

**Einfluss des Zellkortex auf die Plasmamembran:
Modulation von Mikrodomänen in Modellmembranen**

Dissertation

zur Erlangung des
mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Alexander Orth

aus Bad Hersfeld

Göttingen 2012

Referentin: Prof. Dr. Claudia Steinem

Korreferent: Dr. Dirk Fasshauer

Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 2012

Meiner Familie

Abstract. The architecture of the plasma membrane is not only determined by the lipid and protein composition but is also influenced by its attachment to the underlying cytoskeleton. The aim of this thesis was to create a new model system based on pore-spanning membranes which accounts for the heterogeneous lipid composition as well as the influence of an underlying meshwork.

Lipid membranes composed of the 'raft-like' mixture DOPC/sphingomyelin/cholesterol (40:40:20) were prepared on ordered porous silicon substrates with pore diameters of 0.8, 1.2 and 2.0 μm by spreading and fusion of giant unilamellar vesicles (GUVs). Microscopic separation in coexisting liquid-ordered (l_o) and liquid-disordered (l_d) domains was strongly affected by the underlying porous substrate. The size of these l_o -domains was controlled by the pore size of the silicon substrate, the temperature, and the cholesterol content of the membrane, which was modulated by additions of methyl- β -cyclodextrin. Binding of STxB to pore-spanning membranes doped with 5 mol% of its receptor lipid Gb₃ increased the l_o -fraction considerably and even induced l_o -phase domains in non-phase separated membranes composed of DOPC/sphingomyelin/cholesterol/Gb₃ (65:10:20:5). The same increase in l_o -fraction was observed when Cholera toxin B-pentamers (CTxB) were bound to pore-spanning membranes doped with 1 mol% of its receptor lipid G_{M1}.

It was also aimed to determine the influence of the chemical structure of Gb₃ on STxB binding and reorganization of solid-supported membranes (SSMs). STxB binding to an α -hydroxylated compound increased the l_o -fraction significantly while the presence of a *cis*-double bond led to the formation of an additional l_o -phase presumably containing unsaturated (glyco-)sphingolipids and cholesterol. For the latter case condensation to larger domains was observed after STxB binding.

The localization of the deployed glycosphingolipids before protein binding is still unknown. Therefore the phase behavior of a new fluorescent polyene galactocerebroside was investigated that was preferentially localized in the l_o -phase of GUVs. This new intrinsic fluorophore may provide the basis for further studies examining the phase behavior of glycosphingolipids.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE ZELLULÄRE PLASMAMEMBRAN	1
1.1.1	<i>Lipid Rafts</i>	2
1.1.2	Einfluss des zellulären Zytoskeletts auf die Plasmamembran	4
1.2	ARTIFIZIELLE MEMBRANEN ALS MODELLSYSTEM UND DEREN PHASENVERHALTEN	8
1.2.1	Phasenseparation in Membranen	9
1.2.2	Riesenvesikel und festkörperunterstützte Membranen	12
1.2.3	Porenüberspannende Membranen	15
1.3	SHIGA TOXIN UND DAS REZEPTORGLYKOSPHINGOLIPID GB ₃	16
1.4	CHOLERA TOXIN UND DAS REZEPTORGANGLIOSID GM ₁	23
2	ZIELSETZUNG	29
3	MATERIALIEN UND METHODEN	31
3.1	EINGESETZTE SUBSTANZEN	31
3.1.1	Lipide	31
3.1.2	Fluoreszenzsonden	36
3.1.3	Methyl- β -Cyclodextrin	41
3.1.4	Thiole zur Substratfunktionalisierung	41
3.2	PRÄPARATIVE METHODEN	42
3.2.1	Konzentrationsbestimmung von Lipidstammlösungen	42
3.2.2	Präparation von <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>	44
3.2.3	Präparation porenüberspannender Membranen	47
3.2.4	Präparation von festkörperunterstützten Membranen	49
3.2.5	Cholesterinextraktion mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin	51
3.2.6	Anbindung der bakteriellen Shiga und Cholera Toxine	52
3.3	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	55
3.3.1	Grundlagen	55
3.3.2	Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie	57

3.3.3	Konfokale Laserrastermikroskopie	60
3.3.4	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP).....	63
3.4	RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	65
3.4.1	Messprinzip	66
3.4.2	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen im <i>Contact Mode</i>	69
3.4.3	Einflüsse auf die Bildqualität	70
3.4.4	Durchführung.....	72
4	ERGEBNISSE	73
4.1	DIE PHASENSEPARATION DER LIPIDMISCHUNG DOPC/SPHINGOMYELIN/CHOLESTERIN (40:40:20).....	73
4.1.1	Phasenseparation in Riesenvesikeln	74
4.1.2	Untersuchung von Fluorophoren zur Markierung der <i>l_o</i> -Phase	76
4.2	PHASENSEPARIERTE LIPIDMISCHUNGEN IN PORENÜBERSPANNENDEN MEMBRANEN ALS MODELLSYSTEM FÜR DIE ZELLULÄRE PLASMAMEMBRAN	82
4.2.1	Untersuchung der Eigenschaften von phasenseparierten, porenüberspannenden Membranen.....	82
4.2.2	Laterale Mobilität der Lipide und der <i>l_o</i> -Domänen	88
4.2.3	Modulation der Phasenseparation in porenüberspannenden Membranen.....	92
4.2.4	Lipidreorganisation nach der Bindung von Shiga Toxin an porenüberspannende Membranen	103
4.2.5	Einfluss der Funktionalisierung poröser Substrate auf das Phasenverhalten porenüberspannender Membranen.....	111
4.2.6	Bindung von Cholera Toxin an G _{M1} in porenüberspannenden Membranen	117
4.2.7	Vergleich des Phasenverhaltens der untersuchten porenüberspannenden Membranen.....	123

4.3	EINFLUSS DER MOLEKULAREN STRUKTUR DES REZEPTORLIPIDS Gb ₃ AUF DAS PHASENVERHALTEN FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTER MEMBRANEN	125
4.3.1	Einfluss von Gb ₃ aus HeLa-Zellen auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) auf Silizium	126
4.3.2	Einfluss der α -Hydroxylierung in Gb ₃ auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) auf Silizium	129
4.3.3	Einfluss der α -Hydroxylierung in Gb ₃ auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) auf Mica	134
4.3.4	Einfluss von Gb ₃ mit einer ungesättigten Fettsäure auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) auf Silizium.....	140
4.3.5	Einfluss von Gb ₃ mit einer ungesättigten Fettsäure auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) auf Mica.....	146
5	DISKUSSION.....	155
5.1	PORENÜBERSPANNENDE MEMBRANEN ALS MODELLSYSTEM FÜR DIE ZELLULÄRE PLASMAMEMBRAN	155
5.1.1	Das Phasenverhalten von Membranen der untersuchten Lipidmischung	156
5.1.2	Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) in porenüberspannenden Membranen	158
5.1.3	<i>l_o</i> -Domänengröße in porenüberspannenden Membranen	162
5.1.4	Mobilität von <i>l_o</i> -Domänen in porenüberspannenden Membranen	164
5.1.5	Einfluss der Substratfunktionalisierung auf das Phasenverhalten porenüberspannender Membranen	168
5.1.6	Lipidreorganisation nach der Bindung von bakteriellen Toxinen an porenüberspannende Membranen.....	169

5.2	LOKALISATION VON GLYKOSPHINGOLIPIDEN	182
5.3	EINFLUSS DER MOLEKULAREN Gb ₃ -STRUKTUR AUF DIE MEMBRANORGANISATION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SHIGA TOXIN-BINDUNG	184
5.3.1	Einfluss der molekularen Gb ₃ -Struktur auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) auf Silizium.....	187
5.3.2	Einfluss der α -Hydroxylierung in Gb ₃ auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) auf Mica.....	189
5.3.3	Einfluss von Gb ₃ mit einer ungesättigten Fettsäure auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb ₃ (40:35:20:5) auf Mica.....	191
5.3.4	Zusammenfassendes Modell des Einflusses der molekularen Gb ₃ - Struktur auf die Membranorganisation.....	195
6	ZUSAMMENFASSUNG	201
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	203
8	ANHANG	223
8.1	SYMBOLVERZEICHNIS.....	223
8.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	224
8.3	CHEMIKALIEN, MATERIALIEN, GERÄTE UND SOFTWARE.....	226
8.3.1	Chemikalien.....	226
8.3.2	Materialien	227
8.3.3	Geräte.....	227
8.3.4	Software.....	229

1 Einleitung

1.1 Die zelluläre Plasmamembran

Biologische Membranen sind ein essentieller Zellbestandteil, deren wichtigste Funktion in der Begrenzung und Kompartimentierung von Zellen und damit der Schaffung von räumlich voneinander abgetrennten Reaktionsräumen besteht. Membranen ermöglichen einen gezielten Stoffaustausch zwischen den verschiedenen Kompartimenten durch eingelagerte Proteine, die Ausbildung von chemischen und elektrischen Gradienten zur Energiegewinnung und spielen eine essenzielle Rolle in Prozessen wie Signaltransduktion und Fusion.^[1]

Zelluläre Membranen sind hauptsächlich aus Lipiden, Steroiden und Proteinen aufgebaut. Die wichtigsten Lipidbestandteile umfassen Glycerophospholipide und (Glyko-)Sphingolipide. Diese Komponenten sind amphiphile Moleküle, die aus einer hydrophilen Kopfgruppe verknüpft mit hydrophoben Fettsäureketten bestehen. Durch den hydrophoben Effekt, unter Berücksichtigung der Geometrie, bilden Lipide eine Doppelschicht aus, in der sich die hydrophoben Fettsäureketten gegenüber stehen und die polaren Kopfgruppen zum umgebenden Wasser ausgerichtet sind.^[2]

Singer und Nicolson schlugen 1972 das *Fluid Mosaic*-Modell vor und beschrieben Membranen als zweidimensionale Flüssigkeit, die aus Lipiden gebildet wird. Darin eingebettet sind integrale Proteine, und weitere Proteine können peripher an die Lipiddoppelschicht gebunden sein. Durch die Betrachtung der Membran als „Lösungsmittel“ für Proteine konnte die laterale Diffusion von Lipiden und Proteinen erklärt werden.^[3]

Die Analyse verschiedener Organismen und deren Zellorganellen zeigte, dass die Zusammensetzung der Membranbestandteile je nach betrachteter Membran stark variiert.^[1] Auch die beiden Monoschichten einer Lipiddoppelschicht sind asymmet-

risch zusammengesetzt. So ist beispielsweise die Plasmamembran von roten Blutkörperchen auf der exoplasmatischen Seite mit Phosphatidylcholinen, Sphingomyelin und Glykosphingolipiden angereichert, während die innere Lipidmonoschicht hauptsächlich Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylserine enthält.^[4]

1.1.1 *Lipid Rafts*

Simons und Ikonen stellten 1997 das Konzept der *Lipid Rafts* vor.^[5] Sie postulierten die Existenz von transienten Membran-Nanodomänen in der zellulären Plasmamembran, die hochgeordnet und mit gesättigten Lipiden (wie z. B. (Glyko-)Sphingolipiden), Cholesterin und spezifischen Proteinen angereichert sind (Abb. 1-1).^[6] Es wird vermutet, dass Sphingomyelinmoleküle über ihre Amidbindung und Hydroxyl- bzw. Carbonylgruppen benachbarter Moleküle miteinander interagieren und somit ein Netzwerk bilden. In dieses Netzwerk kann Cholesterin eingelagert werden. Wasserstoffbrücken zwischen der Hydroxylgruppe des Cholesterins und der Amidbindung des Sphingomyelins fördern diese Kollokalisierung.^[7, 8] Die gebildeten Domänen sind mobil und bilden dynamische „Flöße“ (engl. *Rafts*), die von fluideren Membranbestandteilen umgeben sind.^[9] Sie werden in Verbindung gebracht mit wichtigen zellulären Prozessen wie etwa Signaltransduktion, intrazellulärem Transport und Proteinsortierung.^[10] Es wird vermutet, dass diese Nanodomänen Durchmesser im Bereich von 20 bis 200 nm aufweisen und damit unterhalb der Auflösungsgrenze konventioneller Lichtmikroskope liegen.^[11, 12] Die Entwicklung von Superresolutionsmethoden wie STED (*Stimulated Emission Depletion*)- und PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*)-Mikroskopie ermöglichte die Umgehung dieser Auflösungsgrenze. Eggeling *et al.* konnten mittels STED-Mikroskopie die Diffusion einzelner Sphingolipide in Membrandomänen mit einer Größe von ca. 20 nm detektieren und eine verminderte Durchgangszeit innerhalb dieser Domänen beobachten.^[13]

