Membraninvaginationen beobachtet wurden (16). Nach ATP-Verarmung in Zellen und nach Inhibition der Dynamin- und Aktinfunktion stieg die Häufigkeit der beobachteten STxB-Einstülpungen. Römer et al. (16) schlussfolgerten, dass aktive zelluläre Prozesse unnötig für die Ausbildung der tubulären Strukturen sind und machen dynamisches Clustering des STxB-Gb₃-Komplexes für die Bildung von Invaginationen verantwortlich. Sie untersuchten außerdem die Bindung von STxB an Gb₃-haltige *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) und konnten ebenfalls die Induzierung von Membraninvaginationen durch die Proteinbindung beobachten (siehe Kapitel 1.4). Vor der Bildung von Invaginationen visualisierten sie Regionen intensiver STxB-Fluoreszenz, was auf die Ausbildung von STxB-Clustern hinweist. Die Bildung der Invaginationen geht vermutlich mit einer Reorganisation der Lipide einher, was aus Zellexperimenten mit dem polarisationssensitiven Membranfarbstoff Laurdan abgeleitet wurde (16, 17).

Um die laterale Organisation von membrangebundenem STxB zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung von STxB an artifizielle Gb₃-haltige Lipidmembranen mittels hochauflösender Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Von Interesse waren dabei die Untersuchung einer möglichen Clusterbildung von STxB auf planaren Membranen, sowie die Organisation der Lipide innerhalb der Membran vor und nach Proteinbindung. Es wurden Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet. Insbesondere wurde die molekulare Struktur des Rezeptorlipids Gb₃ variiert, so dass der Einfluss verschiedener Gb₃-Lipide auf die Proteinbindung und auf die Organisation der Membran untersucht werden konnte.

5.1 Charakterisierung von Lipiddoppelschichten mit immobilisiertem nativen Gb₃ vor Proteinzugabe

Vor Inkubation der Lipiddoppelschichten mit Protein wurden diese zunächst mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie charakterisiert. In Membranen, zusammengesetzt aus DOPC/Gb₃ (95:5) bzw. DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5), konnte eine homogene Verteilung der Fluorophore Perylen, Bodipy-PC bzw. Texas Red DHPE, sowie eine planare Membranoberfläche ohne topographische Strukturunterschiede, beobachtet werden (Abb. 4-14/4-26). Eine beobachtbare Phasenseparation der Lipide tritt also nicht auf, was auf eine homogene Verteilung der Lipide innerhalb der Doppelschicht hindeutet. DOPC ist ein typisches ungesättigtes Lipid und wird daher häufig in artifiziellen Membransystemen als fluides Lipid verwendet. In manchen Studien wird anstelle von DOPC 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) verwendet, ein Lipid welches ein ähnliches Phasenverhalten wie DOPC besitzt. Studien mit DOPC bzw. POPC sind gut vergleichbar (98). Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen reiner POPC-Lipiddoppelschichten immobilisiert auf einem Festkörper weisen keine topographischen Strukturen auf (99, 100). Die Addition von 5 mol% G_{M1} zu diesen fluiden Membranen führt zur Bildung von 1-2,5 nm hohen G_{M1}-Clustern (99, 101). G_{M1} ist wie Gb₃ ein Glycosphingolipid, dessen Lokalisation in *rafts* diskutiert wird (27). G_{M1} gilt als spezifischer Bindungspartner für Cholera Toxin (CTxB) (102). Das System CTxB-G_{M1} lässt sich mit CTxB-Gb₃ vergleichen, da sowohl die Protein- als auch die Lipidstrukturen Ähnlichkeiten aufweisen. Die Verteilung von Gb₃ in planaren Membransystemen wurde bislang nicht untersucht. Im Unterschied zu G_{M1} in POPC-Membranen, konnten in dieser Arbeit keine Gb₃-Cluster in DOPC-Membranen mittels SFM-Messungen beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, dass G_{M1} eine größere Kopfgruppe als Gb₃ besitzt oder dass sich die Zusammensetzung der Fettsäuren der Glycolipide unterscheidet. So enthalten 86 % des aus Rindergewebe isoliertem G_{M1} Stearinsäure (C18:0) (Matreya, Pleasant Gap, PA, USA). Eine fluoreszenzmikroskopische Studie an Lipiddoppelschichten, die aus POPC und 25-50 mol% Cholesterin zusammengesetzt sind, deuten auf eine Gleichverteilung der Lipide hin (103). Dies stimmt gut mit den hier untersuchten DOPC/Cholesterin/Gb₃-Membranen

überein, bei denen ebenfalls keine Phasenseparation der Lipide beobachtet wurde. Gb₃-Clustering tritt analog zur DOPC/Gb₃-Membran ebenfalls nicht auf.

In den SFM-Abbildungen der in dieser Arbeit untersuchten Lipiddoppelschichten, können zum Teil Defekte, welche meist ca. 5 nm tief sind, beobachtet werden (Abb. 4-17). Die detektierte Höhe entspricht dabei in etwa der Dicke der immobilisierten Membranen. Die Höhe einer planaren DOPC-Membran immobilisiert auf Glimmer liegt typischerweise bei ca. 5,5 nm (104), welche gut mit dem hier erhaltenen Wert für die Membrandicke übereinstimmt.

Cholesterin als Regulator der Membranfluidität wirkt in fluiden Membransystemen stabilisierend, indem es die Rotationsfreiheit benachbarter Kohlenwasserstoffketten einschränkt (37, 41, 103). Es ist daher davon auszugehen, dass DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen rigider als DOPC/Gb₃-Membranen sind, was sich beim Abbilden der Doppelschichten mit dem Rasterkraftmikroskop bemerkbar machte. So wurde u. a. die Proteinstruktur auf DOPC/Gb₃-Membranen zum Teil schlecht abgebildet, da diese sehr fluiden Membranen durch auf die Probe wirkende Kräfte leicht manipuliert werden, so dass topographische Strukturen fälschlicherweise planar erscheinen können.

Die Lipidorganisation in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen unterscheidet sich stark von den zuvor diskutierten Lipiddoppelschichten. Mittels Rasterkraftmikroskopie konnte eine topographische Struktur mit einem Höhenunterschied von 0,5-0,7 nm abgebildet werden, die auf eine Phasenseparation der Lipide schließen lässt. Die Höhendifferenz der Lipidphasen auf *Mica* (0,5 nm) ist ähnlich der auf Silizium (0,7 nm). Die tiefer liegenden Bereiche werden der *liquid-disordered* (*l_d*) und die höher liegenden der *liquid-ordered* (*l_o*) Phase zugeordnet (Abb. 4-3). Die *l_o*-Phase ist typischerweise mit Sphingomyelin und Cholesterin angereichert (44) und weist aufgrund dichter Packung der Lipide eine größere Membrandicke auf (93). Die gewählte *raft*-ähnliche Lipidmischung soll die Zusammensetzung der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran imitieren. Das *raft*-Konzept postuliert die Existenz von *l_o*-Domänen *in vivo*, wobei diese bislang noch nicht in lebenden Zellen nachgewiesen werden konnten (siehe Kapitel 1.3). Die beobachtete *l_d/l_o*-Phasenseparation stimmt gut mit dem von Veatch & Keller beschriebenen Phasendiagramm für DOPC-, Sphingomyelin- und Cholesterin-Mischungen überein (Abb. 5-1) (105). Es wurde durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an GUVs bei 25° ermittelt. Das ternäre Phasendiagramm weist bei einem Lipidverhältnis von

DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin zu 40:40:20 ein Phasenkoexistenzgebiet einer fluiden (l_d -) und einer flüssig-geordneten (l_o -) Phase auf (Abb. 5-1, rotes Kreuz).

Die detektierte Höhendifferenz von 0,5-0,7 nm zwischen l_d - und l_o -Phase stimmt gut mit der Höhendifferenz überein, die andere Arbeitsgruppen mittels SFM-Messungen an Lipiddoppelschichten bestehend aus DOPC, Sphingomyelin und Cholesterin erhalten haben (93, 106, 107). Die l_o -Phase ist dabei 0,7-1 nm höher als die l_d -Phase.

In topographischen SFM-Aufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (45:35:20) ist ebenfalls eine Phasenseparation der Lipide zu beobachten. Der Höhenunterschied zwischen der l_d - und der l_o -Phase beträgt 0,4 nm (Abb. 4-1). Addition von 5 mol % Gb₃ zu diesen Membranen führte im Rahmen des Fehlers nicht zu einer Änderung der Höhendifferenz zwischen beiden Lipidphasen (0,5 nm auf *Mica*).

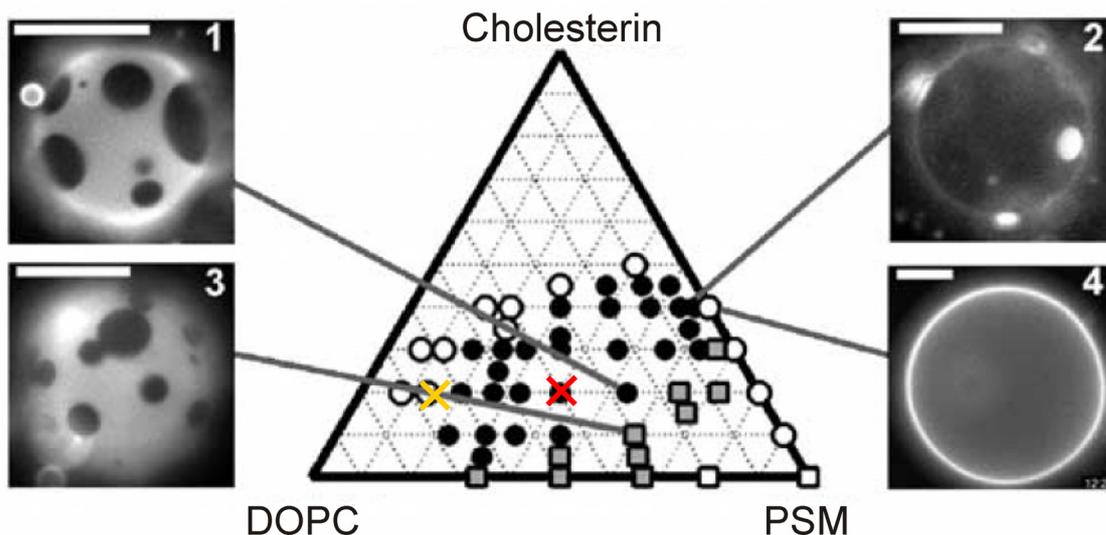


Abb. 5-1: Phasendiagramm ermittelt aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an GUVs, zusammengesetzt aus DOPC, PSM (Palmitoyl-Sphingomyelin,16:0SM) und Cholesterin, dotiert mit Texas Red DPPE, bei 25 °C. Weiße Symbole kennzeichnen die Existenz einer homogenen Phase, entweder der fluiden Phase L_α (Kreis, entspricht l_d -Phase) oder der Gelphase S_0 (Quadrat). Schwarze Kreise kennzeichnen die Koexistenz von l_d - und l_o -Phase, graue Quadrate die Koexistenz von S_0 und L_α . Das rote Kreuz markiert ein Lipidverhältnis von DOPC/PSM/Cholesterin zu 40:40:20, das gelbe Kreuz eines von 65:15:20.

Die Lokalisation von Gb₃ in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃-Membranen ist nicht bekannt, es wird allerdings eine Anreicherung von Globotriaosylceramid in der l_o -Phase vermutet, da sich Glycosphingolipide grundsätzlich auf Grund ihres Ceramidgrundgerüsts

dicht gepackt in der l_o -Phase anordnen (108). So konnte z. B. die Lokalisation des Glycolipids G_{M1} in der l_o -Phase von Lipidmono- und Lipiddoppelschichten, bestehend aus POPC bzw. DOPC, Sphingomyelin und Cholesterin, beobachtet werden (109-111). Die Lokalisation von Gb_3 in detergensresistenten Membranen (DRMs) lässt ebenfalls eine Anreicherung des Glykolipids in der l_o -Phase vermuten (22, 23). Die Fettsäuren der Lipide dürfen bei Betrachtung der Glycolipidverteilung in Membranen allerdings nicht vernachlässigt werden. Doppelbindungen in Fettsäuren können eine dichte Anordnung der Alkylketten der Lipide verhindern (44), weshalb Lipide ungesättigten Fettsäuren tendenziell weniger in der l_o -Phase angereichert sind. Da 30 % des nativen Gb_3 aus ungesättigten Fettsäuren aufgebaut ist, bleibt die Lokalisation von Gb_3 in der l_o -Phase nicht endgültig geklärt.

Die Existenz einer l_d/l_o -Phasenseparation in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5) konnte auch mittels Fluoreszenzmikroskopie, durch Markierung der l_o -Phase mit Perylen bzw. der l_d -Phase mit Texas Red DHPE, beobachtet werden (Abb. 4-7 **A/B**). Die Anreicherung von Texas Red DHPE in flüssig-ungeordneten Membranbereichen ist gut untersucht und eindeutig (61). Die Anreicherung von Perylen in der l_o -Phase ist dagegen nicht eindeutig. Es wurde zwar berichtet, dass Perylen in ternären Mischungen bestehend aus DOPC, Cholesterin und *egg*-Sphingomyelin in der l_o -Phase angereichert ist (62), allerdings zeigten Baumgart et al. (63) eine Gleichverteilung des Fluorophors in ternären Mischungen, welche *brain*-Sphingomyelin enthielten. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden zwar mit *brain*-Sphingomyelin durchgeführt, zeigten aber dennoch eine eindeutige, bevorzugte Lokalisation von Perylen in der l_o -Phase vor Proteinzugabe, was durch Überlagerung der Perylen- und Texas Red DHPE-Fluoreszenzbilder gut zu erkennen ist (Abb. 4-7 **A-C**).