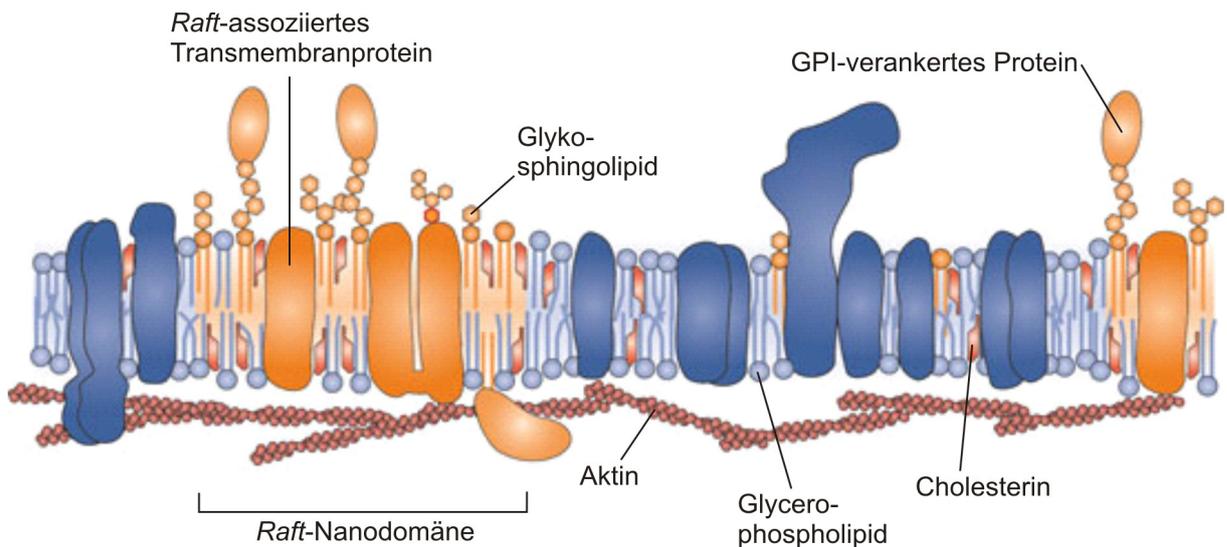


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der postulierten *Lipid Rafts* in der zellulären Plasmamembran. Abbildung nach Simons *et al.*^[14]

Detergens-resistente Membranfraktionen (DRMs)

Bevor die Untersuchung von Membrandomänen im Nanometerbereich durch technische Weiterentwicklung ermöglicht wurde, wurden vor allem indirekte Methoden angewendet. Eine dieser Methoden ist die Behandlung von Zellmembranen mit kalten, nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100.^[15] Sie lieferte Membranfraktionen, die durch das Detergens nicht solubilisiert wurden. Diese Detergens-resistenten Membranfraktionen (DRMs) sind angereichert mit Sphingolipiden, Cholesterin und bestimmten Membranproteinen (z. B. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine). Zu Beginn der 1990er Jahre wurden DRMs oft mit den postulierten *Lipid Rafts* gleichgesetzt. Da es aber möglich ist, dass die Detergens-Behandlung auch dazu führt, dass Proteine in DRMs enthalten sind, die nicht an *Lipid Rafts* assoziiert wären, kann diese Methode zu Fehlinterpretationen führen.^[16] Auch wurden, je nach verwendetem Detergens, Membranfraktionen erhalten, die in keiner Relation zu *Lipid Rafts* stehen. Dies liegt daran, dass DRMs erst durch die Zugabe des Detergens entstehen. Sie müssen also nicht zu einer bestimmten Membranfraktion gehören, die bereits vor Detergenzugabe existierte.^[17]

1.1.2 Einfluss des zellulären Zytoskeletts auf die Plasmamembran

Die zelluläre Plasmamembran besitzt eine asymmetrische Lipidzusammensetzung und ist an das Zytoskelett der Zelle gebunden. Das Zytoskelett verleiht der Zelle Stabilität und Form, lässt aber eine gewisse Dynamik zu. Dadurch reguliert es die Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umgebung. In tierischen Zellen besteht das Zytoskelett hauptsächlich aus drei Komponenten (Abb. 1-2). Mikrotubuli sind für die Lokalisation der Zellorganellen und den intrazellulären Transport verantwortlich. Intermediärfilamente sorgen für die mechanische Stabilität und Aktinfilamente regulieren die Form und Bewegung der Zelle.^[4] Insgesamt zeigen diese Zytoskelettkomponenten eine große Strukturvielfalt. So können beispielsweise Aktinfilamente ein stark verzweigtes Netzwerk bilden, das dicht an die Plasmamembran assoziiert ist. Aktin kann aber auch als Bündel (engl. *Actin Fibers*) vorliegen und die gesamte Zelle durchspannen. Des Weiteren werden oft Aktin-reiche Strukturen gefunden, die an Membraninvaginationen assoziiert sind (Abb. 1-2). Die drei aufgeführten Zytoskelettkomponenten sind strukturell sehr unterschiedlich, aber trotzdem voneinander abhängig. Einflüsse auf die Organisation der Plasmamembran können daher selten auf eine einzelne Komponente des Zytoskeletts zurückgeführt werden. So stört beispielsweise die Depolymerisierung der Mikrotubuli die Polarität des Aktin-Skeletts, was zu einer Reorganisation der Aktinfilamente und damit zur Bildung von Aktinbündeln führt.^[18]

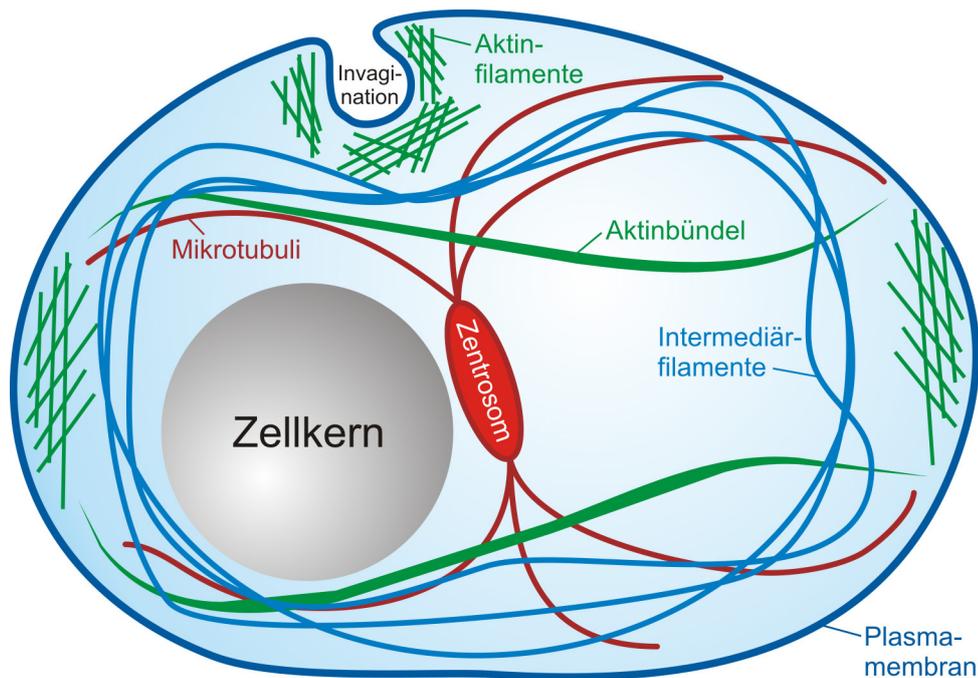


Abb. 1-2: Darstellung einer eukaryotischen Zelle mit der umgebenden Plasmamembran und den wichtigsten Zytoskelettkomponenten.

Die Plasmamembran kann auf vielfältige Weise mit dem Zytoskelett verbunden sein, dieser Bereich wird auch Zellkortex genannt. Im Folgenden werden vier Fälle vorgestellt, die diese Variationsbreite exemplarisch darstellen sollen. Das Zytoskelett kann direkt mit der Plasmamembran verbunden sein. Dazu müssen die Zytoskelettkomponenten eine spezifische Sequenz tragen, die an Lipide innerhalb der Membran bindet (Abb. 1-3 A). Ein Beispiel hierfür ist die Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne). Sie besteht aus einem siebensträngigen β -Sandwich, an das eine amphipatische α -Helix koordiniert ist. Diese Domäne bindet spezifisch an Phosphatidylinositollipide in der Plasmamembran und kann somit Zytoskelettkomponenten direkt mit der Plasmamembran verknüpfen.^[19]

Zytoskelettfilamente können auch direkt an Transmembranproteine binden (Abb. 1-3 B). Der Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) beispielsweise ist ein Transmembranprotein mit Tyrosinkinaseaktivität und bindet direkt an Aktinfilamente. Des Weiteren ist es möglich, dass Zytoskelettfilamente über Adapterproteine an Transmembranproteine binden (Abb. 1-3 C). So bindet das als Adapter fungierende AnkyrinR an den Anionen-Austauscher 1 (engl. *Anion Exchanger 1*, AE1) in der Plasmamembran von Erythrozy-

ten. Dieser katalysiert den Antiport von Chlorid und Hydrogencarbonat. An das AnkyrinR wiederum kann das Aktin-Spektrin-Netzwerk des Erythrozyten binden, ein hexagonales Netzwerk, gebildet aus Spektrin-Tetrameren, die verknüpft sind mit kurzen Aktinfilamenten.^[20]

Das Zytoskelett kann außerdem über membranassoziierte Proteine an die Plasmamembran geknüpft sein (Abb. 1-3 D). Beispiele für solche Proteine sind die der Ezrin/Radixin/Moesin-Familie (ERM-Proteine). Ezrin beispielsweise bindet über seine N-terminale Region an L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in der Plasmamembran der Mikrovilli und stellt über die Bindung der C-terminalen Region die Verbindung zu Aktinfilamenten her.

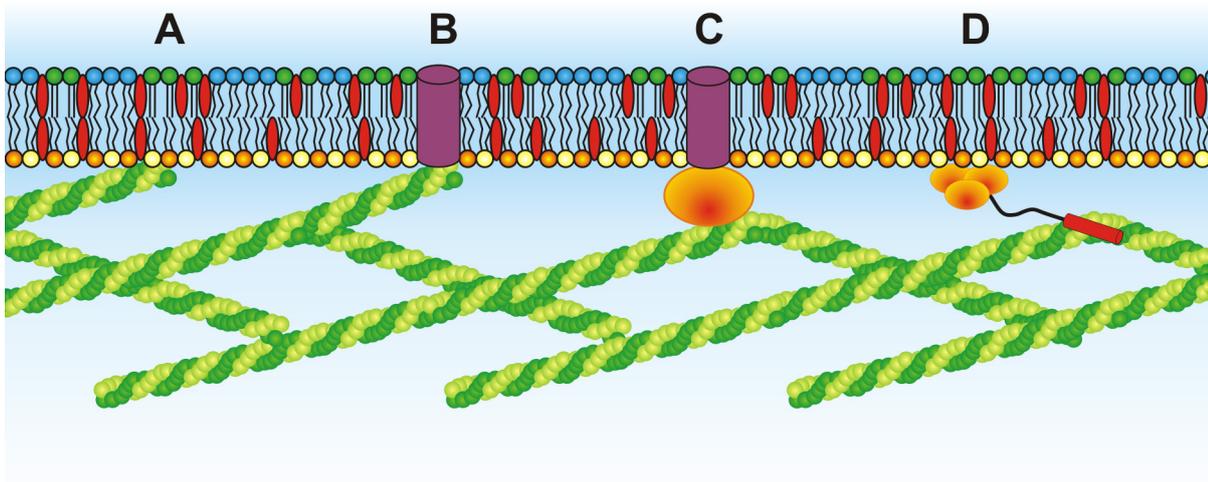


Abb. 1-3: Darstellung von Zytoskelett-Plasmamembran-Interaktionen am Zellkortex. (A) Bindung von Aktinfilamenten an Lipide der Plasmamembran. (B) Bindung von Aktinfilamenten an Transmembranproteine. (C) Adapterproteine stellen eine Verbindung zwischen Transmembranproteinen und dem Aktinnetzwerk her. (D) Membran-assoziierte Proteine binden einerseits an Lipide der Plasmamembran und andererseits an das Aktinnetzwerk. Abbildung nach Doherty *et al.*^[18]

Die Verknüpfung des Zytoskeletts mit der Plasmamembran hat Auswirkungen auf die Eigenschaften dieser. So können durch das Zytoskelett Hindernisse in der Plasmamembran erzeugt werden, die die laterale Diffusion von Lipiden und Proteinen beeinflussen (Abb. 1-4). Es entstehen Bereiche, in denen eine freie Diffusion möglich ist. Diese Bereiche sind umgeben von Membranregionen, in denen die Membran durch Proteine am Zytoskelett verankert ist.^[21-23]

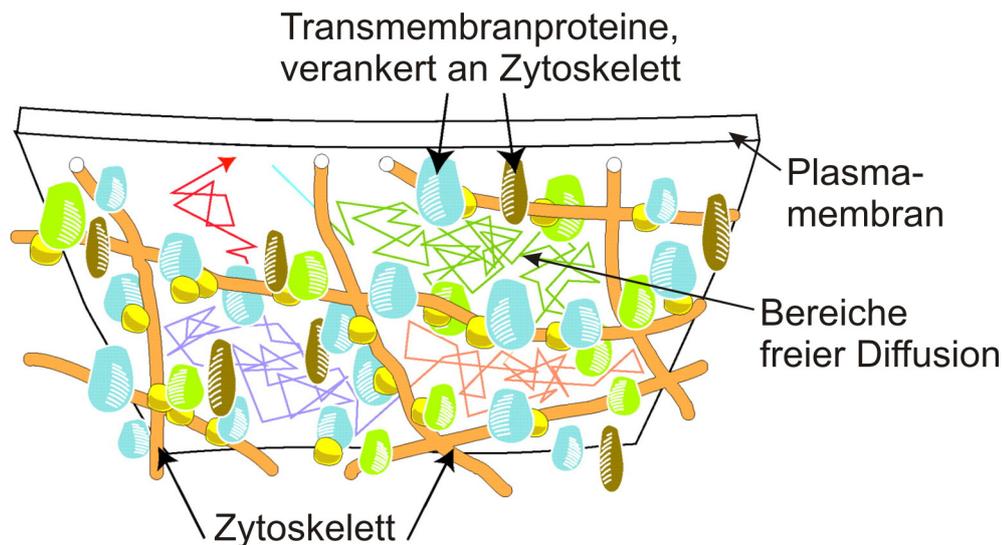


Abb. 1-4: *Picket-Fence*-Modell der zellulären Plasmamembran. Das Zytoskelett bindet an die Transmembranproteine in der Membran und immobilisiert diese. Innerhalb dieser eingefassten Membranbereiche ist eine freie Diffusion möglich.^[22]

Seit längerem wird diese *Picket-Fence*-Theorie untersucht, aber erst die Entwicklung hochauflösender Methoden ermöglichte weitere Einblicke in die Zytoskelett-Plasmamembran-Wechselwirkungen. *Single-Particle Tracking*- und *Laser Tweezer*-Experimente an Zellen zeigten eine gehinderte Diffusion von Plasmamembranproteinen, die auf den Einfluss des Zytoskeletts zurückgeführt werden konnte.^[21] Einzelmoleküluntersuchungen mittels *Total Internal Reflection* (TIRF)-Mikroskopie an Fibroblasten zeigten, dass die Diffusionskoeffizienten von Lipiden beeinflusst werden. Es wurde eine Kompartimentierung der Plasmamembran beobachtet, die auf die Wechselwirkung des Aktinskeletts mit dieser zurückgeführt werden konnte. An den Grenzen der Kompartimente wird die Diffusion der Lipide gehindert und sie „springen“ in das nächste Kompartiment (engl. *Hop Diffusion*). Bei diesen Untersuchungen wurde die gehinderte Diffusion von fluoreszenzmarkierten Phospholipiden auf der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran detektiert, obwohl das Zytoskelett an die cytosolische Membranseite gebunden ist.^[22] *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS)-Experimente mit fluoreszenzmarkierten Sphingolipiden und GPI-verankerten Proteinen an COS-7-Zellen bestätigten diese gehinderte Diffusion, induziert durch die Kompartimentierung der Plasmamembran.^[24]

Die Maschenweite der unterliegenden Zytoskelett-Netzwerke kann stark variieren. In den beiden erwähnten Untersuchungen von Fujiwara *et al.* und Lenne *et al.* wurde die Maschenweite des unterliegenden Aktinnetzwerks in Rattennieren-Fibroblasten auf Werte zwischen 230 und 260 nm bestimmt. ^[22, 24] Keratinozyten aus Ratten dagegen weisen nur eine Netzwerk-Maschenweite von ca. 40 nm auf^[25], und *in vitro*-Experimente mit Aktinfilamenten zeigten, dass diese nach der Polymerisation ein Netzwerk mit Maschenweiten von 0,1 bis 1 μm ausbilden.^[26]

In STED-FCS-Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Sphingolipiden und Glykosphingolipiden in der Plasmamembran von PtK2-Zellen wurde ebenfalls eine gehinderte Diffusion beobachtet. Diese zeigte aber nicht nur eine Abhängigkeit vom unterliegenden Zytoskelett, sondern auch vom Cholesterin-Gehalt der Plasmamembran.^[27] Nach der Cholesterin-Extraktion wurde eine ähnlich ungehinderte Diffusion wie im Falle des fluoreszenzmarkierten 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamins (PE) gefunden, welches nicht in *Lipid Rafts* vermutet wird.^[13] Mueller *et al.* postulierten, dass nicht nur das zelluläre Zytoskelett zur gehinderten Diffusion beiträgt, sondern auch die Assoziation von (Glyko-)Sphingolipiden an Cholesterinangereicherte Membrandomänen, wie sie in Kap. 1.1.1 vorgestellt wurden.^[27]

1.2 Artificielle Membranen als Modellsystem und deren Phasenverhalten

Biologische Membranen sind sehr komplexe, aus einer Vielzahl von Lipiden und Proteinen zusammengesetzte Systeme. Zur Untersuchung des Phasenverhaltens von Lipiden und der Proteinanbindung an Membranen werden häufig artificielle Modellmembranen eingesetzt. Diese bieten den Vorteil, dass deren Zusammensetzung kontrolliert werden kann. Dadurch ist es möglich, ein Modellsystem auf die wesentlichen Parameter zu reduzieren und einen Rückschluss auf das Verhalten der eingesetzten Komponenten zu ziehen. Im Folgenden werden die wichtigsten artifizialen Membransysteme als Modelle für die zelluläre Plasmamembran vorgestellt.

1.2.1 Phasenseparation in Membranen

Zur Untersuchung der postulierten *Lipid Rafts* wurden Lipidsysteme entwickelt, die das Phasenverhalten der Lipide in der zellulären Plasmamembran imitieren. Zunächst soll daher allgemein auf das Phasenverhalten von Lipiden eingegangen werden.

In biologischen Membranen liegen Lipide in der lamellaren Phase vor. Unterhalb der jeweiligen Umwandlungstemperatur bilden sie die sogenannte Gelphase aus (L_{β}' , auch als *Solid-ordered* S_o bezeichnet), in der die Kohlenwasserstoffketten gestreckt sind und eine *all-trans*-Konformation einnehmen (Abb. 1-5). Sie sind sehr dicht gepackt und können um einen Winkel von 30° gegen die Membrannormale geneigt sein. Durch die dichte Packung ist die laterale Lipiddiffusion stark eingeschränkt. Wird die Temperatur erhöht, erfolgt bei manchen Lipiden die Vorumwandlung, und die sogenannte *Ripple*-Phase (P_{β}') wird gebildet. Die Fettsäureketten sind immer noch gestreckt, aber sie zeigen eine Überstruktur in Form einer Wellung (Abb. 1-5). Bei weiterer Temperaturerhöhung über die Hauptumwandlungstemperatur T_m bildet sich die fluide Phase, die auch als flüssig-kristalline bzw. *liquid-disordered* Phase (L_{α} bzw. l_d) bezeichnet wird (Abb. 1-5). Diese Phase ist durch eine hohe Beweglichkeit gekennzeichnet, da die Fettsäureketten nun nicht mehr gestreckt vorliegen und mehr *gauche*-Konformere ausbilden. Allgemein ist die laterale Mobilität von Lipiden in der fluiden Phase höher. Durch die Bildung von *gauche-trans-gauche*-Kinken (gtg-Kinken) wird die Dicke der Membran geringer. In Anwesenheit von Cholesterin bilden Lipidmembranen eine weitere lamellare Phase aus. Die sogenannte *liquid-ordered*- (l_o) Phase ist einerseits so dicht gepackt wie in der S_o -Phase. Andererseits zeigen die Lipide in der l_o -Phase eine ähnliche Beweglichkeit wie in der fluideren L_{α} -Phase (Abb. 1-5).^[1, 2, 28]

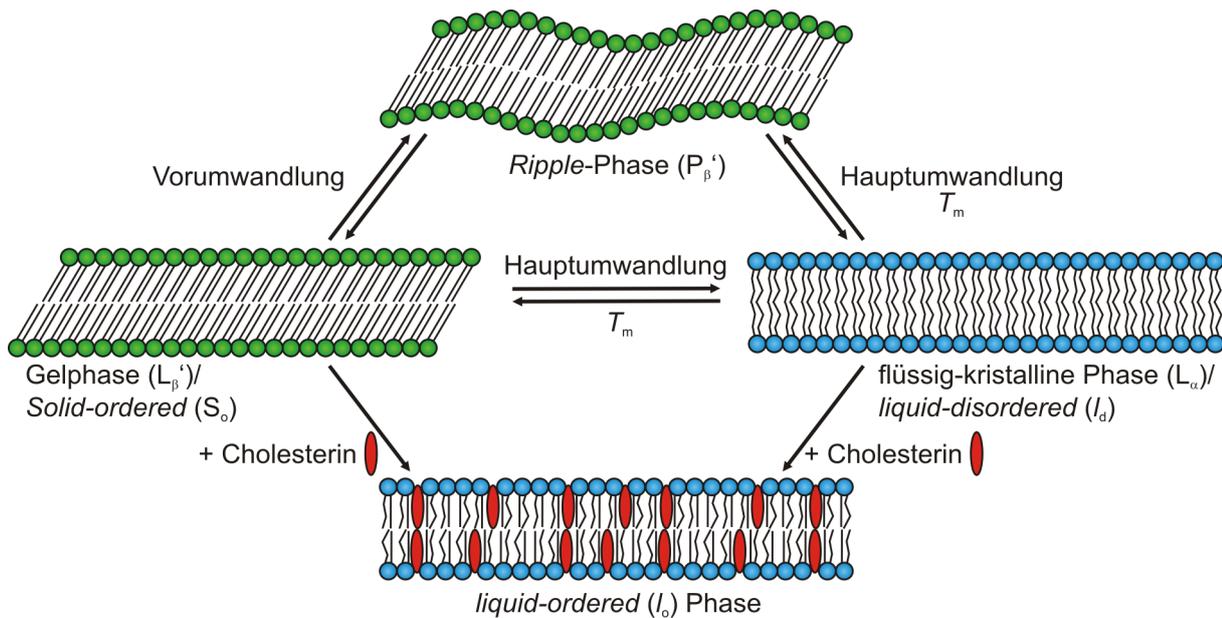


Abb. 1-5: Phasenverhalten von Lipiden in Membranen. T_m bezeichnet die Phasenumwandlungstemperatur des jeweiligen Lipids. Abbildung nach Eeman^[28] und Luckey^[1].