Im Rahmen einer Diplomarbeit (Theresa Kaufeld, Universität Göttingen, 2008) konnte die Mobilität der Lipide in DOPC/Cholesterin/ Gb_3 (65:30:5)- und DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten dotiert mit 0,2 mol% Bodipy-PC verglichen werden. Mittels *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) wurden die Diffusionskoeffizienten von auf Silizium immobilisierten Membranen bestimmt. Bei dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Membranen durch einen kurzen Laserpuls gebleicht, so dass der Fluorophor lokal zerstört wird und ein Bleichfleck entsteht. Durch Diffusion der Lipide steigt an dieser Stelle die Intensität der Fluoreszenz kontinuierlich mit

der Zeit an. Daraus lässt sich die Diffusionskonstante des Fluorophors berechnen, welche sich auf die markierte Lipidphase übertragen lässt (112). Der Diffusionskoeffizient der Lipide, welche sich alle im Zustand der l_d -Phase befinden (homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz), betrug in DOPC/Cholesterin/Gb₃-Membranen $4,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\pm 1,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $n = 20$). Die Diffusion derjenigen Lipide, die sich in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃-Membranen in der l_d -Phase befinden, war deutlich geringer. Ein Wert für den Diffusionskoeffizienten konnte allerdings mit dem Messaufbau nicht bestimmt werden, da die Diffusion zu langsam für eine Bestimmung war ($< 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Die laterale Mobilität der Lipide in DOPC/Cholesterin/Gb₃-Membranen ist höher, was durch eine weniger dichte Anordnung der Lipide verursacht sein könnte. Es wäre denkbar, dass die laterale Membranspannung in DOPC/Cholesterin/Gb₃-Membranen deshalb geringer ist. Bei Experimenten von Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche bestimmt die Packung der Lipide die Membranspannung (entspricht dem Oberflächendruck), wobei eine dichtere Lipidpackung einer höheren Membranspannung entspricht. In Lipiddoppelschichten ist die Membranspannung allerdings schwierig zu bestimmen. Der Zusammenhang zwischen lateraler Mobilität und Membranspannung lässt sich nur indirekt ableiten. Die Überlegungen bezüglich der lateralen Membranspannung bei verschiedenen Lipidmischungen werden später aufgegriffen, um ein Modell der Bindung von STxB an Gb₃-haltige Membranen aufzustellen.

Die Diffusion von fluiden Lipiden in DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen immobilisiert auf Silizium wurde außerdem mit der Diffusion gleicher Membranen immobilisiert auf *Mica* mittels FRAP-Messungen verglichen (Diplomarbeit von Theresa Kaufeld, Universität Göttingen, 2008). Die Diffusion der Lipide auf dem Substrat *Mica* war geringer als bei Lipiden auf Silizium. Der Diffusionskoeffizient lag unterhalb von $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und konnte mit dem Messaufbau nicht bestimmt werden. Die Experimente machen deutlich, dass die laterale Mobilität der Lipide innerhalb einer auf Silizium präparierten Doppelschicht höher ist als bei Membranen auf *Mica*. Unterschiede in den Materialeigenschaften der Substrate können somit die laterale Diffusion in Membranen verändern.

Unterschiedliche Materialeigenschaften der Substrate machten sich auch bei der Untersuchung der unspezifischen Bindung des STxB an Lipiddoppelschichten bemerkbar. Bei allen in dieser Arbeit auf *Mica* immobilisierten Lipiddoppelschichten konnte eine

unspezifische Einlagerung von STxB-wt bzw. STxB-W34A in Membrandefekten beobachtet werden. Vor allem in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen traten, durch unspezifische Wechselwirkung bis zu 20 µm große Strukturen gehäuft auf. Dies lässt vermuten, dass diese Lipiddoppelschichten instabiler sind, und somit bereits vor Proteinzugabe viele defekte Bereiche aufweisen. Die unspezifische Bindung von STxB ist auf die Wechselwirkung mit *Mica* zurückzuführen. Mittels fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen konnte eine Adsorption von STxB an *Mica*-, nicht aber an Siliziumoberflächen, beobachtet werden. Eine unspezifische Adsorption von Proteinen auf *Mica* ist nicht ungewöhnlich und wurde unter anderem auch bei Cholera Toxin (CTxB), welches STxB strukturell sehr ähnliches ist, beobachtet (100). CTxB lässt sich deshalb als Marker für Membrandefekte einsetzen, um die Vollständigkeit der Ausbildung von auf Glimmer immobilisierten Lipiddoppelschichten zu überprüfen (113). Das Siliziumsubstrat besitzt im Vergleich zu Glimmer eine geringere negative Oberflächenladung (114), was vermutlich der Grund ist, weshalb STxB nicht an die Siliziumoberfläche adsorbiert.

5.2 Bildung von STxB-Clustern durch Bindung an Gb₃ (nativ)-haltige Lipiddoppelschichten

Die laterale Organisation von STxB, gebunden an Gb₃-haltige Membranen, wurde in dieser Arbeit detailliert charakterisiert. Hochauflösende rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen mit gebundenem STxB visualisieren deutlich die Bildung von 2,2 nm hohen Proteinclustern, welche auf der *l_o*-Phase der Membran lokalisiert sind (Abb. 4-4). Dies lässt darauf schließen, dass nach Proteinbindung Gb₃ innerhalb der *l_o*-Phase lokalisiert ist. In biologischen Membranen wird eine Anreicherung von STxB und Gb₃ in Membranmikrodomänen, sogenannten *rafts*, die sich im Zustand der *l_o*-Phase befinden, vermutet. Die Detektion von STxB und Gb₃ in detergensresistenten Membranen (19-21), sowie die Kollokalisierung von STxB mit dem *raft*-Marker CTxB (24) weisen auf eine Anreicherung beider Komponenten in *l_o*-Domänen hin.

STxB-Cluster wurden auch auf DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)- und DOPC/Gb₃ (95:5)-Membranen beobachtet. Im Falle der cholesterinhaltigen Membran wurde die Höhe mittels SFM-Aufnahmen zu 2,2 nm bestimmt (Abb. 4-15). Die STxB-Cluster sind bei Membranen ohne Sphingomyelin nicht in bestimmten Phasen lokalisiert, da diese keine l_d/l_o -Phasenseparation aufweisen. Wang et al. (100) untersuchten mittels Rasterkraftmikroskopie die laterale Organisation des dem STxB strukturell ähnlichen Cholera Toxins (B-Untereinheit, CTxB) gebunden an G_{M1}-haltige Lipiddoppelschichten. Es konnten gut definierte, geordnete Proteinaggregate mit Größen im Nanometerbereich beobachtet werden. Die aus der Kristallstruktur abgeleitete Höhe des STxB beträgt 2 nm (4, 6), welche etwas niedriger als die mit der Rasterkraftmikroskopie bestimmte Höhe ist. Allgemein sind Proteinhöhen, die mittels rasterkraftmikroskopischer Abbildung ermittelt wurden, auf Grund der applizierten Kraft des *cantilevers* auf die Probe und einer nicht perfekten Proteinpackung häufig unterbestimmt (81). Man kann vermuten, dass die um etwa 10 % größere Proteinhöhe das Resultat einer erhöhten Membrandicke, induziert durch die Bindung von STxB, ist. Dies kann auf eine Anreicherung von Gb₃-Lipiden unterhalb des gebundenen STxB zurückgeführt werden, die im Vergleich zu anderen Lipiden der Membran eine große, hydrophile Kopfgruppe und lange Fettsäureketten besitzen.

Die Bedeutung der Gb₃-Bindungsstellen von STxB für die Clusterbildung des membrangebundenem Proteins konnte durch die Bindung der Mutante STxB-W34A an DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen spezifiziert werden. Das Monomer STxB-W34A besitzt nur zwei (*Site I* und *II*) statt drei Bindungsstellen für Gb₃ (1, 7). Das Pentamer des STxB-W34A kann folglich maximal 10 Gb₃-Moleküle binden. Für die dritte Bindungsstelle (*Site III*) sind hydrophobe Stapelwechselwirkungen des Tryptophanrestes 34 (W34) mit Gb₃ verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit zeigen SFM-Aufnahmen von membrangebundenem STxB-W34A die Bildung von Proteinclustern, die in ihrer Form und Verteilung denen des STxB-wt ähnlich sind. Sie weisen allerdings eine auffällig niedrigere Höhe von 1,6 nm auf (Abb. 4-19). Aus der ermittelten Höhe der STxB-W34A-Cluster lässt sich ableiten, dass die Bindung zwischen STxB-W34A und Gb₃ nicht zu einer ausreichenden Anreicherung der Gb₃-Lipide unterhalb des Proteins führt, die die Membrandicke in diesen Bereichen erhöht. Eine Erhöhung der Membrandicke induziert durch die STxB-Bindung scheint somit von der Wechselwirkung des Proteins an *Site III* mit Gb₃ abhängig zu sein.

Bast et al. (115) analysierten die Bindungseigenschaften und die Zytotoxizität von STxB-Mutanten, bei denen jeweils die Funktion der einzelnen Bindungsstellen selektiv blockiert wurden. Es wurden die Bindungskurven von radioaktiv markiertem STxB-wt (Wildtyp) und den STxB-Mutanten mit Gb₃, das in Anwesenheit von Phosphatidylcholin/Cholesterin auf einer Mikrotiterplattenoberfläche immobilisiert war, ermittelt. Daraus bestimmten sie die Dissoziationskonstanten K_d sowie die Bindungskapazität. Die Dissoziationskonstante K_d beschreibt die Bindungsaffinität und ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen zwei Bindungspartnern. Die Bindungskapazität gibt an wie viele Gb₃-Moleküle ein STxB binden kann. Die Dissoziationskonstante von STxB-wt wurde zu $(4,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$ M bestimmt, die von STxB-D17E (*Site I* wird blockiert) zu $(13 \pm 0,8) \cdot 10^{-8}$ M und von STxB-W34A zu $(3,3 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$ M. Während die Substitution der Asparaginsäure (D17) zu einer 2,8-fache Erniedrigung der Bindungsaffinität von STxB zu Gb₃ führte, bewirkte die Substitution von Alanin (W34) keine signifikante Änderung der Bindungsaffinität. Die Mutation an *Site I* und *Site II* führten außerdem zu einer deutlichen Reduktion der Zytotoxizität in Vero und MRC-5-Zellen. Die Bindungskapazität von STxB-D17E und STB-W34A wurde jeweils auf ca. 50 % und 25 % von der für STxB-wt bestimmten Kapazität reduziert (STxB-wt: $(16 \pm 0,8) \cdot 10^{-9}$ M, STxB-D17E: $(8,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$ M, STxB-W34A: $(4,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-9}$ M). Die dritte Bindungsstelle scheint für die Erkennung von zusätzlichen Gb₃-Rezeptoren verantwortlich zu sein, allerdings mit einer niedrigeren Affinität für Gb₃ (115).

Ling et al. (1) vermuten darüber hinaus, dass durch die Rekrutierung von mehreren Gb₃-Molekülen unter das Shiga Toxin auf Grund der Bindung von Gb₃ an *Site III*, eine lokale Anreicherung der Glycolipide zu einer Erhöhung der Membrandicke durch Bildung von Gb₃-Clustern führen könnte. Dies korreliert gut mit der in dieser Arbeit erhaltenen Höhe der STxB-W34A-Cluster, da die Bindung von STxB-W34A an Gb₃-haltige Membranen nicht zu einer Erhöhung der Membrandicke unterhalb der Proteincluster führt. Untersuchungen der spezifischen Bindung des Antikörpers anti-Gb₃ an Gb₃ mit DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen zeigen bezüglich der lateralen Organisation des anti-Gb₃ deutliche Unterschiede zu STxB. Die beobachteten anti-Gb₃-Cluster unterscheiden sich in Form und Höhe erheblich von den STxB-Clustern (Abb. 4-20). Der monoklonale Antikörper anti-Gb₃ ist ein Immunglobulin M (IgM) und liegt somit als Pentamer vor. Ein Immunglobulin M besitzt zehn Bindungsstellen (37). Anti-Gb₃ besitzt

somit wie STxB die Fähigkeit mehrere Gb₃-Moleküle zu binden. Die strukturelle Spezifität der beobachteten STxB-Cluster wird durch Vergleich mit den anti-Gb₃-Clustern ersichtlich. Eine Bedeutung der lateralen Aggregation der Proteine für anschließend ablaufende Prozesse in Zellen wäre denkbar. So konnte eine von anti-Gb₃ und Shiga Toxin induzierte Apoptose in Burkitt-Lymphom-Zellen beobachtet werden, allerdings zeigten die Untersuchungen, dass die verschiedenen Proteine unterschiedliche apoptotisch bedingte Transportwege auslösen (116). Außerdem führte die Bindung des Antikörpers anti-Gb₃ an GUVs, bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5), im Gegensatz zu gebundenem STxB nicht zur Ausbildung von Invaginationen (16). Die Anwesenheit mehrerer Bindungsstellen, die eine Reorganisation von Gb₃ ermöglichen könnte, resultiert bei Bindung von anti-Gb₃ nicht in der Bildung von Membrandeformationen. Die beobachteten STxB-Cluster sind somit für die Funktion des Proteins, Invaginationen zu erzeugen, spezifisch.