An der Bildung der l_d -Phase wird der Einfluss des Cholesterins auf die Lipiddoppelschicht erkennbar. In geordneten Membranbereichen (S_o) wird die Ordnung der Lipide durch die Anwesenheit von Cholesterin gestört. Hingegen erhöht Cholesterin in ungeordneten Membranbereichen (l_d) die Ordnung der Lipide. Die Hauptumwandlungstemperatur T_m wird durch das Einbringen von Cholesterin in Membranen nicht verändert.^[2]

Die in biologischen Zellen postulierten *Lipid Rafts* sind Sphingolipid- und Cholesterin-angereicherte Domänen, umgeben von fluideren Membranbestandteilen (Kap. 1.1.1). Um diese Situation nachzubilden, werden ternäre Lipidmischungen eingesetzt, die ähnliche Eigenschaften aufweisen. Ein Lipid mit einer niedrigen Phasenumwandlungstemperatur soll die fluiden Bestandteile der Membran darstellen, während ein Lipid mit höherer Umwandlungstemperatur zusammen mit Cholesterin die geordneten Domänen bilden soll. Zur Visualisierung von verschiedenen Membrandomänen werden geringe Anteile an Fluoreszenzsonden in die Membranen eingebracht. Je nach Verteilungskoeffizient der Sonde zwischen der geordneten und der ungeordneten Phase der Membran reichert sich diese selektiv in einer Phase an. Die ternäre Lipidmischung 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC)/Sphingo-

myelin/Cholesterin wird häufig als Modellsystem für die exoplasmatische Seite der zellulären Plasmamembran eingesetzt.^[29-31]

Die Membranen von Riesenvesikeln (engl. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUVs) dieser Zusammensetzung zeigen über einen breiten Mischungsbereich die Koexistenz einer *liquid-disordered-* (l_d) und einer *liquid-ordered-* (l_o) Phase, dargestellt in einem ternären Phasendiagramm (Abb. 1-6). Die l_d -Phase wird hauptsächlich von DOPC gebildet. Viele Fluorophore reichern sich aufgrund der Größe der fluorophoren Gruppe in dieser Phase an.^[32, 33] Dadurch erscheint die l_d -Phase hell und die hauptsächlich aus Sphingomyelin und Cholesterin bestehende l_o -Phase zeigt sich als dunkle Domäne.

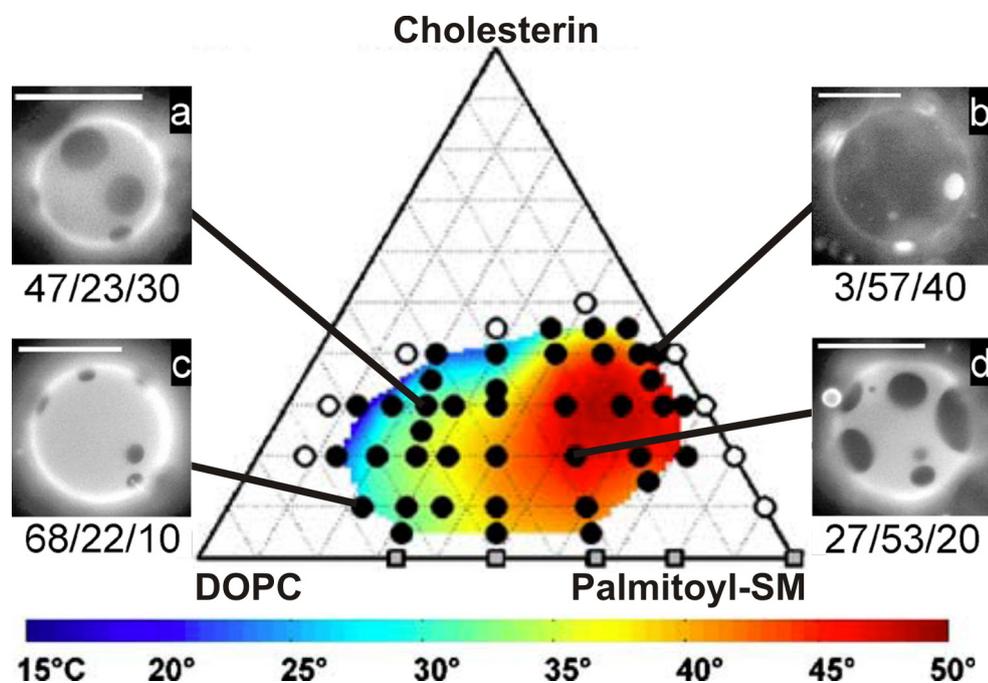


Abb. 1-6: Ternäres Phasendiagramm der Lipidmischung DOPC/Palmitoyl-Sphingomyelin/Cholesterin in einem Temperaturbereich von 15 bis 50 °C. Dargestellt sind GUVs verschiedener Lipidzusammensetzung, die eine Phasenseparation bei 25 °C zeigen. Die helle Phase ist DOPC-angereicht und die dunkle Phase besteht hauptsächlich aus Sphingomyelin und Cholesterin. Maßstabsbalken: 20 μ m. Abbildung zusammengestellt aus Veatch^[30] und Veatch^[31].

Die beobachteten l_o -Domänen sollen in dieser Lipidmischung den postulierten *Lipid Rafts* entsprechen. Einen ersten Hinweis darauf ergaben Untersuchungen zur Modulation des Cholesterin-Gehaltes von artifiziellen und zellulären Lipidmembranen. Mit Hilfe der Cholesterin-Oxidase (COase) kann Cholesterin zu Cholest-4-en-3-on

oxidiert werden. Dadurch können keine Wasserstoffbrücken mehr zwischen Sphingomyelin und Cholesterin ausgebildet werden, wie sie in *Lipid Rafts* vermutet werden. In artifiziellen Membranen führte dies zum Verschwinden der geordneten Phase.^[7] In STED-FCS-Experimenten an der Plasmamembran von PtK2-Zellen wurde vor COase-Inkubation eine gehinderte Diffusion von Sphingomyelin detektiert, die ebenfalls nach der Cholesterin-Oxidation nicht mehr auftrat.^[27] Dies deutet auf eine Wechselwirkung zwischen Sphingomyelin und Cholesterin hin, die nach der Cholesterin-Oxidation durch COase nicht mehr auftritt. Ein Problem dieser Methode ist, dass das oxidierte Cholesterin in der Lipiddoppelschicht verbleibt und somit noch weiterhin die laterale Organisation der Lipide stören kann. Eine weitere Methode zur Reduzierung des Cholesteringehaltes der Membran ist die selektive Extraktion mit Hilfe von β -Cyclodextrinen (Kap. 3.2.5). Cholesterin wird dabei in die hydrophobe Kavität des Cyclodextrins eingelagert und kann aufgrund der hohen Löslichkeit des Interkalationskomplexes einfach entfernt werden.^[34] In phasenseparierten, festkörperunterstützten Membranen konnte das Verschwinden der Phasenseparation nach Inkubation mit β -Cyclodextrin beobachtet werden.^[35] Ähnliche STED-FCS-Experimente an der oben erwähnten Plasmamembran von PtK2-Zellen zeigten auch hier eine ungehinderte Diffusion von Sphingomyelin nach der Cholesterinextraktion.^[27] Die Cholesterinextraktion mittels β -Cyclodextrin hat den Vorteil, dass kein oxidiertes Produkt, wie im Falle der COase-Reaktion, in der Membran verbleibt und somit einen Einfluss auf die laterale Organisation der Lipide ausüben kann.

1.2.2 Riesenvesikel und festkörperunterstützte Membranen

Im Folgenden soll die Phasenseparation von Lipiddoppelschichten in zwei bekannten und oft untersuchten Modellmembransystemen vorgestellt werden. Dazu wird einerseits die Phasenseparation in Membranen von Riesenvesikeln erläutert und anschließend die Situation in festkörperunterstützten Membranen.

Phasenseparation in Membranen von Riesenvesikeln

Als Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran werden häufig Riesenvesikel (GUVs) untersucht, da sie mit Durchmessern von 5-50 μm (je nach Präparation und Lipidzusammensetzung) eine ähnliche Größe wie eukaryotische Zellen besitzen.^[4] Die Heterogenität der zellulären Plasmamembran wird in GUVs durch die Verwendung von Multikomponentenmischungen simuliert. Ternäre Lipidmischungen, wie beispielsweise die Mischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20), weisen eine Phasenseparation in l_o - und l_d -Phase auf (Kap. 1.2.1). Die Größe der gebildeten l_o -Domänen, die den postulierten *Lipid Rafts* in Zellen zugeordnet werden, befindet sich allerdings im Mikrometerbereich.^[30] Dies ermöglicht die Untersuchung der l_o -Domänen mittels Fluoreszenzmikroskopie, entspricht aber nicht den in der Plasmamembran erwarteten Nanodomänen. Auch *Giant Plasma Membrane Vesicles* (GPMVs), GUVs präpariert aus der Plasmamembran biologischer Zellen durch sogenanntes *Blebbing*, zeigen bei Temperaturen zwischen 5 und 23 °C koexistierende l_d - und l_o -Domänen im Mikrometerbereich. Es wird vermutet, dass eine Kondensation zu größeren Domänen durch das fehlende unterliegende Zytoskelett ermöglicht wird.^[36] Diese ist aufgrund der Absenkung der Linienenergie bevorzugt. Eine Linienenergie tritt an der Grenze zwischen zwei koexistierenden fluiden Phasen auf. In der geordneten l_o -Domäne wird durch das Cholesterin eine höhere Ordnung induziert und die Domäne ist an gesättigten Sphingolipiden angereichert. Dadurch ist eine dichtere Packung der Lipide möglich, die zu einer höheren Membrandicke im Bereich der l_o -Domänen führen kann, verglichen mit der umgebenden Membran (engl. *Height Mismatch*). Die hydrophoben Fettsäureketten der Lipide in l_o -Domänen sind an deren Rändern dem umgebenden Wasser ausgesetzt, was energetisch ungünstig ist. Als Folge dessen wird die Membran an diesen Grenzen deformiert und die Linienspannung der Domäne erhöht.^[37-40] Der Zusammenhang zwischen der Linienspannung γ und der Linienenergie E_γ ist über Gl. 1-1 definiert.

$$E_\gamma = \gamma \cdot U \quad \text{Gl. 1-1}$$

Dabei ist U der Umfang der betrachteten Domäne. Aus Gl. 1-1 wird ersichtlich, dass die Linienenergie E_γ durch die Erniedrigung des Domänenumfangs minimiert werden kann. In Lipidmembranen mit koexistierenden, fluiden Domänen werden oft kreisförmige l_o -Domänen beobachtet, da ein Kreis bei konstanter Fläche die geringste Grenzlinie besitzt. Diese Domänen können zur Minimierung der gesamten Linienenergie des GUVs kondensieren, da eine größere Domäne einen kleineren Umfang hat, als viele kleine Domänen. Zur genaueren Betrachtung der Domänen müssen allerdings noch weitere Parameter wie die Krümmung, Steifigkeit und Spannung der Membran berücksichtigt werden sowie in biologischen Zellen Prozesse wie *Lipidrecycling* und der Einfluss des Zytoskeletts.^[41]

Phasenseparation in festkörperunterstützten Membranen

Ein oft verwendetes Modellsystem zur Untersuchung der lateralen Membranorganisation sind festkörperunterstützte Lipidmembranen. Sie können auf verschiedenen Substraten wie Silizium oder Glimmer präpariert werden. Beide Substrate sind jeweils hydrophil und negativ geladen, wobei Glimmer eine etwas stärkere negative Ladung aufweist.^[42] Festkörperunterstützte Membranen auf diesen beiden Substraten sind nicht direkt an das Substrat gebunden, sondern es bildet sich eine 1 bis 2 nm dicke Wasserschicht zwischen dem Substrat und der unteren Lipidmonoschicht aus.^[43, 44]

Der wesentliche Vorteil dieses Modellsystems besteht in der hohen Langzeitstabilität der Membran aufgrund des Kontaktes zum Substrat. Dadurch sind festkörperunterstützte Membranen geeignet für hochauflösende Messmethoden wie Rasterkraftmikroskopie (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Bindung an das Substrat das Phasenverhalten der Membran beeinflussen kann. Während Membranen in GUVs und Lipidmonoschichten l_o -Domänen mit Größen im Mikrometerbereich zeigen, werden in festkörperunterstützten Membranen auf Glimmer oder Silizium oft submikroskopische Domänen im Nanometerbereich beobachtet.^[44, 45] Festkörperunterstützte Membranen werden oft durch Spreiten von kleinen, unilamellaren Vesikeln (engl. *Small Unilamellar Vesicles*, SUVs) mit

Durchmessern zwischen 20 und 100 nm erhalten. Beim Spreiten von SUVs dieser Größe, zusammengesetzt aus einer phasenseparierten ternären Lipidmischung, führt die Interaktion des Substrates mit der unteren Lipidmonoschicht zu einer reduzierten Mobilität der l_o -Domänen. Dadurch wird keine Kondensation zu größeren l_o -Domänen beobachtet.^[44]

1.2.3 Porenüberspannende Membranen

Porenüberspannende Membranen kombinieren die Vorteile der bereits vorgestellten Modellmembransysteme. Sie stellen ein Hybridsystem dar, da die Bindung an das Substrat einerseits zur Stabilisierung der Membran führt. Andererseits werden über den Poren freitragende Membranen ausgebildet.