5.3 STxB-induzierte Lipidreorganisation in Gb₃ (nativ)-haltigen Lipiddoppelschichten

Der durch die STxB-Bindung induzierte Anstieg der Membrandicke muss nicht nur aus einer Anreicherung der Gb₃-Lipide unterhalb des Proteins resultieren. Eine höhere Lipidpackungsdichte würde ebenfalls zu einer Erhöhung der Membrandicke beitragen. Eine dichtere Anordnung der Lipide induziert durch die Bindung von STxB an Gb₃, kann aus der resultierenden Umverteilung des Fluorophors Perylen von der *l*₀- in die *l*_d-Phase durch STxB-Bindung an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Membranen postuliert werden (Abb. 4-7). Experimente an der Wasser-Luft-Grenzfläche zeigten, dass die Verteilung des Perylens von der Lipidpackung abhängig ist. Grundsätzlich erhöht sich die Packungsdichte der Lipide in Monoschichten mit wachsendem Lateraldruck (117). In Lipidmonoschichten, bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen, war der Fluorophor unterhalb eines Oberflächendruckes von 10 mN/m überwiegend in der *l*₀-Phase lokalisiert. Oberhalb eines Oberflächendruckes von 20 mN/m wurde Perylen dagegen bevorzugt in der *l*_d-Phase angereichert (Abb. 4-40). Obwohl die aus Monoschichten erhaltenen Resultate nicht ohne Weiteres auf Experimente

mit Lipiddoppelschichten übertragen werden können (118), zeigt das Resultat, dass die Lipidpackung einen deutlichen Einfluss auf die Verteilung des Perylens in planaren Lipidschichten hat. In Übereinstimmung mit der ermittelten Höhe der STxB-Cluster, kann die Bindung von STxB an Gb₃-haltige Membranen nicht nur zu einer Anreicherung von Gb₃ unterhalb der Proteincluster, sondern auch zur Bildung von dicht gepackten STxB-Gb₃-Cluster in der *l*₀-Phase führen. In diesen Bereichen der Membran steigt die Packungsdichte der Lipide (nicht nur die der Gb₃-Moleküle), was in Lipiddoppelschichten zu einer Umverteilung von Perylen in die *l*_d-Phase führt. In Messungen mit dem polarisationssensitiven Farbstoffes Laurdan, konnte nach Inkubation von energieverarmten Zellen mit STxB ebenfalls eine Erhöhung der Membranordnung in Bereichen mit gebundenem Protein beobachtet werden, was mit einer höheren Packungsdichte der Lipide erklärt werden könnte (16). Eine Reorganisation von Membranlipiden durch Bindung von STxB kann auch durch die von Falguières et al. (20) beobachtete verstärkte Rekrutierung von Gb₃ zu DRMs nach STxB-Bindung abgeleitet werden. Nach Inkubation von energieverarmten Zellen mit STxB-W34A konnte mittels Laurdan kein Anstieg der Membranordnung beobachtet werden (16). Dies bestärkt die Vermutung, dass die Bindung von STxB-W34A an Gb₃ nicht zu einer erhöhten Membrandicke unterhalb der Proteincluster und somit nicht zu einer Erhöhung der Lipidpackungsdichte führt.

Die beschriebene, durch STxB-Bindung induzierte Reorganisation der Lipide innerhalb von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃-Lipiddoppelschichten konnte mittels Pixelanalysen näher spezifiziert werden. So stiegen nach STxB-Bindung der Flächenanteil der *l*_d-Phase, sowie die Circularität der *l*_d-Domänen (Abb. 4-8). Die angenommene Erhöhung der Lipidpackung durch Bildung von STxB-Gb₃-Cluster in *l*₀-Bereichen würde die Gesamtfläche der *l*₀-Phase verringern, was gut mit der ermittelten Erhöhung des Flächenanteils der *l*_d-Phase nach STxB-Bindung übereinstimmt. Trotz des vermutlich gestiegenen Flächenbedarfs eines Lipids in der *l*_d-Phase nach STxB-Bindung an Gb₃ in der *l*₀-Phase, wird die laterale Beweglichkeit der *l*_d-Lipide jedoch nicht durch die Proteinbindung beeinflusst. Dies konnte im Rahmen einer Diplomarbeit (Theresa Kaufeld, Universität Göttingen, 2008) aus *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP)-Experimenten gezeigt werden, in denen die Mobilität der Lipide von DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen vor und nach Inkubation mit STxB ermittelt wurde. Die Messungen wurden an auf Silizium präparierten Lipiddoppelschichten, welche mit

0,2 mol% Bodipy-PC markiert waren, durchgeführt. Die laterale Diffusion der Lipide, die alle im fluiden Zustand (l_d -Phase) sind, wird bestimmt, da Bodipy-PC fluide Bereiche von Membranen markiert (38). Der Diffusionskoeffizient wurde vor Proteinzugabe zu $4,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\pm 1,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $n = 30$) und nach Inkubation der Membran mit STxB zu $4,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\pm 1,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $n = 30$) bestimmt. Demnach bleibt die laterale Diffusion der Lipide im fluiden Zustand (nur l_d -Phase existent) durch die Proteinbindung unbeeinflusst.

Der leichte Anstieg der Circularität der l_d -Domänen in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 -Lipiddoppelschichten nach STxB-Bindung kann durch einen Anstieg der Linienspannung, die an der Grenzfläche zwischen Domänen und umgebender Membran herrscht, erklärt werden. Die Linienspannung steigt mit dem Höhenunterschied zwischen Domäne und Umgebung, was ebenfalls für eine Erhöhung der Membrandicke unterhalb der STxB-Cluster spricht (siehe auch Kapitel 1-5). Garcia-Sáez et al. (60) konnten kürzlich in Experimenten mit festkörperunterstützten Membranen zeigen, dass die Erhöhung der Linienspannung zu einer Erhöhung der Circularität von Lipiddomänen führt, da dadurch der Domänenumfang und damit die Linienenergie sinkt. Sie modifizierten in Lipiddoppelschichten mit koexistierenden l_d - und l_o -Phasen die Höhendifferenz zwischen beiden Phasen („*hydrophobic mismatch*“), indem sie Phosphatidylcholine mit unterschiedlich langen Fettsäureketten verwendeten. Mit steigendem „*hydrophobic mismatch*“ wächst die Linienspannung, die die Verteilung der Domänengröße und deren Circularität bestimmt. Mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie bestimmten sie die Höhenunterschiede der l_o -Domänen zur Umgebung und die Domänengröße.

5.4 STxB-induzierte Lipidreorganisation und Phasenseparation in Gb_3 (nativ)-haltigen Lipidmonoschichten

Da die Mobilität von Membran- und Proteindomänen auf festen Oberflächen im Allgemeinen relativ niedrig sind, wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein dynamischeres System benutzt, um Veränderungen in Lipidschichten auf einer kleineren Zeitskala zu visualisieren. Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche sind deshalb gut geeignet, um Lipidreorganisation und Änderungen der Lipidpackungsdichte zu beobachten. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidmonoschichten

zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) zeigen zwischen 5 und 30 mN/m die Koexistenz von *l_d*- und *l_o*-Phase (Abb. 4-40), was mit der beobachteten Phasenseparation in analogen Lipiddoppelschicht-Experimenten und dem entsprechenden ternären Phasendiagramm (Abb. 5-1, rotes Kreuz) übereinstimmt (105). Der Verlauf der ermittelten Isotherme (Abb. 4-39), ähnelt dem einer von Yuan et al. (111) bestimmten Isotherme einer Mischung bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin mit 5 mol% G_{M1}. Sie konnten außerdem die Lokalisation von G_{M1} in der *l_o*-Phase detektieren. Die *l_d/l_o*-Phasenseparation in DOPC bzw. POPC/Sphingomyelin/Cholesterin-Monoschichten wurde bereits gut untersucht (96, 97, 119).

Bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m wurde die Monoschicht mit STxB inkubiert und Veränderungen der Domänen über 60 Minuten beobachtet (Abb. 4-41). STxB ist nach Bindung an Gb₃ in der *l_o*-Phase lokalisiert. Die Bindung führt zu einer Reorganisation der Lipide, was aus der Veränderung der Domänenform sowie aus der Entstehung einer dritten Lipidphase (dritte Stufe der Fluoreszenzintensität) innerhalb der *l_o*-Phase, abgeleitet werden konnte. Diese Phase ist durch die Bildung von STxB-Gb₃-Cluster wahrscheinlich mit Gb₃ angereichert. Durch Pixelanalyse konnten die Beobachtungen in der Monoschicht detaillierter beschrieben werden. Der nach 30 Minuten beobachtete Anstieg der Zahl der Domänen, deren Fläche kleiner 1000 μm² ist, kann auf die Entstehung neuer *l_o*-Domänen zurückgeführt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass STxB eine dichtere Lipidpackung durch die Bildung einer kondensierten Phase induzieren kann. Dies korreliert mit der vermuteten Erhöhung der Lipidpackung, welche aus Experimenten mit Gb₃-haltigen Lipiddoppelschichten abgeleitet wurde. Bei diesen führte die Proteinbindung zur Erhöhung der Membrandicke sowie zur Umverteilung von Perylen. 60 Minuten nach STxB-Zugabe zu Lipidmonoschichten führt eine Reorganisation der Domänen zu einer geringeren Anzahl von *l_o*-Domänen, die kleiner als 1000 μm² sind, da diese zu größeren Domänen fusionieren.

Ein weiteres Experiment an Lipidmonoschichten sollte die Annahme, dass STxB Phasenseparation induziert, festigen. Das Verhältnis der Lipide in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5)-Monoschichten wurde so gewählt, dass bei einem Oberflächendruck von 30 mN/m eine homogene Membranfluoreszenz ohne Koexistenz von Lipidphasen zu beobachten ist (Abb. 4-44). Das in Abbildung 5-1 gezeigte Phasendiagramm (gelbes Kreuz) macht deutlich, dass die Lipide in der *l_d*-Phase sind und

die gewählte Lipidmischung sich in der Nähe des l_o/l_d -Koexistenzbereiches befindet (105). 60 Minuten nach Inkubation der Monoschicht mit STxB konnte eindeutig die Induzierung einer Lipidphasenseparation beobachtet werden. Da der Fluorophor Bodipy-PC aus bestimmten Bereichen der Membran ausgeschlossen wurde, lässt sich eine höhere Packung der Lipide in diesen Bereichen ableiten. Die Anreicherung von STxB in diesen Regionen lässt eine Bildung von STxB-Gb₃-Cluster vermuten. Diese führen zu einer erhöhten Lipidpackungsdichte, was zur Entstehung von kondensierten Gb₃-reichen Domänen führt. Ein analoges Experiment an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5)-Lipiddoppelschichten wurde im Rahmen einer Diplomarbeit (Theresa Kaufeld, Universität Göttingen, 2008) durchgeführt. Hierbei konnte ebenfalls die Induzierung einer l_o -Phase, in einer vor Proteinzugabe homogenen Membran, durch Bindung von STxB an Gb₃ beobachtet werden. Hammond et al. (120) zeigten eine durch Cholera Toxin induzierte Phasenseparation bei Bindung an G_{M1}-haltige Modellmembranen. Die Experimente wurden an GUVs durchgeführt, die vor Proteinzugabe eine homogene Membranfluoreszenz aufwiesen. Die Bindung von Annexin A2, einem Protein das ebenfalls mit Endozytose in Verbindung gebracht wird, an negativ geladene Lipide in festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten führt ebenfalls zu einer Phasenseparation und Reorganisation der Lipide (81). So visualisierten Menke et al. (81) mittels Rasterkraftmikroskopie eine Verarmung von Phosphatidylserin-Domänen (negativ geladenes Lipid) in der näheren Umgebung von Annexin A2-Clustern, woraus sie die Rekrutierung von Phosphatidylserin unterhalb der Proteincluster, induziert durch die Proteinbindung, postulierten.

5.5 Einfluss der molekularen Struktur des Rezeptorlipids Gb₃ auf die STxB-Bindung

Die Charakterisierung der Bindung von STxB an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (nativ) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten lieferte wichtige Informationen über die laterale Organisation des Proteins und der Lipide. Die Bildung von STxB-Clustern, sowie eine Reorganisation der Lipide, die zu einer erhöhten Packungsdichte führen, konnten beobachtet werden. Es stellte sich die Frage, welche Funktion der Rezeptor Gb₃ auf die laterale Organisation der Proteincluster und die Reorganisation der Lipide hat. Auf molekularer Ebene sollte so insbesondere der Einfluss des Sättigungsgrades der Fettsäureketten des Gb₃ geklärt werden. Dazu wurden Lipiddoppelschichten bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (synthetisch) (40:35:20:5) mit Gb₃ (C22:0) bzw. Gb₃ (C22:1¹³) fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopisch untersucht.