Als Grundlage dienen oft poröse Siliziumnitrid-Substrate mit Porendurchmessern zwischen 0,45 und 2,0 μm , die zunächst mit einer Titan-Schicht und anschließend mit einer Gold-Schicht versehen werden. Darauf können Thiole chemisorbieren. Die Ausbildung der lösungsmittelfreien, porenüberspannenden Membranen erfolgt durch Spreiten von SUVs mit einem Durchmesser, der größer ist als der Porendurchmesser des Substrats (Abb. 1-7).

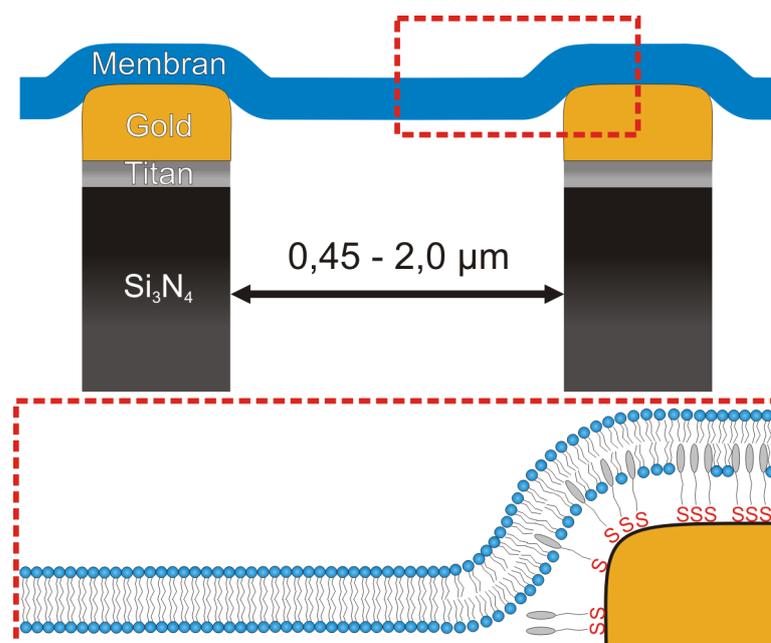


Abb. 1-7: Darstellung des Aufbaus von porenüberspannenden Membranen. Zur Funktionalisierung der Porenstege ist das Spacerlipid CPEO3 (Kap. 3.1.4) schematisch abgebildet.

Bisher wurden porenüberspannende Membranen mit Porendurchmessern im Mikrometerbereich vorwiegend durch die *Painting*-Technik erhalten.^[46, 47] Ein Nachteil dieser Technik ist das eingesetzte organische Lösungsmittel, das nicht komplett aus den porenüberspannenden Membranen entfernt werden kann. Zur Untersuchung der lateralen Organisation sind die so hergestellten Membranen nicht geeignet, da das Lösungsmittel die gewünschte Phasenseparation beeinflussen kann.

Lösungsmittelfreie porenüberspannende Membranen wurden in bisherigen Arbeiten zur Untersuchung der Mechanik^[48–50] und zur Etablierung eines Fusionsassays eingesetzt.^[51]

In dieser Arbeit sollen porenüberspannende Membranen als Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran dienen. Die Kopplung der Membran an die Stegbereiche des Substrats soll die Bindung der zellulären Plasmamembran an das Zytoskelett im Bereich des Zellkortex simulieren.

1.3 Shiga Toxin und das Rezeptorglykosphingolipid Gb₃

Das Shiga Toxin (STx, 70,5 kDa) wird von dem Bakterium *Shigella dysenteriae* produziert und gehört strukturell zu den AB₅-Proteinen.^[52, 53] Zu dieser Klasse gehören ebenfalls das Cholera Toxin (CTx) und die Shiga-like Toxine (SLTx), die von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) produziert werden. Diese werden auch als Verotoxine bezeichnet, da sie in der Lage sind, Vero-Zellen zu töten.^[54] Infektionen mit EHEC führen zu Diarrhö, hämorrhagischer Colitis und können das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) hervorrufen.^[55] HUS ist eine Hauptursache von schweren Nierenschäden bei Kindern, die zum Tod führen können.^[56] Im Mai bis Juni 2011 ereignete sich in Deutschland ein großer EHEC-Ausbruch.^[57] Dieser wurde von einem seltenen Stamm mit dem Serotyp O104:H4, ein hybrider Stamm aus enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) und EHEC, hervorgerufen. Dabei waren insgesamt 4 000 Menschen betroffen, 838 davon entwickelten HUS und 50 Menschen starben. Die Erreger wurden in Sprossen aus Bockshornkleesamen identifiziert.^[58]

Struktur von Shiga Toxin

Das Shiga Toxin besteht aus zwei Untereinheiten. Die monomere A-Untereinheit (STxA, 287 AS, 32 kDa) ist die toxische Komponente des Proteins (blaue Untereinheit in Abb. 1-8). Sie besitzt N-Glykosidaseaktivität an der 28 S rRNA, inhibiert dadurch die Proteinbiosynthese und verursacht somit den Zelltod.^[59]

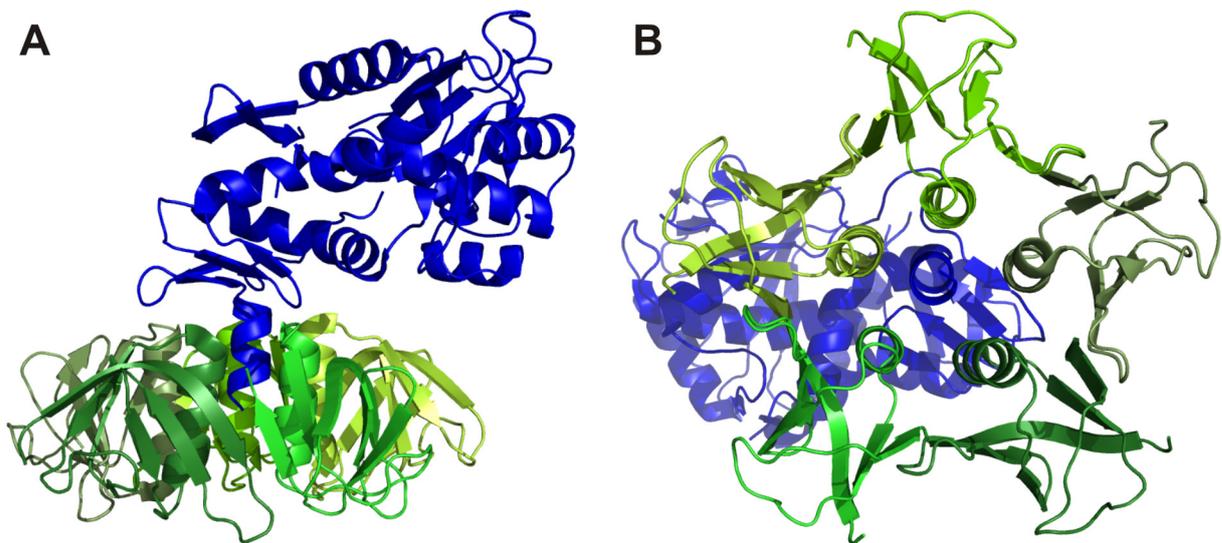


Abb. 1-8: Kristallstruktur des Shiga Toxins (PDB 1DM0). Die A-Untereinheit (STxA) ist blau dargestellt und die fünf Monomere der B-Untereinheit (STxB) in verschiedenen Grüntönen. (A) Seitenansicht und (B) Ansicht von unten mit Darstellung der pentameren STxB-Struktur.^[60]

STxA ist nicht-kovalent an die B-Untereinheit (STxB, grüne Untereinheit in Abb. 1-8) gebunden. Diese ist verantwortlich für die Bindung an den zellulären Gb₃-Rezeptor (Globotriaosylceramid, auch bekannt als CD77 und P^k-Blutgruppen-Antigen), die Aufnahme des Toxins in die Zelle und den intrazellulären Transport. Die B-Untereinheit wird gebildet aus fünf Monomeren, die jeweils aus 69 Aminosäuren aufgebaut sind (7,7 kDa pro Monomer). Jedes Monomer enthält eine α -Helix und sechs β -Faltblätter. Die Kristallstruktur zeigt, dass die Monomere einen pentameren Ring mit einer zentralen Pore bilden. Die Pore besitzt einen Durchmesser von etwa 11 Å und wird durch die α -Helices begrenzt.^[61] Alle Monomere sind untereinander durch Wechselwirkungen der β -Faltblätter verbunden. Jedes Monomer besitzt drei Bindungsstellen für den Gb₃-Rezeptor, die in Abb. 1-9 dargestellt sind.^[59, 62] Das neutrale Glykosphingolipid besteht aus einem Sphingosin-Grundgerüst, verestert mit einer Fettsäure und einem Trisaccharid in der Kopfgruppe (Kap. 3.1.1).

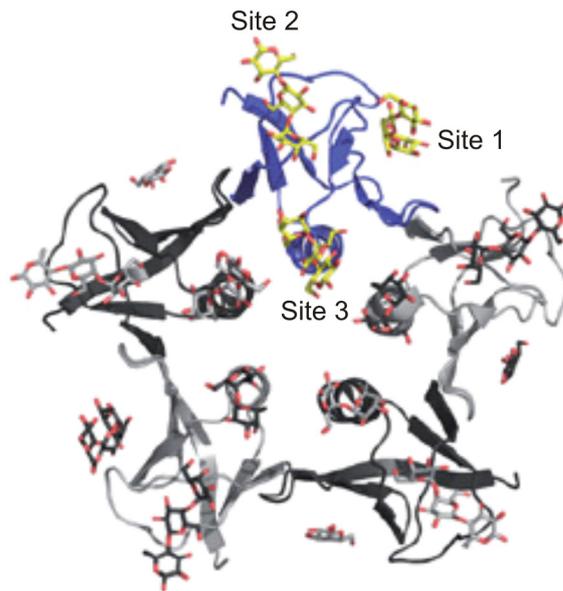


Abb. 1-9: Kristallstruktur der STxB-Untereinheit mit gebundenem Gb₃. Farblich hervorgehoben sind ein Monomer (blau) und die drei Bindungsstellen (*Site 1-3*) mit den Trisaccharid-Kopfgruppen gebundener Gb₃-Moleküle (gelb/rot). Abbildung nach Johannes *et al.*^[63]

Die Bindung von STxB an den Rezeptor Gb₃

Die Gb₃-Bindungsstellen sind auf der STxA-abgewandten Seite des STxB-Pentamers angeordnet und weisen alle in eine Richtung. Sie besitzen unterschiedliche Affinitäten zu Gb₃. Die stärkste Bindung erfolgt über die zweite Bindungsstelle (*Site 2*) durch Wasserstoffbrücken mit dem Trisaccharid in Gb₃. Die zweitstärkste Bindung erfolgt über die Bindungsstelle 1 (*Site 1*), die sich zwischen zwei benachbarten Monomeren befindet. Dort bindet die Aminosäure Phe30 über hydrophobe Stapelinteraktionen an die terminale Galactose des Gb₃-Rezeptors und Wasserstoffbrücken zu nahegelegenen polaren Aminosäuren werden ausgebildet. Die schwächste Bindung erfolgt durch hydrophobe Stapelinteraktionen zum Trisaccharid in Gb₃ über die Aminosäure Trp34 an der dritten Bindungsstelle 3 (*Site 3*). Diese befindet sich am Anfang jeder α -Helix. Zunächst binden alle Rezeptormoleküle an Bindungsstellen, die eine hohe Affinität für Gb₃ besitzen. Sind alle hochaffinen Bindungsstellen gesättigt, so binden schließlich weitere Gb₃-Moleküle an alle unbesetzten Bindungsstellen (Abb. 1-10).^[64]