Vor Proteinzugabe konnte in beiden Membranen eine l_d/l_o -Phasenseparation visualisiert werden (Abb. 4-30/4-34). Die in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen beobachteten tiefer liegenden l_d -Domänen weisen an der Grenzlinie im Vergleich zu analogen Membranen mit nativem Gb₃ keine so abrupte Höhenänderung zur Membranumgebung (l_o -Phase) auf (vgl. 4-9 A/B). Die Bereiche der Lipidphasen sind damit nicht so gut definiert, was eine geringere Entmischung der Lipide und damit eine weniger ausgeprägte Phasenseparation vermuten lässt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit Texas Red DHPE markierten Membranen (Abb. 4-33 B/4-36 B) zeigen im Vergleich zu Membranen mit nativem Gb₃ nicht so gut definierte Bereiche in denen der Fluorophor angereichert ist, was ebenfalls auf eine geringere Entmischung der Lipidphasen schließen lässt. Die Phasenseparation in Gb₃ (C22:0)-haltigen Lipiddoppelschichten scheint allerdings etwas stärker ausgeprägt zu sein als bei Gb₃ (C22:1¹³)-haltigen Membranen, da die im Texas Red DHPE-Fluoreszenzbild beobachteten l_d/l_o -Bereiche größer sind. Die Strukturen der Gb₃ (C22:1¹³)-haltigen Membranen, die auf eine Phasenseparation hindeuten, liegen allerdings nahe der Auflösungsgrenze des Fluoreszenzmikroskops.

Die Lokalisation der synthetischen Gb₃ kann nicht eindeutig geklärt werden, allerdings ist ein Unterschied in der Verteilung der beiden synthetischen Gb₃ denkbar, da der Einfluss von Lipidfettsäuren auf die Ausbildung und Anreicherung der l_o -Phase bekannt ist (44,

121). Doppelbindungen in Fettsäuren verhindern durch die Ausbildung einer Kinke eine dichte Anordnung der Alkylketten der Lipide (44), weshalb Lipide mit Doppelbindungen tendenziell weniger in der l_o -Phase angereichert sind. Die Rolle der Zuckerkopfgruppe der Gb₃-Moleküle bei der Anordnung der Lipide in Membranen darf allerdings bei diesen Überlegungen nicht vernachlässigt werden (44, 121). Eine Anreicherung von Gb₃ (C22:1¹³) in der l_d -Phase oder eine Gleichverteilung in beiden Phasen, sowie eine Anreicherung von Gb₃ (C22:0) in der l_o -Phase sind vorstellbar. Um die Lokalisation der Gb₃-Lipide in Membranen mit existierender Phasenseparation zu ermitteln, wäre es sinnvoll Experimente mit fluoreszenzmarkiertem Gb₃ durchzuführen.

Nach Inkubation der Membranen mit STxB konnte bezüglich der Anordnung des Proteins an der Membranoberfläche und der Organisation der Lipide ein Unterschied zwischen Gb₃ (C22:0)- und Gb₃ (C22:1¹³)-haltigen Membranen beobachtet werden. Rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Membranen mit immobilisiertem Gb₃ (C22:1¹³) zeigten eine nahezu komplette Belegung der Oberfläche mit gebundenem STxB (Abb. 4-31 **B/5-2 A**). Nimmt man die Existenz einer l_d/l_o -Phasenseparation nach STxB-Zugabe an, was Fluoreszenzaufnahmen von markierten Membranen vermuten lassen (Abb. 4-33 **D-F**), kann auf eine Gleichverteilung des STxB-Gb₃-Komplexes in beiden Phasen geschlossen werden. Eine Reorganisation der Lipide induziert durch Bindung von STxB konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht visualisiert werden. Diese kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, da die Beobachtung von Veränderungen in den Lipidphasen möglicherweise durch die Auflösung des Mikroskopes limitiert wurde.

Im Gegensatz dazu zeigen SFM- und Fluoreszenzaufnahmen von Membranen mit immobilisiertem Gb₃ (C22:0) eine Lokalisation von gebundenem STxB in der l_o -Phase (Abb. 4-34 **C/5-2 B**). Die Detektion von STxB in l_o -Bereichen, sowie die mit der Rasterkraftmikroskopie detektierten Höhenunterschiede zwischen STxB, l_o - und l_d -Phase, sind ähnlich den Resultaten von analogen Membranen mit nativem Gb₃. Dennoch ist STxB, das an Membranen mit nativem Gb₃ gebunden hat, in definierteren Bereichen der Oberfläche lokalisiert. Dies wird aus Fluoreszenzaufnahmen des Cy3-markierten Proteins ersichtlich, da die Proteindomänen größer sind als bei Gb₃ (C22:0)-haltigen Doppelschichten (Abb. 5-2 **B/C**). Ein stärkere Phasenseparation in Membranen kann die Höhendifferenz zwischen zwei Lipidphasen („*hydrophobic mismatch*“) ansteigen lassen, was die Bildung von größeren Domänen begünstigt (siehe Kapitel 5.6). Durch die

Beobachtung von größeren Proteindomänen in Gb₃ (nativ)-haltigen Membranen, kann deshalb eine stärkere Phasenseparation der Lipide gefolgert werden.

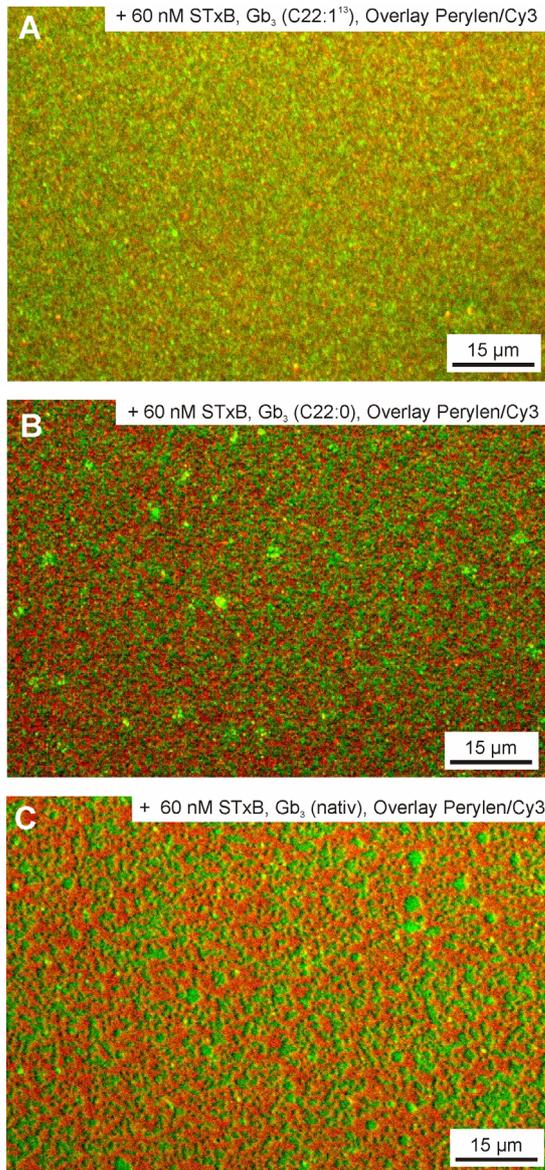


Abb. 5-2: Overlay-Fluoreszenzbilder von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃-Lipiddoppelschichten mit grüner Perylen- und roter STxB-Cy3-Fluoreszenz nach Proteinbindung. Die Bindung von STxB an **A** Gb₃ (C22:1¹³) führt zu einer nahezu kompletten Proteinbelegung **B** im Vergleich zu einer Lokalisation des Proteins in bestimmten Bereichen (*l_o*-Phase) bei Bindung an Gb₃ (C22:0)-haltige Membranen. **C** Gebunden an Gb₃ (nativ) können größere, gut definierte Proteindomänen beobachtet werden.

Eine Reorganisation der Lipide durch Bindung von STxB in Gb₃ (C22:0)-haltigen Doppelschichten konnte ebenfalls beobachtet werden (Abb. 4-36). Fluoreszenzaufnahmen von Texas Red DHPE-markierten Membranen machen dies deutlich. Die phasenseparierten Bereiche werden größer und die markierten Domänen weisen einen stärkeren Kontrast zur Umgebung auf. Daraus kann eine Verstärkung der *l_d/l_o*-Phasenseparation durch die STxB-Bindung abgeleitet werden.

Die im Gegensatz zu Gb₃ (C22:1¹³)-haltigen Lipiddoppelschichten beobachtete STxB-Clusterbildung in der l_o-Phase und die induzierte Reorganisation der Lipide in Gb₃ (C22:0)-haltigen Membranen, zeigt sehr deutlich den Einfluss der Lipidfettsäure auf die Organisation des STxB-Gb₃-Komplexes innerhalb der Membran. Doppelbindungen der Fettsäuren führen dazu, dass sich Gb₃-Moleküle durch STxB-Bindung innerhalb der Membran schlechter in einen geordneten Zustand überführen lassen. Die Ausbildung einer Kinke an der Doppelbindung erschwert eine dicht gepackte Anordnung der Gb₃-Moleküle innerhalb der Membran (122). Bereits Nyholm vermutete einen Einfluss der Fettsäureanordnung von Glycolipiden in der Membran auf die Konformation und Höhe der Gb₃-Zuckerkopfgruppe an der Membranoberfläche, was sich letztlich auf die STxB-Bindung auswirken kann, da die Zuckerreste für die Bindung verantwortlich sind (33). Mittels Molekular-Design (engl. *molecular modeling*) untersuchten sie den Einfluss der Hydroxylgruppen des terminalen Galactoserestes von Gb₃ auf die Bindungsstärke mit STxB. Durch Bindungsstudien mittels Dünnschichtchromatographie (*TLC-Overlay*) und an Mikrotiterplatten mit immobilisierten Lipiden konnte eine stärkere Bindungsaffinität von STxB an natives Gb₃ im Vergleich zu synthetischen Gb₃-Molekülen ermittelt werden (123). Pellizzari et al. (30) beschreibt bei Mischungen von Gb₃-Molekülen mit unterschiedlichen Fettsäuren neben einer größeren Bindungsaffinität von STxB auch eine höhere Zahl gebundener Gb₃-Moleküle pro STxB (Bindungskapazität) im Vergleich zu den einzelnen Molekülen. Dazu inkubierten sie radioaktiv markiertes STxB mit Gb₃ (C24:0), Gb₃ (C16:0) und einer Mischung beider Gb₃-Moleküle in Anwesenheit von Phosphatidylcholin/Cholesterin auf einer Mikrotiterplattenoberfläche. Sie schlugen eine kooperative Wechselwirkung der mit verschiedenen Fettsäuren verknüpften Gb₃-Moleküle vor, die die Bindungsaffinität von STxB erhöhen. Es wäre denkbar, dass bei der Reorganisation und Erhöhung der Lipidpackungsdichte durch STxB-Bindung kooperative Effekte verschiedener Gb₃-Moleküle eine Rolle spielen. In Lipiddoppelschichten mit immobilisiertem nativem Gb₃ könnten diese bei der Bindung von STxB-Cy3 in l_o-Bereichen zu einer höheren Mobilität der STxB-Gb₃-Cluster und einer stärkeren Phasenseparation führen.

Der Einfluss des Gb₃ auf die STxB-Bindung, wurde bislang wenig untersucht. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Rolle von Gb₃ auf die laterale Clusterbildung des Proteins und der Lipide gezeigt werden. Arbab et al. (124) untersuchten den Einfluss der

Fettsäurekettenlänge von Phosphatidylcholin (PC) auf die Bindung von radioaktiv markiertem STxB an Gb₃ immobilisiert in PC/Cholesterin-Membranen. Mittels Bindungsstudien an Mikrotiterplatten und Liposomen konnten sie zeigen, dass die Bindungsaffinität von STxB zu Gb₃ mit sinkender Fettsäurelänge von PC stieg, was sie auf eine erhöhte Präsentation von Gb₃ an der Oberfläche für die Erkennung von STxB als Bindungspartner zurückführten. Weiterhin wurde bei Experimenten an Mikrotiterplatten mit 14 verschiedenen Gb₃-Molekülen die höchste Affinität von STxB zu Gb₃ (C22:1) und Gb₃ (C20:0), sowie eine verstärkte Bindung an Gb₃-Moleküle, die eine ungesättigte Fettsäure enthielten, ermittelt (31). Die Anwesenheit einer α -hydroxylierten Fettsäure in Gb₃ (C22:0) und Gb₃ (C18:0) führte in analogen Experimenten ebenfalls zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität und einer erhöhten Bindungskapazität von STxB (32).

5.6 Modell der Bindung von STxB an Gb₃-haltige Membranen

In dieser Arbeit wurde die Bindung von STxB an Gb₃ mittels planarer Membransysteme untersucht. Der Einfluss der Gb₃-Bindungsstellen sowie der Einfluss der Molekülstruktur von Gb₃ auf die laterale Organisation des Toxins und die Reorganisation der Lipide nach Proteinbindung wurden auf molekularer Ebene charakterisiert. Zusammen mit den in Kapitel 1.4 vorgestellten Ergebnissen, die die Induzierung von Membraninvaginationen durch Bindung von STxB an Gb₃-haltige GUVs beschreiben, wird ein Modell aufgestellt, welches einen Mechanismus für die Organisation von gebundenem STxB an Membranen vorschlägt. Das Modell ist an das von Römer et al. (16) aufgestellte Modell angelehnt und ergänzt dieses vor allem auf molekularer Ebene. In Tabelle 5-1 sind die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Experimenten mit planaren Lipidmono- und Lipiddoppelschichten sowie die Ergebnisse der GUV-Studie zusammengefasst. Daraus lässt sich das im Folgenden beschriebene Modell ableiten (Abb. 5-3). Das Modell berücksichtigt sowohl die Möglichkeit, dass STxB an Gb₃ in der *l*₀-Phase als auch an Gb₃ in der *l*_d-Phase bindet. Es lässt sich somit auf alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten artifiziellen Lipidmembranen, sowie auf biologische Membranen anwenden.

Tab. 5-1: Zusammenfassung der Experimente zur Charakterisierung der STxB-Gb₃-Bindung an Membranen.

System (Membran - Protein)	Experiment	Beobachtung und Schlussfolgerungen
DOPC/Gb ₃ ^a – STxB-wt	SSM ^b (FL ^c , AFM)	STxB-Cluster (Höhe < 2 nm)
DOPC/Cholesterin/Gb ₃ ^d – STxB-wt	SSM (FL, AFM)	STxB-Cluster (Höhe ca. 2,2 nm) → erhöhte Membrandicke unterhalb Cluster → höhere Lipidpackungsdichte
	GUVs (FL, niedrige Membranspannung)	Membraninvaginationen
	GUVs (FL, hohe Membranspannung)	STxB-Cluster
DOPC/Cholesterin/Gb ₃ ^d – STxB-W34A	SSM (FL, AFM)	STxB-Cluster (Höhe ca. 1,6 nm) → keine Erhöhung der Membrandicke unterhalb Cluster
	GUVs (FL, niedrige Membranspannung)	keine Membraninvaginationen
	GUVs (FL, hohe Membranspannung)	keine STxB-Cluster
DOPC/Cholesterin/Gb ₃ ^d – anti-Gb ₃	SSM (FL, AFM)	anti-Gb ₃ -Cluster (Höhe bis zu 40 nm) → Spezifität der STxB-Cluster
	GUVs (FL, niedrige Membranspannung)	keine Membraninvaginationen
DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (C22:1 ¹³) ^d – STxB-wt	GUVs (FL, niedrige Membranspannung)	Membraninvaginationen
DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (C22:0) ^d – STxB-wt	GUVs (FL, niedrige Membranspannung)	keine Membraninvaginationen
DOPC/SM ^e /Cholesterin/Gb ₃ ^f – STxB-wt	SSM (FL, AFM)	STxB-Cluster in l _o -Phase (Höhe ca. 2,2 nm) → erhöhte Membrandicke unterhalb Cluster
	SSM (FL, Perylen/Texas Red DHPE)	Perylenumverteilung von der l _d - in l _o -Phase, l _d -Anteil steigt, C ^g steigt → höhere Lipidpackungsdichte
	Lipidmonoschichten (FL)	Änderung Domänenform, neue Phase in l _o -Phase, Induzierung von Domänen → Entstehung kondensierter Gb ₃ -reicher Domänen durch STxB-Bindung
	GUVs (FL, niedrige Membranspannung)	flache Membrandeformationen, STxB-Cluster in l _o -Phase
DOPC/SM/Cholesterin/Gb ₃ ^h – STxB-wt	SSM (FL, AFM)	Induzierung einer l _d /l _o -Phasenseparation
	Lipidmonoschichten (FL)	Induzierung einer kondensierten Gb ₃ -reichen Phase durch STxB-Bindung
DOPC/SM/Cholesterin/Gb ₃ (C22:1 ¹³) ^f – STxB-wt	SSM (FL, AFM)	gebundenes STxB nicht in bestimmter Lipidphase angereichert (homogene Verteilung)
DOPC/SM/Cholesterin/Gb ₃ (C22:0) ^f – STxB-wt	SSM (FL, AFM)	STxB-Cluster in l _o -Phase

^a DOPC/Gb₃ (95:5), ^b SSM = Solid Supported Membrane (engl.: festkörperunterstützte Membran, hier Lipid-doppelschicht), ^c FL = Fluoreszenz, ^d Lipidverhältnis: 65:30:5, ^e SM = Sphingomyelin, ^f Lipidverhältnis 40:35:20:5 bei SSM- bzw. 42:40:13:5 bei GUV-Experimenten, ^g C = Circularität, ^h Lipidverhältnis 65:10:20:5.

In einem ersten Schritt bindet STxB an die Membran, wobei das Protein zunächst an den hochaffinen Bindungsstellen I und II der jeweiligen Monomere an Gb₃ bindet. Der Ablauf des Bindungsprozesses in mehreren Stufen, in denen zunächst nicht alle Bindungsstellen des STxB besetzt werden, stimmt mit einem von Pina et al. (7) vorgeschlagenem Mechanismus überein. Gebundenes STxB kann lateral wechselwirken, so dass sich mehrere Proteine lokal anhäufen und Proteincluster bilden. Der Indolring des Tryptophans an Position 34, welcher für die Bindungsstelle III des STxB verantwortlich ist, erkennt bzw. bindet weitere Gb₃-Moleküle in der Membran, was zu einer Reorganisation von Lipiden führt. Die Reorganisation der Lipide erhöht die Lipidpackungsdichte, was in manchen Fällen zur Induzierung einer zusätzlichen geordneten Phase führen kann, die mit Gb₃ angereichert ist. Die beobachtete erhöhte Membrandicke unterhalb der STxB-Cluster, die Induzierung von kondensierten Gb₃-reichen Domänen in Lipidmonoschichtexperimenten und die Perylenumverteilung von der *l_d*- in die *l_o*-Phase nach Proteinbindung in Lipiddoppelschichten, lassen eine Erhöhung der Lipidpackung schlussfolgern. Aus der zu 1,6 nm bestimmten Höhe der Cluster des STxB-W34A, welches keine Bindungsstelle III besitzt, lässt sich keine Erhöhung der Lipidpackung ableiten. *Site III* ist somit nicht nur für die Bindung weiterer Gb₃-Moleküle verantwortlich, sondern auch für eine Erhöhung der Lipidpackung. Experimente mit dem polarisationssensitiven Farbstoff Laurdan an Zellen, ergaben ebenfalls bei Bindung von STxB-wt eine Erhöhung der Membranordnung, bei Inkubation mit STxB-W34A wurde dieser Effekt allerdings nicht beobachtet (16).

Die Erhöhung der Lipidpackung wird allerdings nicht nur durch die Bindungsstelle III dirigiert, sondern zusätzlich durch die molekulare Struktur des Rezeptors Gb₃ bestimmt. Gb₃ (C22:1¹³) lässt sich trotz STxB-Bindung nicht besonders dicht anordnen, da die Kinke an der Doppelbindung dies nicht ermöglicht. Die beobachtete homogene Verteilung des STxB in der *l_d*- und *l_o*-Phase lässt darauf schließen. Leichte Veränderungen der Lipidpackung durch STxB-Bindung an Gb₃ (C22:1¹³)-haltige Membranen sind allerdings nicht völlig auszuschließen. Der STxB-Gb₃ (C22:0)-Komplex wurde dagegen in der *l_o*-Phase detektiert, woraus eine dichte Anordnung der Gb₃-Ketten gefolgert werden kann.

Bei der Bindung von STxB an Gb₃ (nativ)-haltige Membranen wird eine dichtere Packung der Lipidketten angenommen als in Gb₃ (C22:0)-haltigen Doppelschichten. Dies liegt darin begründet, dass durch die STxB-Bindung an natives Gb₃ eine stärkere Lipidreorganisation,

sowie die Lokalisation von STxB in der l_o -Phase in definierteren Membranbereichen, im Vergleich zu analogen Experimenten mit synthetischem Gb₃, beobachtet wurde (siehe Kapitel 5.5). Kooperative Wechselwirkungen zwischen Gb₃-Molekülen, die verschiedene Molekülstrukturen aufweisen, sind denkbar.

Die erhöhte Lipidpackung führt zu einem Anstieg der Linienspannung γ (Energie pro Grenzflächenlinie), da durch die erhöhte Membrandicke unterhalb der STxB-Cluster eine Höhendifferenz zur umgebenden Membran entsteht („*hydrophobic mismatch*“). Der Kontakt der hydrophoben Ketten mit der wässrigen Umgebung ist energetisch ungünstig, was die Energie pro Längeneinheit an der Grenzfläche steigen lässt (60). Der Anstieg der Linienspannung führt zu einem Anstieg der Linienenergie $E_\gamma (= \gamma \cdot P)$. Die Linienenergie kann erniedrigt werden, indem der Umfang P der STxB-Cluster minimiert wird. Dies kann durch die Erhöhung der Circularität (rundere Cluster) oder durch Fusion von Clustern entstehen. Die Steigung der Circularität von Domänen durch die STxB-Bindung konnte in Experimenten mit planaren Membranen beobachtet werden.

Eine weitere Möglichkeit die Linienenergie zu erniedrigen, ist die Verringerung des Umfangs P durch die Bildung von Invaginationen. Dies erklärt die beobachteten Membraninvaginationen in GUVs nach STxB-Bindung. Bei der Induzierung von Membrandeformationen wäre auch eine durch STxB erzeugte spontane negative Membrankrümmung eine mögliche Erklärung, die ebenfalls zu einem Anstieg der Linienspannung führt. Die Bildung von Invaginationen ist allerdings nur möglich, falls die erforderliche Krümmungsenergie nicht zu hoch ist. Bei hoher Membranspannung ist dies der Fall.

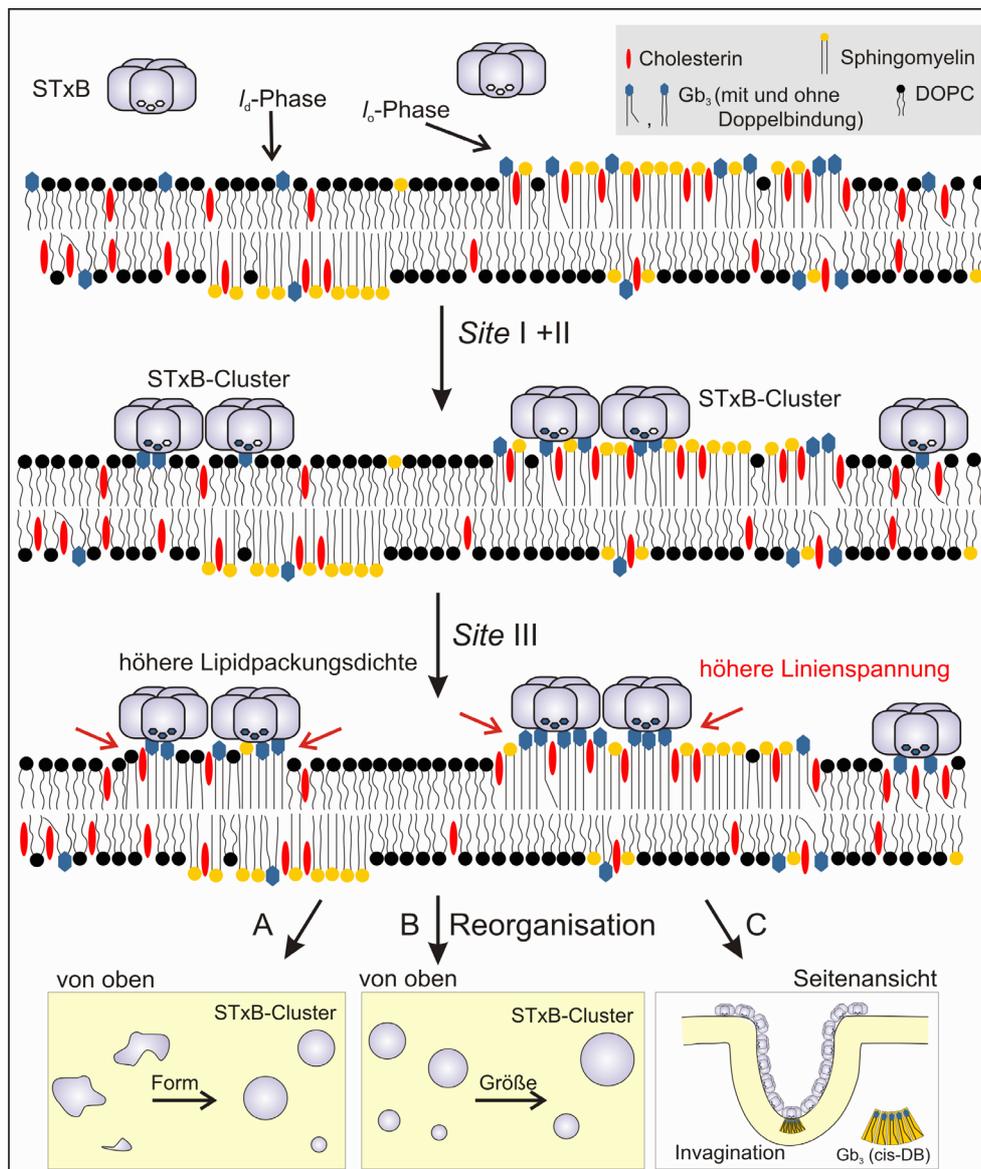


Abb. 5-3: Modell der Bindung von STxB an Gb₃-haltige Membranen. STxB bindet zunächst über die hochaffinen Bindungsstellen I und II an Gb₃ und bildet Proteincluster. Eine Bindung an Gb₃ in der *I_o* bzw. in der *I_a*-Phase ist möglich. Die Bindungsstelle III (lokalisiert an Aminosäure W34) rekrutiert weitere Gb₃-Moleküle zur Bindung unter die Cluster. Dies führt zu einer Erhöhung der Membrandicke und einer erhöhten Lipidpackungsdichte, so dass die Linienspannung (rote Pfeile) und damit die Linienenergie an der Grenzfläche zwischen den STxB-Clustern und der umgebenden Membran steigt. Die dichte Anordnung der Lipide ist abhängig von der Gb₃-Molekülstruktur. Die erhöhte Linienenergie kann durch Reorganisation der Lipide abgebaut werden, indem **A** die Form der Domänen runder wird, **B** die Domänen fusionieren oder **C** die Membran deformiert wird und sich Invaginationen ausbilden. Die Membrandeformation ist von der Form der Lipide abhängig, wobei die kegelförmige Form von Gb₃-Molekülen mit *cis*-Doppelbindungen (*cis*-DB) diese begünstigen. Die Lipide der anderen Membranhälfte sind zufällig angeordnet, da hierzu keine Information vorliegt.