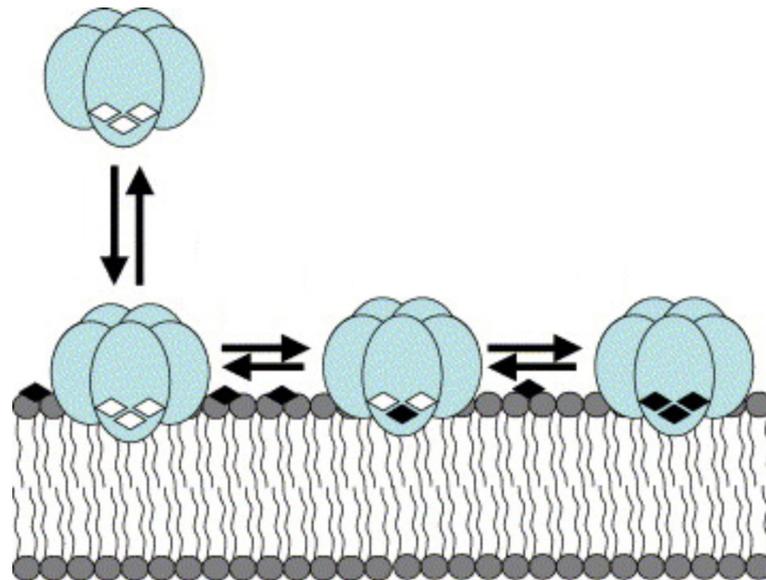


Abb. 1-10: Modell für die Bindung von STxB (hellblau) mit besetzten (schwarz Rauten) und unbesetzten (weiße Rauten) Bindungsstellen an eine Gb₃-haltige (schwarze Rauten) Membran. Abbildung modifiziert nach Pina et al.^[64]

Durch die hohe Anzahl an Bindungsstellen (15 pro STxB-Pentamer) ist STxB in der Lage, Gb₃-Rezeptormoleküle zu clustern. Diese Anreicherung von Glykosphingolipiden unterhalb des Proteins kann zu einer negativ gekrümmten Lipiddoppelschicht führen. Symmetrische lamellare Membranen sind nicht gekrümmt, weisen aber einen mechanischen Stress innerhalb der Lipiddoppelschicht auf, da Lipide von ihrer optimalen Form (z. B. Keilform, je nach Lipid) abweichen müssen, um eine planare Membran ausbilden zu können. Bindet STxB an bis zu 15 Gb₃-Moleküle in einer Lipidmonoschicht der Membran, so wird eine zusätzliche Asymmetrie in der Membran erzeugt, die zur Ausbildung einer negativen Krümmung führt (Abb. 1-11 A). Die somit erhöhte Membranenergie kann durch die Bildung von STxB-Clustern minimiert werden, da insgesamt der *Hydrophobic Mismatch* geringer wird (Abb. 1-11 B). Bei der Bindung von STxB wird die Ordnung der Lipide erhöht. Außerdem erhöht sich die Membrandicke (Abb. 1-11 C). Besitzt die Membran eine niedrige Membranspannung, so führen die STxB-Cluster zur Ausbildung von Membraninvaginationen (Abb. 1-11 D).^[63, 65, 66]

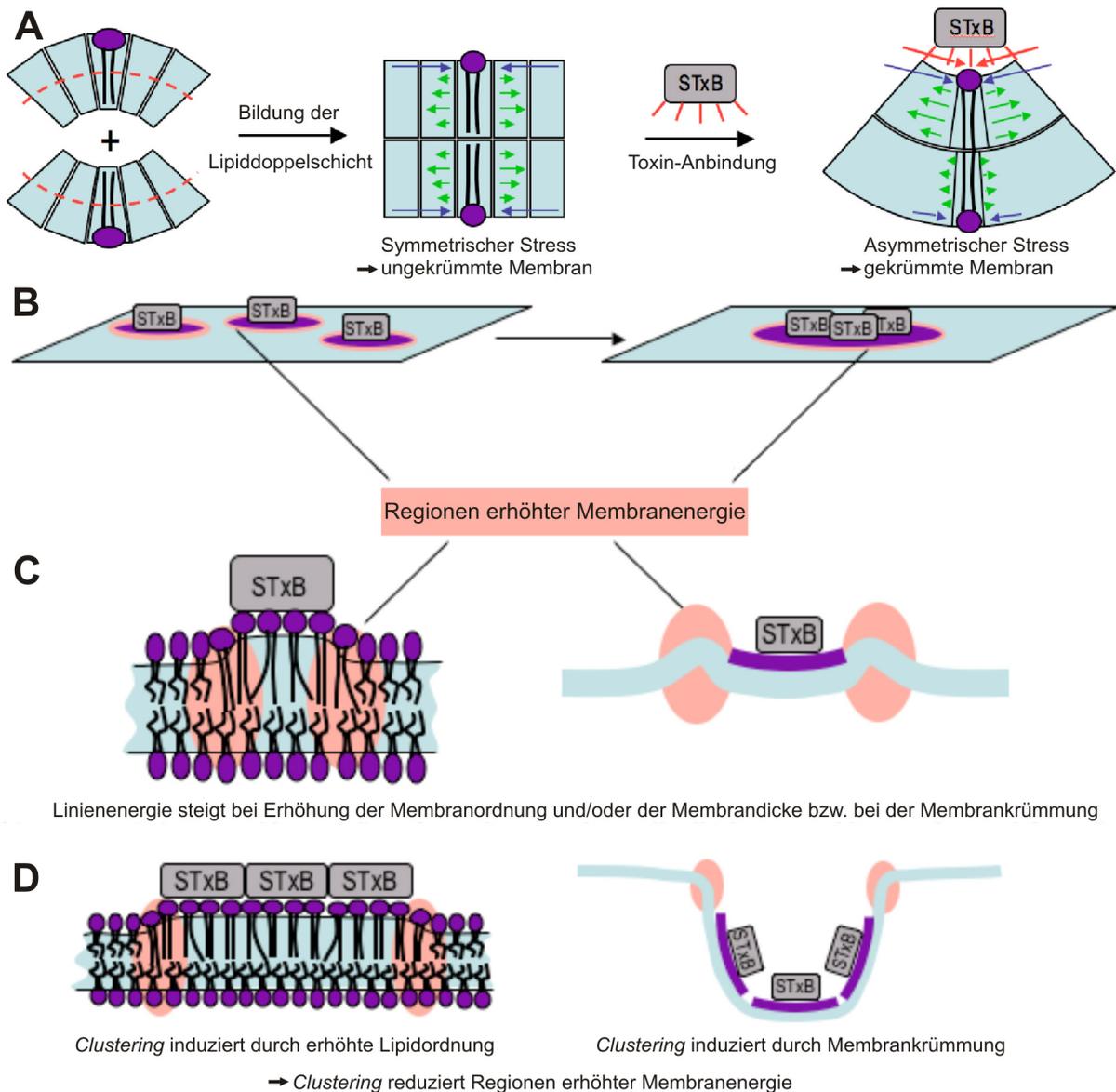


Abb. 1-11: Einfluss von STxB auf Lipiddoppelschichten. (A) Die Lipide innerhalb der Membran müssen von ihrer energetisch günstigen Form abweichen, um eine planare Membran ausbilden zu können. Dadurch entsteht ein symmetrischer Stress in der Membran (grüne Pfeile). Das durch STxB-induzierte Clustering führt zu einer höheren Dichte von Gb₃-Molekülen in einer Lipidmonoschicht, die zu einem asymmetrischen Stress (rote Pfeile) in der Membran und damit zu einer negativen Krümmung führt. (B) Die an den Rändern von Membrandomänen auftretende Linienenergie kann durch Kondensation zu größeren Domänen minimiert werden. (C) Bei Bindung von STxB wird die Ordnung der Lipide erhöht. Außerdem erhöht sich die Membrandicke (links) und/oder die Membran wird gekrümmt (rechts). (D) Die entstehenden Bereiche höherer Membranenergie können durch Clustering von STxB-Gb₃-Komplexen (links) oder der Bildung von Membraninvaginationen (rechts), sofern die Membran eine niedrige Membranspannung aufweist, minimiert werden. Abbildung modifiziert nach Römer *et al.*^[65]

Diese Membraninvaginationen konnten in Experimenten an HeLa-Zellen beobachtet werden. In GUV-Experimenten wurden sie ebenfalls untersucht. Dabei zeigten GUVs der Zusammensetzung DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) nach Bindung von fluoreszenzmarkiertem STxB unter zusätzlicher Verringerung der Membranspannung die Bildung von tubulären Membraninvaginationen.^[65] GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (41:41:13:5) hingegen zeigten aufgrund der größeren Membranspannung keine Bildung von Invaginationen, sondern lediglich die Bindung von STxB an die *l_o*-Phase der Membran und leicht negativ gekrümmte Membranbereiche.^[67]

Die Fettsäure in Gb₃ hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die STxB-Gb₃-Wechselwirkung. Im Falle der ungesättigten Erucasäure (C22:1 Δ^{13}) konnten Membraninvaginationen in GUVs beobachtet werden, nicht jedoch im Falle der gesättigten Behensäure (C22:0).^[65] Weiterhin beeinflusst die Länge der Fettsäuren in Gb₃ das Bindungsverhalten. Es wurden z. B. höhere Bindungsaffinitäten für längere Fettsäureketten (C20, C22, C24) gefunden, während kurze Fettsäureketten (C12, C14) nur eine minimale STxB-Bindung zeigten.^[68] Die Hydroxylierung der Fettsäureketten spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass STxB mit höherer Affinität an Gb₃ mit hydroxylierten Fettsäureketten (C18-OH, C22-OH) bindet als an unhydroxyliertes Gb₃ (C18, C22).^[69] Patienten, die an HUS erkrankten, wiesen einen höheren Anteil an hydroxyliertem Gb₃ in ihren roten Blutkörperchen auf, verglichen mit Patienten, die kein HUS entwickelten.^[70]

Intrazellulärer Transport des Shiga Toxins

Die Bildung tubulärer Membraninvaginationen durch STxB bildet den ersten Schritt für die Endozytose des Proteins. Diese kann unabhängig von Hüllproteinen wie Clathrin und Dynamin erfolgen. So kann Shiga Toxin weiterhin aufgenommen werden, wenn die Clathrin-abhängige Endozytose inhibiert wurde.^[71] Die Erzeugung von Membraninvaginationen in artifiziellen Membranen verdeutlicht ebenfalls, dass keine weiteren Zellbestandteile zu deren Bildung nötig sind, sondern bereits das

Clustering der Gb₃-Moleküle durch die Bindung von STxB die Endozytose einleiten kann.^[65]

Nach der Aufnahme in die Zelle kann das Protein über mehrere Wege innerhalb der Zelle transportiert werden. So kann es den endozytischen Transportweg über die frühen und späten Endosomen zum Lysosom durchlaufen. Nach dem Abbau des Proteins erfolgt der Transport zurück zur Plasmamembran, wo es wieder ausgeschleust wird.^[72] Das Shiga Toxin kann jedoch auch retrograd transportiert werden (Abb. 1-12). Dabei gelangt es direkt von den frühen Endosomen zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und von dort zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Nach Freisetzung der A-Untereinheit im ER erfolgt deren Retrotranslokation in das Cytosol. Dort kann STxA katalytisch aktiv werden.^[71–75]