In GUVs bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ ist die Krümmungsenergie vermutlich so hoch, dass nur flache Membrandeformationen beobachtet werden. Es ist möglich, dass eine dichtere Anordnung der STxB-Gb₃-Komplexe in der *l*₀-Phase einem höheren lateralen Druck und damit einer höheren lateralen Membranspannung entspricht, was zu einer höheren Krümmungsenergie führt. Die Form der Lipide besitzt ebenfalls Einfluss auf die Bildung von Invaginationen. Die durch die Doppelbindung verursachte kegelförmige Form des Gb₃ (C22:1¹³) führt zu negativer Membrankrümmung, was die Bildung von Invaginationen begünstigt. Gb₃ (C22:0) besitzt eher eine Keilform, die positive Krümmung erzeugt, was der negativen durch STxB induzierten Krümmung, entgegenwirken würde und somit die Bildung von Invaginationen verhindert (16). Wird die Bildung von Invaginationen durch eine hohe Membranspannung in GUVs verhindert, bilden sich STxB-Cluster. Nach anschließender Erniedrigung der Membranspannung bilden sich keine Invaginationen. Dies lässt den Schluss zu, dass bei der Bildung von STxB-Cluster und Invaginationen dynamische Aspekte eine Rolle spielen. Wachsen die STxB-Cluster über eine bestimmte Größe, so wird die Bildung von Invaginationen verhindert. Das laterale Wachstum der STxB-Gb₃-Cluster scheint somit durch den Prozess der Invagination reguliert zu werden. *In vivo* erfolgt nach Bildung von STxB-Gb₃-Clustern (Nanodomänen sind denkbar) die biologische Funktion der Invagination wahrscheinlich schneller als die Ausbildung makroskopischer Phasenseparation. Die Existenz von kurzlebigen STxB-Gb₃-Nanodomänen würde ein dynamisches *raft*-Modell unterstützen (18).

Das aufgestellte Modell zeigt die Bedeutung der molekularen Strukturen des STxB und Gb₃ auf die laterale Organisation in Membranen. Der Einfluss der Bindungsstelle III auf die laterale Organisation der Lipide konnte geklärt werden. Diese bewirkt die Rekrutierung von Gb₃-Molekülen unterhalb der STxB-Cluster und eine erhöhte Lipidpackung. Außerdem konnte zum ersten Mal die Funktion der Gb₃-Molekülstruktur auf die laterale Anordnung des STxB-Gb₃-Komplexes in der Membran ermittelt werden. Die in Zellen beobachtete Clathrin-unabhängige Bildung von Invaginationen der Plasmamembran können durch den vorgeschlagenen Mechanismus für die Entstehung von Membraninvaginationen sinnvoll erklärt werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die laterale Organisation der Untereinheit B von Shiga Toxin (STxB) gebunden an artifizielle Gb₃-haltige Membransysteme untersucht. Mittels hochauflösender Rasterkraft (SFM)- und Fluoreszenzmikroskopie konnte die Bindung des Proteins an planare Lipidmono- und Lipiddoppelschichten und die Organisation der Lipide in den Membranen visualisiert werden.

Die Bindung von STxB an festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten, zusammengesetzt aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC)/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), in denen eine flüssig-ungeordnete (*l_d*-) und eine flüssig-geordnete Phase (*l_o*-Phase) koexistieren, wurde charakterisiert. Durch topographische SFM-Untersuchungen konnte die Bildung von 2,2 nm hohen STxB-Clustern, gebunden an Gb₃ in der *l_o*-Phase, beobachtet werden. In DOPC/Gb₃ (95:5) und DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Doppelschichten, die keine erkennbare Phasenseparation aufwiesen, konnten ebenfalls 2,2 nm hohe STxB-Cluster auf der Membranoberfläche detektiert werden. Da die ermittelte Höhe der Proteincluster etwa 10 % größer ist als die aus der Kristallstruktur abgeleitete Höhe, wurde auf eine Anreicherung von Gb₃-Lipiden, die zu einer erhöhten Membrandicke unterhalb der STxB-Cluster führen, geschlossen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Membrandicke durch die Bindung von Gb₃ an die dritte Bindungsstelle (*Site III*) des STxB induziert wird, wie topographische Messungen mit dem mutierten Protein STxB-W34A, bei der die Funktion der Gb₃-Bindung an *Site III* blockiert ist, gebunden an DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5)-Membranen, zeigten. Die Proteincluster waren nur 1,6 nm hoch.

Mittels fluoreszenzmarkierter Membranen konnte eine Reorganisation der Lipide in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten, induziert durch die STxB-Bindung, beobachtet werden. Mittels detaillierter Pixelanalyse konnte eine Erhöhung des Flächenanteils der *l_d*-Phase, sowie der Circularität der Lipidomänen ermittelt werden. Weiterhin konnte eine Umverteilung des Fluorophors Perylen, der sich mit wachsendem Lateraldruck der Membran in fluiden Bereichen anreichert, von der *l_o*- in die *l_d*-Phase beobachtet werden. Aus den Resultaten wurde eine Erhöhung der

Lipidpackungsdichte unterhalb der Proteincluster durch die Bindung von STxB an Gb₃ gefolgert.

In dieser Arbeit konnte außerdem der Einfluss des Sättigungsgrades der Gb₃-Fettsäuren auf die Anordnung des membrangebundenen STxB und die Reorganisation der Lipide induziert durch die Proteinbindung geklärt werden. So zeigten rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (C22:1¹³) (40:35:20:5)-Membranen eine nahezu komplette Belegung der Oberfläche mit gebundenem STxB im Gegensatz zur Lokalisation von STxB in der *l*_o-Phase bei Gb₃ (C22:0)-haltigen Doppelschichten.

Weiterhin wurde die Bindung von STxB an Gb₃-haltige Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche untersucht, um die Lipidreorganisation und Änderungen der Lipidpackungsdichte an einem dynamischeren Membransystem mittels Fluoreszenzmikroskopie zu charakterisieren. In Lipidmonoschichten bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃, die vor Proteinbindung die Koexistenz von *l*_d/*l*_o-Phase oder keine detektierbare Phasenseparation aufwiesen, konnte die Induzierung einer kondensierten Gb₃-reichen Phase durch die STxB-Bindung beobachtet werden.

Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse wurde postuliert, dass in einem ersten Schritt STxB an die Membranoberfläche bindet und Proteincluster bildet. Weitere Gb₃-Moleküle binden an die dritte Bindungsstelle von STxB, was zu einer Reorganisation und einer erhöhten Lipidpackungsdichte führt. Durch eine dicht gepackte Anordnung steigt die Linienspannung an der Grenzfläche der Cluster an, was zu einer Erhöhung der Circularität oder der Fusion von STxB-Gb₃-Clustern führen kann. Außerdem ist die Bildung von Membrandeformationen denkbar, was die kürzlich durch STxB-Bindung beobachtete Bildung von Membraninvaginationen in *Giant Unilamellar Vesicles* erklären könnte. Der vorgeschlagene Mechanismus für die STxB-Bindung an Membranen liefert Einblicke in die in Zellen beobachtete Clathrin-unabhängige Endozytose.

7 Literaturverzeichnis

1. Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL, Read RJ (1998) Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry* 37:1777-1788.
2. Fong JS, de Chadarevian JP, Kaplan BS (1982) Hemolytic-uremic syndrome. Current concepts and management. *Pediatr Clin North Am* 29:835-856.
3. Pina DG, Gomez J, Villar E, Johannes L, Shnyrov VL (2003) Thermodynamic analysis of the structural stability of the shiga toxin B-subunit. *Biochemistry* 42:9498-94506.
4. Fraser ME, Chernaiia MM, Kozlov YV, James MNG (1994) Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nature Struct Biol* 1:59-64.
5. Richardson JM, Evans PD, Homans SW, Donohue-Rolfe A (1997) Solution structure of the carbohydrate-binding B-subunit homopentamer of verotoxin VT-1 from *E. coli*. *Nat Struct Biol* 4:190-193.
6. Stein PE, Boodhoo A, Tyrrell GJ, Brunton JL, Read RJ (1992) Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* 355:748-750
7. Pina DG, Johannes L, Chastano MARB (2007) Shiga toxin B-subunit sequential binding to its natural receptor in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1768:628-636.
8. Pina DG, Johannes L (2005) Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. *Toxicon* 45:389-393.
9. Johannes L (2002) The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. I. Shiga toxin B-subunit system: retrograde transport, intracellular vectorization, and more. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1-7.
10. Lauvrak SU, Torgersen ML, Sandvig K (2004) Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *J Cell Sci* 117:2321-2331.

11. Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS, Lodge R, Roberts TH, Hirschberg K, Phair RD, Lippincott-Schwartz J (2001) Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol* 153:529-541.
12. Saint-Pol A, Yélamos B, Amessou M, Mills IG, Dugast M, Tenza D, Schu P, Antony C, McMahon HT, Lamaze C, Johannes L (2004) Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev Cell* 6:525-538.
13. Bonifacino JS, Rojas R (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:568-579.
14. Sandvig K, Torgersen ML, Raa HA, van Deurs B (2008) Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 129:267-276.
15. Mayor S, Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:603-612.
16. Römer W, Berland L, Chambon V, Gaus K, Windschiegel B, Tenza D, Aly MRE, Fraisier V, Florent J-C, Perrais D, Lamaze C, Raposo G, Steinem C, Sens P, Bassereau P, Johannes L (2007) Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450:670-675.
17. Gaus K, Zech T, Harder T (2006) Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Mol Membr Biol* 23:41-48.
18. Lencer WI, Saslowsky D (2005) Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins. *Biochim Biophys Acta* 1746:314-321.
19. Falguières T, Mallard F, Baron C, Hanau D, Lingwolld C, Goud B, Salamero J, Johannes L (2001) Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* 12:2453-2468.
20. Falguières T, Römer W, Amessou M, Afonso C, Wolf C, Tabet J-C, Lamaze C, Johannes L (2006) Functionally different pools of Shiga toxin receptor, globotriaosyl ceramide, in HeLa cells. *FEBS J* 273:5205-5218.
21. Hanashima T, Miyake M, Yahiro K, Iwamaru Y, Ando A, Morinaga N, Noda M (2008) Effect of Gb₃ in lipid rafts in resistance to Shiga-like toxin of mutant Vero cells. *Microb Pathog* 45:124-133.

22. Katagiri YU, Mori T, Nakajima H, Katagiri C, Taguchi T, Takeda T, Kiyokawa N, Fujimoto J (1999) Activation of Src family kinase Yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb₃/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. *J Biol Chem* 274:35278-35282.
23. Katagiri YU, Nobutaka K, Fujimoto J (2001) The effect of Shiga toxin binding to globotriaosylceramide in rafts of human kidney cells and Bukitt's lymphoma ramos cells. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13:281-290.
24. Kovbasnjuk O, Edidin M, Donowitz M (2001) Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells. *J Cell Sci* 114:4025-4031.
25. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Clark G, Drbal K, Engel P, Hart D, Horejsi V, Isacke C, Macardle P, Malavasi F, Mason D, Olive D, Saalmueller A, Schlossman SF, Schwartz-Albiez R, Simmons P, Tedder TF, Uguccioni M, Warren H (2005) CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 106:3123-3126.
26. Römpf H (2008) *Römpf Online* (Georg Thieme Verlag, Stuttgart).
27. Smith DC, Lord JM, Roberts LM, Johannes L (2004) Glycosphingolipids as toxin receptors. *Semin Cell Dev Biol* 15:397-408.
28. Sawada R, Hotta H, Chung YS, Sowa M, Tai T, Yano I (1998) Globotriaosyl ceramide and globoside as major glycolipid components of fibroblasts in scirrhous gastric carcinoma tissues. *Jpn J Cancer Res* 89:167-176.
29. Janssen KP, Vignjevic D, Boisgard R, Falguieres T, Bousquet G, Decaudin D, Dolle F, Louvard D, Tavitian B, Robine S, Johannes L (2006) In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. *Cancer Res* 66:7230-7236.
30. Pellizzari A, Pang H, Lingwood CA (1992) Binding of verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry* 31:1363-1370.
31. Kiarash A, Boyd B, Lingwood CA (1994) Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem* 269:11138-11146.

32. Binnington B, Lingwood D, Nutikka A, Lingwood CA (2002) Effect of globotriaosyl ceramide fatty acid alpha-hydroxylation on the binding by verotoxin 1 and verotoxin 2. *Neurochem Res* 27:807-813.
33. Nyholm PG, Magnusson G, Zheng Z, Norel R, Binnington-Boyd B, Lingwood CA (1996) Two distinct binding sites for globotriaosyl ceramide on verotoxins: identification by molecular modelling and confirmation using deoxy analogues and a new glycolipid receptor for all verotoxins. *Chem Biol* 3:263-275.
34. Danielli JF, Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Comp Physiol* 5:495-508.
35. Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
36. Devaux PF, Morris R (2004) Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* 5:241-246.
37. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2003) *Biochemie* (Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg · Berlin).
38. Feigenson GW, Buboltz JT (2001) Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: Nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophys J* 80:2775-2788.
39. van Meer G (2005) Cellular lipidomics. *Embo J* 24:3159-3165.
40. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
41. Mouritsen OG, Zuckermann MJ (2004) What's so special about cholesterol? *Lipids* 39:1101-1113.
42. Ipsen JH, Karlstrom G, Mouritsen OG, Wennerstrom H, Zuckermann MJ (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta* 905:162-172.
43. Ipsen JH, Mouritsen OG, Zuckermann MJ (1989) Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol. *Biophys J* 56:661-667.
44. Meder D, Simons K (2006) in *Lipid Rafts and Caveolae*, ed Fielding, CJ (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim), pp 1-22.