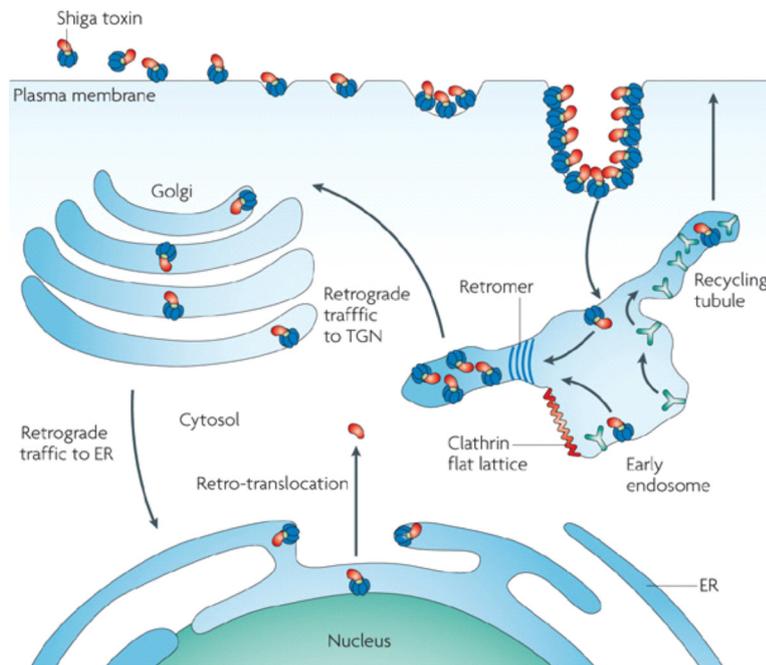


Abb. 1-12: Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von Shiga Toxin. Die Bindung von Shiga Toxin an die Plasmamembran erzeugt eine negative Membrankrümmung, die zur Ausbildung von Membraninvaginationen und damit zur Endozytose des Proteins führt. Durch den retrograden Transportweg gelangt das Protein über die frühen Endosomen (*Early endosome*) zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und schließlich zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dort erfolgt die Spaltung der beiden Untereinheiten und die Freisetzung der katalytisch-wirksamen A-Untereinheit.^[71]

Anwendungen des Shiga Toxins

Durch Nutzung des retrograden Transportweges kann Shiga Toxin weitere Organellen der Zelle, wie z. B. den Golgi-Apparat und das ER, erreichen. *In vivo* Untersuchungen dieses und ähnlicher Toxine (Ricin, CTx) ermöglichten die Aufklärung intrazellulärer Transportprozesse.^[75, 76] Die STxB-Untereinheit ist außerdem attraktiv für die Verwendung als intrazellulärer Transporter. Da der natürliche Rezeptor Gb₃ in vielen Tumorzellen überexprimiert ist^[77, 78], liegt es nahe, STxB zum selektiven Einschleusen von cytotoxischen Substanzen zu verwenden (*Tumor Targeting*).^[78, 79] Weiterhin ist es möglich, selektiv Kontrastmittel in Tumore einzubringen, um diese nicht-invasiv detektieren zu können. So konnten mittels fluoreszenzmarkiertem STxB Tumore im Verdauungstrakt von Mäusen durch Anwendung von konfokaler Laserendoskopie nachgewiesen werden.^[80]

1.4 Cholera Toxin und das Rezeptorgangliosid G_{M1}

Das Cholera Toxin (CTx) aus *Vibrio cholerae* und verwandte Proteine, wie die *Heat-Labile Toxins* (HLT) aus *E. coli*, gehören neben dem Shiga Toxin ebenfalls zur Klasse der AB₅-Proteine.^[52, 53] Ihre toxische A-Untereinheit katalysiert die ADP-Ribosylierung der heterotrimeren GTPase G_s. Die α -Untereinheit (G_s α) dieses stimulierenden G-Proteins wird somit strukturell verändert und kann kein gebundenes GTP mehr umsetzen. Dadurch bleibt das G-Protein ständig im aktiven Zustand. G_s α aktiviert die Adenylylcyclase, die den *Second Messenger* cAMP aus ATP synthetisiert. Dieser wird durch cAMP-Phosphodiesterasen kontinuierlich zu 5'-AMP abgebaut. Durch den dauerhaft aktiven Zustand des Proteins G_s α entsteht cytosolisches cAMP im Überschuss. Hohe cAMP-Konzentrationen in Darmepithelzellen aktivieren den Chloridkanal *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) und führen zu einem starken Einstrom von Chlorid-Ionen und Wasser in den Darm. Daraus ergeben sich die bekannten Folgen der Cholera, wie Dehydratation und Elektrolytmangel aufgrund von Diarrhö mit großen Wasserverlusten.^[4, 81]

Struktur von Cholera Toxin

Das Cholera Toxin setzt sich aus der A-Untereinheit (CTxA, 240 AS, 28 kDa, blau dargestellt in Abb. 1-13) und einer pentameren B-Untereinheit (CTxB) zusammen (grün dargestellt in Abb. 1-13). Jedes CTxB-Monomer besteht aus 103 Aminosäuren (11,5 kDa) und ist STxB strukturell sehr ähnlich. CTxB besitzt eine zusätzliche α -Helix am N-Terminus (Abb. 1-13 B).^[62, 82]

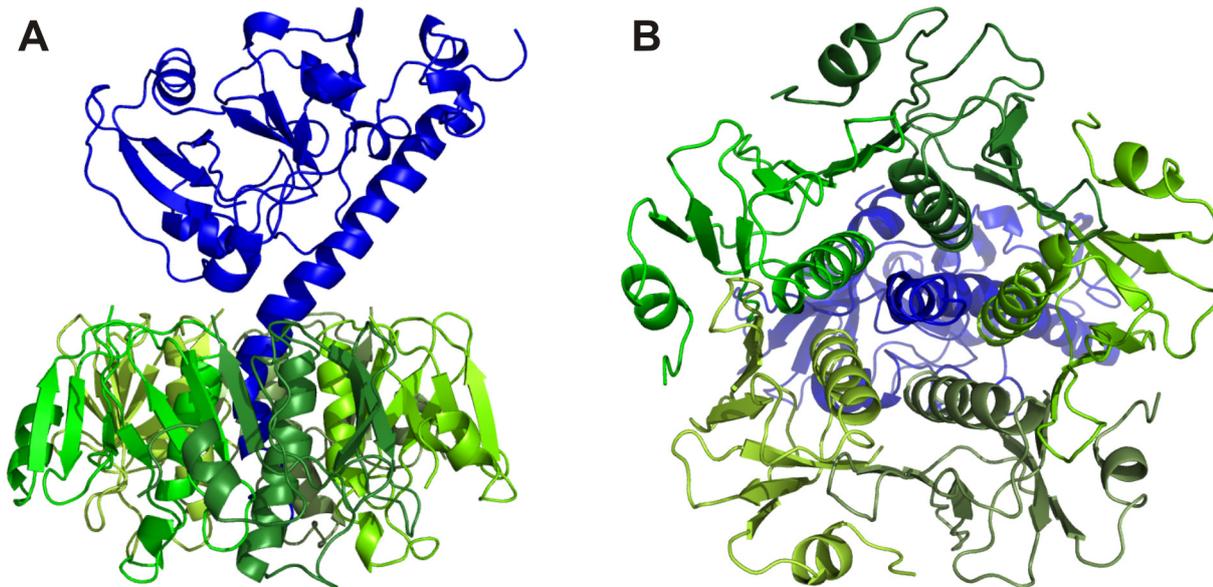


Abb. 1-13: Kristallstruktur des Cholera Toxins (PDB 1XTC). Die A-Untereinheit (CTxA) ist blau dargestellt und die fünf Monomere der B-Untereinheit (CTxB) in verschiedenen Grüntönen. (A) Seitenansicht und (B) Ansicht von unten mit Darstellung der pentameren CTxB-Struktur.^[60]

Der natürliche Rezeptor von CTxB ist das Monosialogangliosid G_{M1} . Die CTxB- G_{M1} -Bindung ist eine der stärksten bekannten Protein-Kohlenhydratbindungen (K_D im Bereich von 10^{-6} M, bestimmt durch Isothermale Kalorimetrie (ITC), bis 10^{-12} M, wenn G_{M1} auf Festkörpern immobilisiert wird). Das Pentasaccharid der G_{M1} -Kopfgruppe bildet ein „2-Finger-Motiv“ im CTxB- G_{M1} -Komplex aus. Dabei wird ein Finger von der β -Galactose(1-3)-*N*-Acetyl- β -Galactosamin-Einheit und der zweite von der Sialinsäure gebildet. Zwischen den Aminosäureresten im Protein und dem Rezeptor erfolgt die Bindung über intermolekulare Wasserstoffbrücken, sowohl direkt als auch verbrückend über Wassermoleküle (Abb. 1-14).^[83]

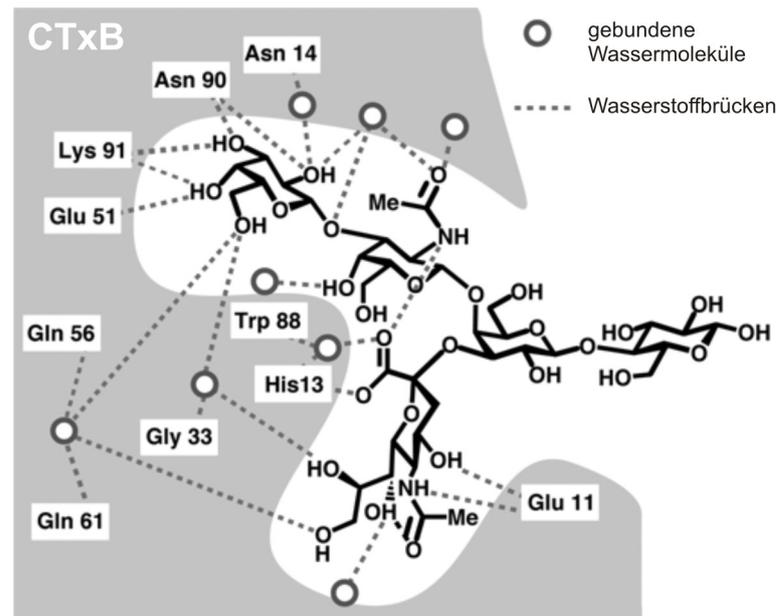


Abb. 1-14: Schematische Darstellung des CTxB-G_{M1}-Komplexes. Gezeigt ist das Pentasaccharid des G_{M1}, das ein „2-Finger-Motiv“ ausbildet und über Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) an ein CTxB-Monomer bindet. Abbildung modifiziert nach Turnbull *et al.*^[83]

Im Gegensatz zu STxB bindet ein CTxB-Monomer nur an ein G_{M1}-Rezeptormolekül. Dadurch besitzt CTxB weniger starke Clustering-Eigenschaften im Vergleich zu STxB.^[62] In artifiziellen G_{M1}-enthaltenden Membranen wurde ein unterschiedliches Phasenverhalten gefunden. Einerseits wurde eine Phasenseparation von G_{M1} und ungesättigten Lipiden wie DOPC und SOPC beobachtet.^[84] Andere Studien zeigen, dass die G_{M1}-Lokalisation abhängig von dessen Konzentration ist. Mit Hilfe rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen konnten Yuan *et al.* bei Inkorporation von 1 mol% G_{M1} in Lipidmonoschichten der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (1:1:1) G_{M1}-angereicherte Mikrodomänen in der *l_o*-Phase detektieren. Bei Erhöhung der G_{M1}-Konzentration auf 5 mol% wurden diese auch innerhalb der DOPC-angereicherten *l_d*-Phase gefunden.^[85] Es wird vermutet, dass die große Kopfgruppe des Gangliosids, die außerdem durch die Sialinsäure negativ geladen ist, einen starken Einfluss auf das Phasenverhalten der Lipide ausübt.^[84] Ein CTxB-induziertes G_{M1}-Clustering konnte weiterhin in BHK-Zellen, T-Hybridomazellen und Jurkat T-Lymphozyten beobachtet werden.^[86]

Die Endozytose des Proteins kann sowohl Clathrin-abhängig als auch Clathrin- und Caveolae-unabhängig erfolgen. Nach der Aufnahme in die Zelle kann CTxB über den retrograden Transportweg das TGN und das ER erreichen, wo die enzymatisch aktive A-Untereinheit ins Cytosol entlassen wird (Abb. 1-15).^[73, 87, 88]

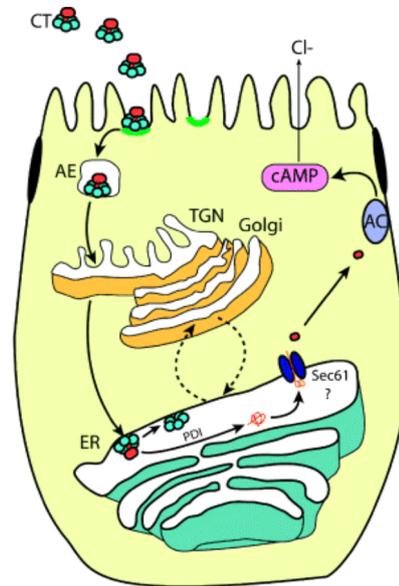


Abb. 1-15: Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von Cholera Toxin (CT). Das Protein bindet über G_{M1} an die Plasmamembran und wird in die Zelle aufgenommen. Entlang des retrograden Transportweges erreicht es das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und das Endoplasmatische Retikulum (ER). Im ER werden die beiden Untereinheiten gespalten und die A-Untereinheit (rot) ins Cytosol freigesetzt, wo sie katalytisch aktiv wird.^[88]