45. Gaus K, Gratton E, Kable EP, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L, Jessup W (2003) Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15554-15559.
46. Hancock JF (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:456-462.
47. Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K, Gratton E (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 80:1417-1428.
48. de Almeida RF, Fedorov A, Prieto M (2003) Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys J* 85:2406-2416.
49. McConnell HM, Vrljic M (2003) Liquid-liquid immiscibility in membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32:469-492.
50. Sens P, Johannes L, Bassereau P (2008) Biophysical approaches to protein-induced membrane deformations in trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 20:476-482.
51. Windschiegl B, Orth A, Römer W, Berland L, Bassereau P, Johannes L, Steinem C (2008) Lipid reorganisation induced by Shiga toxin binding to planar membranes. *submitted*
52. Farsad K, De Camilli P (2003) Mechanisms of membrane deformation. *Curr Opin Cell Biol* 15:372-381.
53. McMahon HT, Gallop JL (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438:590-596.
54. Zimmerberg J, Kozlov MM (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:9-19.
55. Sarasij RC, Mayor S, Rao M (2007) Chirality-induced budding: a raft-mediated mechanism for endocytosis and morphology of caveolae? *Biophys J* 92:3140-3158.
56. Reynwar BJ, Illya G, Harmandaris VA, Muller MM, Kremer K, Deserno M (2007) Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. *Nature* 447:461-464.
57. Kruger P, Losche M (2000) Molecular chirality and domain shapes in lipid monolayers on aqueous surfaces. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 62:7031-7043.

58. Parthasarathy R, Groves JT (2007) Curvature and spatial organization in biological membranes. *Soft Matter* 3:24-33.
59. Sens P, Turner MS (2006) Budded membrane microdomains as tension regulators. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 73:031918.
60. Garcia-Saez AJ, Chiantia S, Schwille P (2007) Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *J Biol Chem* 282:33537-33544.
61. Groves JT, Ulman N, Cremer PS, Boxer SG (1998) Substrate-membrane interactions: Mechanisms for imposing patterns on fluid bilayer membrane. *Langmuir* 14:3347-3550.
62. Baumgart T, Hess ST, Webb WW (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 425:821-824.
63. Baumgart T, Hunt G, Farkas ER, Webb WW, Feigenson GW (2007) Fluorescence probe partitioning between L_o/L_d phases in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1768:2182-2194.
64. Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS (1993) Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chemistry* 4:105-111.
65. Johannes L, Tenza D, Antony C, Goud B (1997) Retrograde transport of KDEL-bearing B-fragment of Shiga Toxin. *J Biol Chem* 272:19554-19561.
66. Bast DJ, Banerjee L, Clark C, Read RJ, Brunton JL (1999) The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. *Molecular Microbiology* 32:953-960.
67. Reimhult E, Höök F, Kasemo B (2003) Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* 19:1681-1691.
68. Möhwald H (1990) Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu Rev Phys Chem* 41:441-476.
69. Cevs G (1993) *Phospholipids handbook* (CRC Press, Boca Raton).
70. Pockels A (1891) Surface Tension. *Nature* 43:437-439.
71. Langmuir I (1997) The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J Am Chem Soc* 39:1848-1906.

72. Wilhelmy L (1863) Ueber die Abhängigkeit der Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers. *Ann Phys* 195:177-217.
73. MacRitchie F (1991) Air/water interface studies of proteins. *Anal Chim Acta* 249:241-245.
74. Freites JA, Ali S, Rosengarth A, Luecke H, Dennin MB (2004) Annexin A1 interaction with a zwitterionic phospholipid monolayer: a fluorescence microscopy study. *Langmuir* 20:11674-11683.
75. Rosengarth A, Wintergalen A, Galla HJ, Hinz HJ, Gerke V (1998) Ca²⁺-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers. *FEBS Lett* 438:279-284.
76. Ahlers M, Müller W, Reichert A, Ringsdorf H, Venzmer J (1990) Spezifische Wechselwirkung von Proteinen mit funktionellen Lipidmonoschichten - Wege zur Simulation von Biomembranprozessen. *Angew Chem* 102:1310-1327.
77. Hawkes PW, Spence JCH (2007) *Science of Microscopy, Volume II* (Springer Science + Business Media, New York).
78. Wedler G (1997) *Lehrbuch der Physikalischen Chemie* (WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim).
79. Atkins PW (2001) *Physikalische Chemie* (WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim).
80. Patterson GH (2007) Fluorescent proteins for cell biology. *Methods Mol Biol* 411:47-80.
81. Menke M, Gerke V, Steinem C (2005) Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* 44:15296-15303.
82. Weitze MD (2003) *Das Rasterkraftmikroskop* (Deutsches Museum, München).
83. Haider M, Muller H, Uhlemann S, Zach J, Loebau U, Hoeschen R (2008) Prerequisites for a Cc/Cs-corrected ultrahigh-resolution TEM. *Ultramicroscopy* 108:167-178.
84. Binning G, Rohrer H (1984) Scanning Tunneling Microscopy. *Surface Science* 152/153:17-26.

85. Binning G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic Force Microscopy. *Physical Review Letters* 56:930-933.
86. Shao Z, Mou J, Czajkowsky DM, Yang J, Yuan JY (1996) Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed. *Advances in Physics* 45:1-86.
87. Hutter JL, Bechhoefer J (1993) Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum* 64:1868-1873.
88. Janshoff A, Neitzert M, Oberdorfer Y, Fuchs H (2000) Force spectroscopy of molecular systems-single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules. *Angew Chem Int Ed Engl* 39:3212-3237.
89. Braga PC, Ricci D (2004) *Atomic Force Microscopy* (Humana Press, New Jersey).
90. Santos NC, Castanho MA (2004) An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophys Chem* 107:133-149.
91. Sens P, Safran SA (2000) Inclusions induced phase separation in mixed lipid films. *Eur Phys J E* 1:237-248.
92. Fielding CJ (2006) *Lipid rafts and caveolae* (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim).
93. Saslowsky DE, Lawrence J, Ren X, Brown DA, Henderson RM, Edwardson JM (2002) Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. *J Biol Chem* 277:26966-26970.
94. Richter RP, Maury N, Brisson AR (2005) On the effect of the solid support on the interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers. *Langmuir* 21:299-304.
95. Janshoff A, Steinem C (2001) Scanning force microscopy of artificial membranes. *Chembiochem* 2:798-808.
96. Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K, Gratton E (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 80:1417-1428.
97. Dietrich C, Volovyk ZN, Levi M, Thompson NL, Jacobson K (2001) Partitioning of Thy-1, G_{M1}, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10642-10647.
98. Connell SD, Smith DA (2006) The atomic force microscope as a tool for studying phase separation in lipid membranes. *Mol Membr Biol* 23:17-28.

99. Shi J, Yang T, Kataoka S, Zhang Y, Diaz AJ, Cremer PS (2007) G_{M1} clustering inhibits Cholera toxin binding in supported phospholipid membranes. *J Am Chem Soc* 129:5954-5961.
100. Wang R, Shi J, Parikh AN, Shreve AP, Chen L, Swanson BI (2004) Evidence for Cholera aggregation on G_{M1} -decorated lipid bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 33:45-51.
101. Yuan C, Johnston LJ (2001) Atomic force microscopy studies of ganglioside G_{M1} domains in phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biophys J* 81:1059-1069.
102. van der Goot FG, Harder T (2001) Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol* 13:89-97.
103. Crane JM, Tamm LK (2004) Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys J* 86:2965-2979.
104. Leonenko ZV, Finot E, Ma H, Dahms TE, Cramb DT (2004) Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. *Biophys J* 86:3783-3793.
105. Veatch SL, Keller SL (2005) Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes. *Biochim Biophys Acta* 1746:172-185.
106. Rinia HA, de Kruijff B (2001) Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett* 504:194-199.
107. Rinia HA, Snel MM, van der Eerden JP, de Kruijff B (2001) Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett* 501:92-96.
108. Hakomori S-i, Zhang Y (1997) Glycosphingolipid antigens and cancer therapy. *Chemistry & Biology* 4:97-104.
109. Menke M, Kunneke S, Janshoff A (2002) Lateral organization of G_{M1} in phase-separated monolayers visualized by scanning force microscopy. *Eur Biophys J* 31:317-322.
110. Burgos P, Yuan C, Viriot M-L, Johnston LJ (2003) Two-color near-field fluorescence microscopy studies of microdomains ("rafts") in model membranes. *Langmuir* 19:8002-8009.

111. Yuan C, Furlong J, Burgos P, Johnston LJ (2002) The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophys J* 82:2526-2535.
112. Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 16:1055-1069.
113. Reviakine I, Brissn A (2000) Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 16:1806-1815.
114. Richter RP, Brisson AR (2005) Following the formation of supported lipid bilayers on mica: A study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophysical Journal* 88:3422-3433.
115. Bast DJ, Banerjee L, Clark C, Read RJ, Brunton JL (1999) The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. *Mol Microbiol* 32:953-960.
116. Tetaud C, Falguieres T, Carlier K, Lecluse Y, Garibal J, Coulaud D, Busson P, Steffensen R, Clausen H, Johannes L, Wiels J (2003) Two distinct Gb₃/CD77 signaling pathways leading to apoptosis are triggered by anti-Gb₃/CD77 mAb and verotoxin-1. *J Biol Chem* 278:45200-45208.
117. Mohwald H (1990) Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu Rev Phys Chem* 41:441-476.
118. Marsh D (1996) Lateral pressure in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1286:183-223.
119. Windschiegl B, Steinem C (2006) Influence of alpha-hydroxylation of glycolipids on domain formation in lipid monolayers. *Langmuir* 22:7454-7457.
120. Hammond AT, Heberle FA, Baumgart T, Holowka D, Baird B, Feigenson GW (2005) Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6320-6325.
121. Binder WH, Barragan V, Menger FM (2003) Domains and rafts in lipid membranes. *Angew Chem Int Ed Engl* 42:5802-5827.

122. Winter R, Noll F (1998) *Methoden der Biophysikalischen Chemie* (Teubner Verlag, Stuttgart).
123. Boyd B, Magnusson G, Zhiuyan Z, Lingwood CA (1994) Lipid modulation of glycolipid receptor function. Availability of Gal(alpha 1-4)Gal disaccharide for verotoxin binding in natural and synthetic glycolipids. *Eur J Biochem* 223:873-878.
124. Arab S, Lingwood CA (1996) Influence of phospholipid chain length on verotoxin/globotriaosyl ceramide binding in model membranes: comparison of a supported bilayer film and liposomes. *Glycoconj J* 13:159-166.

8 Anhang

8.1 Symbolverzeichnis

A	Fläche
A_D	Domänenfläche
C	Circularität
E	Elastizitätsmodul
E_{elstat}	elektrostatische Energie
E_{ges}	Gesamtenergie
E_x	sonstige Energiebeiträge
E_γ	Linienenergie
E_κ	Krümmungsenergie
E_σ	Oberflächenenergie
F	Kraft
L_α	fluide Phase
M	Molare Masse
P	Perimeter (Umfang)
S_o	Gelphase
V	Volumen
d	Spitze-Probe-Abstand
f_0	Resonanzfrequenz
k	Federkonstante
l	Länge
m	Masse
t	<i>thickness</i> (Dicke)
ν	Schwingungsquantenzahl
w	Breite
z_F	Federauslenkung
z_P	z-Piezobewegung
Π	Oberflächendruck
γ	Linienspannung

ρ	Dichte
σ	Membranspannung bzw. Oberflächenspannung
σ_F	Oberflächenspannung Subphase mit Film
σ_S	Oberflächenspannung Subphase
φ	Phasenverschiebung

8.2 Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>atomic force microscopy</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTxB	Cholera Toxin B-Untereinheit
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DRM	Detergensresistente Membranen
FRAP	<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>
Gb ₃	Globotriaosylceramid
GUV	<i>Giant Unilamellar Vesicle</i>
l_d	<i>liquid-disordered</i>
l_o	<i>liquid-ordered</i>
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i>
MLV	<i>multilamellar vesicle</i>
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
SFM	<i>scanning force microscopy</i>
STxB	Shiga Toxin B-Untereinheit

8.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Ammoniumhydroxid	Acros Organics, Geel (Belgien)
β -Bodipy C ₁₂ -HPC	Molecular Probes, Eugene (OR, USA)
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
<i>cantilever</i> , CSC37	Mikromasch, Tallinn (Estland)
<i>cantilever</i> , CSC38	Mikromasch, Tallinn (Estland)
Chloroform	VWR International, Darmstadt
Cholesterin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Gb ₃	Matreya, Pleasant Gap (PA, USA)
Glimmer	Plano GmbH, Wetzlar
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mucosol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Perylen	Molecular Probes, Eugene (OR, USA)
Polycarbonatmembranen	Avestin, Ottawa (Kanada)
DOPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (AL, USA)
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Siliziumträger	CrysTec, Berlin
Sphingomyelin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Texas Red DHPE	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS	USB, Cleveland (OH, USA)
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

8.4 Geräte

Wilhelmy-Filmwaage

RK 1 Standard Langmuir Trough

Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam

Fluoreszenzmikroskop

Axiotech Vario

Carl Zeiss, Jena

Filtersatz 44

Carl Zeiss, Jena

(BP 475/40, FT 500, BP 530/50)

Filtersatz 45

Carl Zeiss, Jena

(BP 560/40, FT 585, BP 630/75)

Filtersatz 47

Carl Zeiss, Jena

(BP 436/20, FT 455, BP 480/40)

Objektiv EC Epiplan-Neofluar

Carl Zeiss, Jena

(20x/n.A. 0,5)

Objektiv Achroplan

Carl Zeiss, Jena

(40x/n.A. 0,8 W)

Rasterkraftmikroskop

NanoWizard I

JPK Instruments, Berlin

NanoWizard II BioAFM

JPK Instruments, Berlin

Reinstwasseranlage

MilliQ Gradient A10

Millipore, Eschborn

Sonstiges

Miniextruder (Liposofast)

Avestin, Ottawa (Kanada)

pH-Meter

Knick, Berlin

8.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: A Kristallstruktur des Shiga Toxins	2
Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Gb ₃ -Bindungsstellen.....	3
Abb. 1-3: Bildung von Membraninvaginationen in Energie-verarmten HeLa-Zellen nach Inkubation mit STxB	4
Abb. 1-4: Bindung von STxB an GUVs zusammengesetzt aus DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5) bei 37 °C	12
Abb. 1-5: Bindung von STxB an GUVs zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (42:40:13:5) bei Raumtemperatur.....	14
Abb. 1-6: Cargo-induzierte Membrandeformation und laterale Organisation	16
Abb. 3-1: Strukturformeln von DOPC, Sphingomyelin und Cholesterin.....	21
Abb. 3-2: Strukturformeln von nativem Globotriaosylceramid, synthetischem Gb ₃ (C22:0) und Gb ₃ (C22:1 ¹³).....	22
Abb. 3-3: Strukturformeln von β -Bodipy C ₁₂ -HPC, Texas Red DHPE und Perylen.....	23
Abb. 3-4: Proteinlabeling durch Reaktion von Lysinresten mit Cy3 NHS-Ester.....	24
Abb. 3-5: Schematischer Aufbau einer Filmwaage mit Wilhelmy-Messsystem.....	27
Abb. 3-6: Schematische Darstellung der Kernpotentialkurven des elektronischen Grundzustandes und des elektronisch angeregten Zustandes.....	30
Abb. 3-7: Jablonski-Diagramm	31
Abb. 3-8: Schematischer Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops.....	32
Abb. 3-9: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.....	35
Abb. 3-10: Veranschaulichung der relevanten Parameter für die Beschreibung einer Kraftkurve.....	38
Abb. 3-11: Schematische Darstellung der Federauslenkung z_F als Funktion von z_P (Kraftkurve).....	39

Abb. 3-12: Laterale Auslenkung des <i>cantilevers</i> und reibungskraftmikroskopisches Signal (LFM-Signal) in Abhängigkeit der Scanrichtung	41
Abb. 3-13: Mögliche Messartefakte in der Rasterkraftmikroskopie.....	43
Abb. 3-14: Verformung des Piezoelements in Abhängigkeit von der angelegten Spannung.....	44
Abb. 3-15: Mögliche Messartefakte in der Rasterkraftmikroskopie bedingt durch Piezoelemente.....	45
Abb. 4-1: Inkubation einer Membran bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (45:35:20) mit 60 nM STxB (Kontrollexperiment).....	48
Abb. 4-2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (45:35:20) nach Inkubation mit 60 nM Cy3-gelabeltem Protein	49
Abb. 4-3: Topographische Aufnahme einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht.....	50
Abb. 4-4: Bindung von STxB an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Membranen.....	51
Abb. 4-5: Topographisches Bild einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Membran nach Inkubation mit 100 nM STxB (<i>tapping mode</i>)	53
Abb. 4-6: Topographische SFM-Aufnahme (<i>contact mode</i>) einer Membran bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) nach Inkubation mit STxB mit nahezu kompletter Belegung des Proteins auf der <i>l</i> ₀ -Phase.	54
Abb. 4-7: Fluoreszenzaufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten dotiert mit 0,2 mol% Perylen und 0,1 mol% Texas Red DHPE vor und nach STxB-Zugabe.....	55
Abb. 4-8: Bestimmung der Circularität und des Flächenanteils der <i>l</i> _d -Domänen in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Membranen	57

Abb. 4-9: Charakterisierung einer Lipiddoppelschicht zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) dotiert mit 0,5 mol% Perylen auf dem Substrat Silizium.	58
Abb. 4-10: Charakterisierung einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht auf dem Substrat Silizium nach Proteinzugabe	59
Abb. 4-11: Topographische SFM-Aufnahme einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht nach Inkubation mit 60 nM STxB auf dem Substrat Silizium.....	60
Abb. 4-12: Bindung der Mutante STxB-W34A an DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten	61
Abb. 4-13: Kontrollexperiment einer DOPC/Cholesterin (70:30)-Membran inkubiert mit 60 nM Cy3-gelabeltem STxB.....	62
Abb. 4-14: Charakterisierung einer DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5)-Membran vor Proteinzugabe	64
Abb. 4-15: Bindung von STxB an planare Lipiddoppelschichten bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5).....	65
Abb. 4-16: Variationen in der Oberflächenbelegung von STxB an Membranen aus DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5).....	66
Abb. 4-17: Charakterisierung der STxB-Bindung an DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5)-Lipiddoppelschichten auf dem Substrat Silizium.....	67
Abb. 4-18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5) dotiert mit 0,2 mol% Bodipy-PC vor und nach Inkubation mit STxB	68
Abb. 4-19: Bindung der Mutante STxB-W34A an DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5)-Lipiddoppelschichten	69
Abb. 4-20: Topographische SFM-Aufnahme des gebundenen Antikörpers anti-Gb ₃ an eine Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Cholesterin/Gb ₃ (65:30:5)	70

Abb. 4-21: Rasterkraftmikroskopisches Höhenbild einer reinen DOPC-Lipiddoppelschicht	72
Abb. 4-22: Veranschaulichung der technischen Schwierigkeiten beim Abbilden mit der Rasterkraftmikroskopie	73
Abb. 4-23: Fluoreszenzmikroskopische und topographische Abbildung der unspezifischen Bindung von STxB an eine DOPC-Membran.....	74
Abb. 4-24: Fluoreszenzmikroskopische und topographische Abbildung der unspezifischen Bindung von STxB an das Substrat <i>Mica</i>	75
Abb. 4-25: Fluoreszenzmikroskopische und topographische Abbildung der unspezifischen Bindung von STxB an das Substrat Silizium.....	75
Abb. 4-26: Repräsentative Fluoreszenz- und SFM-Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Gb ₃ (95:5).....	76
Abb. 4-27: Repräsentative Fluoreszenz- und SFM-Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Gb ₃ (95:5) nach Inkubation mit STxB auf <i>Mica</i>	77
Abb. 4-28: Repräsentative Fluoreszenzaufnahme einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Gb ₃ (95:5) nach Inkubation mit STxB-Cy3 auf Silizium.....	78
Abb. 4-29: Repräsentative Fluoreszenz- und SFM-Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Gb ₃ (95:5) nach Inkubation mit Cy3-markiertem STxB-W34A.....	79
Abb. 4-30: Topographische SFM-Aufnahmen einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (C22:1 ¹³) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht	81
Abb. 4-31: Topographische SFM-Aufnahmen einer DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (C22:1 ¹³) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht nach der Inkubation mit STxB.....	82
Abb. 4-32: Fluoreszenzaufnahmen einer Lipiddoppelschicht zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (C22:1 ¹³) (40:35:20:5) nach der Inkubation mit Cy3-markiertem STxB	83
Abb. 4-33: Fluoreszenzaufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (C22:1 ¹³) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschichten dotiert mit 0,5 mol% Perylen und 0,1 mol% Texas Red DHPE	84

Abb. 4-34: Repräsentative topographische SFM-Aufnahmen einer DOPC/Sphingomyelin/ Cholesterin/Gb ₃ (C22:0) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht vor und nach Inkubation mit STxB.....	86
Abb. 4-35: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen einer DOPC/Sphingomyelin/ Cholesterin/Gb ₃ (C22:0) (40:35:20:5)-Lipiddoppelschicht nach Inkubation mit Cy3-markiertem STxB	87
Abb. 4-36: Fluoreszenzaufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (C22:0) (40:35:20:5)-Membranen markiert mit 0,5 mol% Perylen und 0,1 mol% Texas Red DHPE.....	89
Abb. 4-37: Topographische SFM-Aufnahmen einer Lipiddoppelschicht bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (C22:0) (40:35:20:5) vor und nach Inkubation mit STxB.....	90
Abb. 4-38: Fluoreszenzaufnahmen der in Abbildung 4-37 gezeigten Lipiddoppelschicht.	91
Abb. 4-39: Π/A -Isotherme einer Lipidmonoschicht bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/ Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)	92
Abb. 4-40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidmonoschichten bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC bzw. 0,5 mol% Perylen.....	93
Abb. 4-41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidmonoschichten zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC nach STxB-Zugabe	95
Abb. 4-42: Häufigkeiten der l_o -Domänenflächen A_D in Lipidmonoschichten zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) bei 30 mN/m.....	96
Abb. 4-43: Häufigkeiten der Circularitäten C in DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5)-Lipidmonoschichten bei 30 mN/m.....	97
Abb. 4-44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DOPC/Sphingomyelin/ Cholesterin/Gb ₃ (65:10:20:5)-Lipidmonoschichten dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC bei Oberflächendrücken zwischen 25 und 30 mN/m.	98

Abb. 5-1: Phasendiagramm für Membranen zusammengesetzt aus DOPC, PSM und Cholesterin	102
Abb. 5-2: Overlay-Fluoreszenzbilder von DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ -Lipiddoppelschichten mit grüner Perylen- und roter STxB-Cy3-Fluoreszenz nach Proteinbindung: Gb ₃ (C22:1 ¹³), Gb ₃ (C22:0) und Gb ₃ (nativ).	115
Abb. 5-3: Modell der Bindung von STxB an Gb ₃ -haltige Membranen	121

Danksagung

An dieser Stelle danke ich

Prof. Dr. Claudia Steinem für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung bei der Bearbeitung des interessanten Themas und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Tim Salditt für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

meinen Kooperationspartnern Winfried Römer und Ludger Johannes am Curie Institut in Paris für die Bereitstellung des Proteins und anregende Diskussionen rund um das Thema Shiga Toxin.

Alex und Theresa - der *Shigella Crew* - die wichtige Erkenntnisse über Shiga Toxin lieferten. Es hat Spaß gemacht, mit Euch zusammenzuarbeiten!

den technischen Angestellten für die stete Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Besonders möchte ich Jutta danken, die mich vor allem in der letzten Phase meiner Doktorarbeit tatkräftig bei den Experimenten unterstützt hat.

allen Laborkollegen in Göttingen und Regensburg für die gute Arbeitsatmosphäre. Bei uns war immer viel los, ob im Labor, in der Mensa, bei den Kaffeepausen, den abendlichen Messungen oder beim Feiern. Es war eine lustige Zeit mit Euch!

Anja, Eva, Ruth und Gretel für die tolle Freundschaft und die gemeinsamen Aktivitäten fern der Uni. Es war schön, mit Euch zu feiern, zu kochen oder einfach nur zu quatschen.

meinen derzeitigen und ehemaligen WG-Mitbewohnern Annika, Miri, Toni, Christian, Tina, Birgit und Stephan. Durch Euch habe ich mich in Regensburg und Göttingen wie zu Hause gefühlt. Vor allem Dir, Tina danke ich für die schöne Freundschaft und dafür, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hast.

meinen Studienfreunden Linda, Christian, Sussan, Tobi, Zabine und Anja. Auch wenn wir alle einen anderen Weg einschlugen, denke ich gerne an unsere schöne Zeit in Regensburg zurück.

meinen Freunden von zu Hause Martina, Bettina, Diana, Steffi, Matthias, Thomas, Sven und den anderen Neuhausern. Auch wenn ich nicht oft daheim bin, freue ich mich immer, Euch zu sehen.

meinen Eltern und Geschwistern für die Unterstützung über all die Jahre. Es ist schön, eine Heimat zu haben.

Lebenslauf

Barbara Windschiegl

geboren am 11. Dezember 1979

Schulbildung

09/1986-07/1990 Grundschule Windischeschenbach
09/1990-06/1999 Gymnasium Neustadt a. d. Waldnaab
25.06.1999 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,8)

Studium

10/1999-02/2005 Studium der Chemie an der Universität Regensburg
05.03.2002 Diplomvorprüfung im Fach Chemie (Note: 2,1)
05/2004-02/2005 Diplomarbeit am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und
Biosensorik der Universität Regensburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr.
Claudia Steinem
Thema: „*Einfluss von α -hydroxylierten Fettsäuren in Glyco-
lipiden auf die Ausbildung von Domänen in Lipidmonoschichten*“
16.02.2005 Diplomprüfung im Fach Chemie (Note: 1,7)

Dissertation

03/2005-03/2006 Beginn der Dissertation am Institut für Analytische Chemie,
Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg
seit 04/2006 Dissertation am Institut für Organische und Biomolekulare
Chemie, Georg-August-Universität Göttingen
Betreuerin: Prof. Dr. Claudia Steinem