Anwendungen des Cholera Toxins

Die strukturelle Ähnlichkeit des Cholera Toxins zum Shiga Toxin erlaubt eine ähnliche Anwendung im biomedizinischen und immunologischen Bereich. So konnten durch zellbiologische Experimente mit CTxB erhebliche Fortschritte in der Aufklärung des cAMP-Systems und von Ionentransportmechanismen erzielt werden, sowie die Funktion von G-Proteinen und Zellmembranrezeptoren aufgeklärt werden.^[82] Die Kopplung von Antigenen an CTxB liefert eine Möglichkeit zum selektiven und effizienteren Impfen. So wurde bereits gezeigt, dass die orale und nasale Zufuhr von Vakzin-CTxB-Konjugaten eine stärkere Immunantwort hervorruft, als die Zufuhr ohne Transporterprotein. Ebenso können Antigene und Peptide transportiert wer-

den. Dabei wurde in allen Experimenten eine stärkere Präsenz von Antigenen auf der Oberfläche von dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen beobachtet.^[89]

Im Bereich der Untersuchung von *Lipid Rafts* wird CTxB häufig als sogenannter *Raft*-Marker eingesetzt. Dazu werden meist niedrige Konzentrationen des GM1-Rezeptors (bis zu 1 mol%) in artifizielle Membranen eingebracht und die Proteinbindung über fluoreszenzmarkiertes CTxB bzw. durch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen visualisiert.^[90-93] Allerdings muss dabei das mögliche Clustering durch die Bindung von CTxB an fünf Rezeptormoleküle berücksichtigt werden, welches CTxB zur Bildung einer *l_o*-Phase befähigt.^[94, 95]

2 Zielsetzung

Die zelluläre Plasmamembran ist ein komplexes, aus einer Vielzahl von Lipiden und Proteinen zusammengesetztes System. Zur Untersuchung der lateralen Organisation der Plasmamembran werden häufig artifizielle Modellmembranen eingesetzt.

Im Fokus dieser Arbeit steht die Entwicklung eines neuartigen Modellsystems für die zelluläre Plasmamembran, basierend auf porenüberspannenden Membranen. Darin stellt die Anknüpfung der Membran an das unterliegende poröse Substrat den Einfluss des Zytoskeletts dar, während eine heterogene Lipidmischung die komplexe Zusammensetzung der Plasmamembran reflektiert. Neben der Charakterisierung dieses Modellsystems sollen Lipidreorganisationsprozesse, induziert durch die Bindung der B-Untereinheiten von bakteriellen Toxinen, wie Shiga Toxin (STxB) und Cholera Toxin (CTxB), an ihre Glykosphingolipidrezeptoren Gb₃ und G_{M1}, untersucht werden.

Weiterhin wird der Einfluss der molekularen Struktur des STxB-Rezeptors Gb₃ auf die laterale Organisation von festkörperunterstützten Membranen in Abhängigkeit der Proteinbindung analysiert. Dazu werden zunächst Gb₃-Mischungen, isoliert aus HeLa-Zellen und Schweine-Erythrozyten verglichen, die sich hinsichtlich der Anteile von gesättigten, ungesättigten und α -hydroxylierten Fettsäuren unterscheiden. Deren Einfluss auf das Phasenverhalten der Membranen soll schließlich mit Hilfe von synthetischen Gb₃-Molekülen, die jeweils eine α -hydroxylierte bzw. eine ungesättigte Fettsäure enthalten, bestimmt werden.

Die Lokalisation der erwähnten Glykosphingolipide in der Plasmamembran ist bisher noch ungeklärt. Es wird vermutet, dass diese bevorzugt in Nanodomänen, den postulierten *Lipid Rafts*, angereichert sind. Der direkte Nachweis darüber, in welcher Phase Glykosphingolipide lokalisiert sind, wird am Beispiel eines fluoreszenzmarkierten Polyen-Galactocerebroside gezeigt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Eingesetzte Substanzen

3.1.1 Lipide

In dieser Arbeit wurden artifizielle Membranen, zusammengesetzt aus den Lipiden 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), Sphingomyelin (SM) und Cholesterin (Chol), untersucht. Des Weiteren wurden Rezeptorlipide, wie das Globotriaosylceramid Gb₃ und das Gangliosid G_{M1}, inkorporiert.

Das synthetische Lipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC, C₄₄H₈₄NO₈P, M = 786,15 g/mol, Abb. 3-1) ist ein zwitterionisches, ungeladenes Glycerophospholipid mit einer Cholin-Kopfgruppe. Die beiden Ölsäureketten weisen jeweils eine (*Z*)-Doppelbindung in der neunten Position der Fettsäurekette auf. Sie sind maßgeblich für das Phasenverhalten des Lipids und die Hauptumwandlungstemperatur von -20 °C verantwortlich.

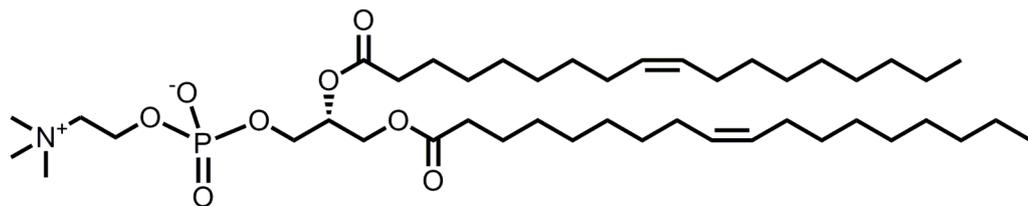


Abb. 3-1: Strukturformel von 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC).

Das Sphingolipid Sphingomyelin (SM, Hauptkomponente C18:0, C₄₁H₈₃N₂O₆P, M = 731,09 g/mol, Abb. 3-2) ist ebenfalls zwitterionisch und ungeladen. Es besteht aus einer Cholin-Kopfgruppe und einem C18:1-Sphingosin-Molekül, welches mit einer Fettsäure über eine Amidbindung verknüpft ist.

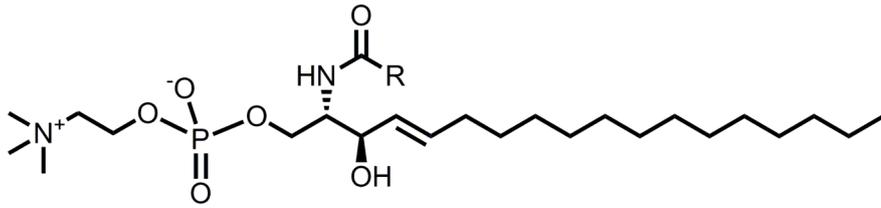


Abb. 3-2: Allgemeine Strukturformel von Sphingomyelin (SM). Über die Amidbindung ist eine Fettsäure verknüpft (gekennzeichnet als R). Die Fettsäurezusammensetzung des eingesetzten Sphingomyelins ist in Abb. 3-3 dargestellt.

Sphingomyelin wird in Anteilen von bis zu 30 % in der äußeren Lipidmonoschicht der Plasmamembran tierischer Zellen gefunden.^[96] Es wechselwirkt stärker mit Cholesterin als mit Phosphatidylcholinen, da es zu diesem Wasserstoffbrücken ausbilden kann.^[97] In dieser Arbeit wurde Sphingomyelin verwendet, das aus Rinderhirn isoliert wurde. Dieses ist verknüpft mit einem Gemisch verschiedener Fettsäuren (Abb. 3-3). Die Hauptumwandlungstemperatur beträgt 41 °C.^[29]

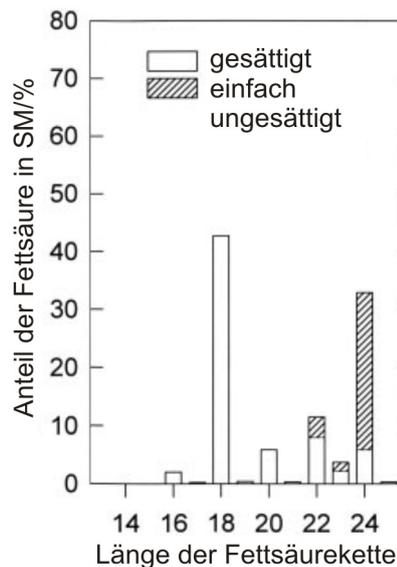


Abb. 3-3: Fettsäurezusammensetzung des eingesetzten Sphingomyelins, isoliert aus Rinderhirn.^[98]

Das Steroid Cholesterin (Chol, $C_{27}H_{46}O$, $M = 386,65 \text{ g/mol}$, Abb. 3-4) kommt in Anteilen von 20 bis 40 mol% in der tierischen Plasmamembran vor. Aufgrund der Hydroxylgruppe ist es ein amphiphiles Molekül und kann dadurch in Lipidmono- und Lipiddoppelschichten eingelagert werden. Die Hauptaufgabe des Cholesterins besteht in dessen Fähigkeit zur Regulation der Membranfluidität. So ist es in der Lage, die Ordnung in fluideren Membranen zu erhöhen, während es in geordneten Gelphasen die dichte Packung der Lipide erniedrigen kann.^[99]

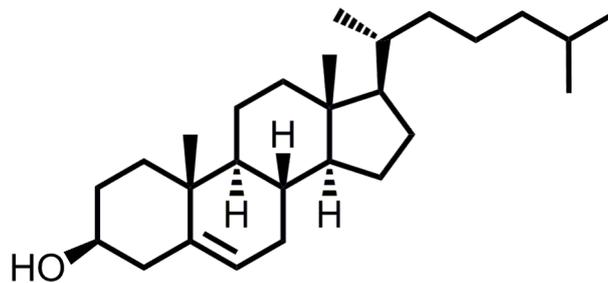


Abb. 3-4: Strukturformel des Steroids Cholesterin.

Das Glykosphingolipid Gb_3

Das Glykosphingolipid Gb_3 (Globotriaosylceramid, CD77, Abb. 3-5) ist der natürliche Rezeptor für die Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB). Die Kopfgruppe besteht aus dem Trisaccharid α -Galactose(1-4)- β -Galactose(1-4)- β -Glucose und ist mit einem Sphingosin-Grundgerüst verknüpft. An dieses Grundgerüst ist wiederum eine Fettsäure über eine Amidbindung gebunden.

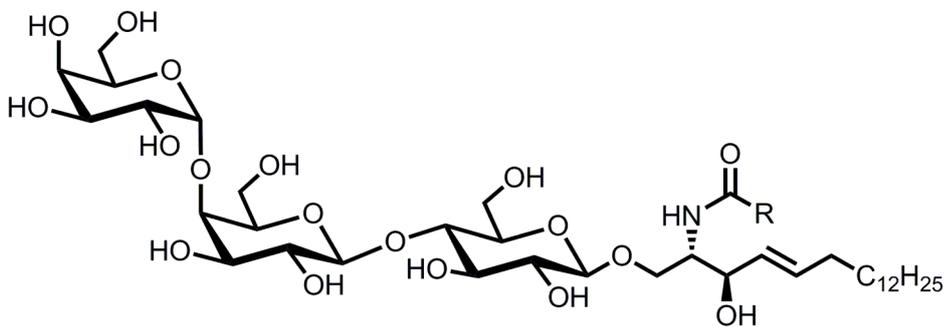


Abb. 3-5: Allgemeine Strukturformel des Globotriaosylceramids Gb_3 . Über die Amidbindung ist eine Fettsäure verknüpft (gekennzeichnet als R). Die Fettsäurezusammensetzung der verwendeten Gb_3 -Moleküle ist in Abb. 3-6 dargestellt.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Gb₃-Moleküle eingesetzt: Das native Gb₃, isoliert aus Schweine-Erythrozyten ($M \approx 1056$ g/mol), und Gb₃, isoliert aus HeLa-Zellen (HeLa-Gb₃, $M \approx 1100$ g/mol). Die Fettsäurezusammensetzung beider Gemische ist in Abb. 3-6 dargestellt. Wenn nicht weiter spezifiziert, so wurde das native Gb₃ aus Schweine-Erythrozyten eingesetzt.

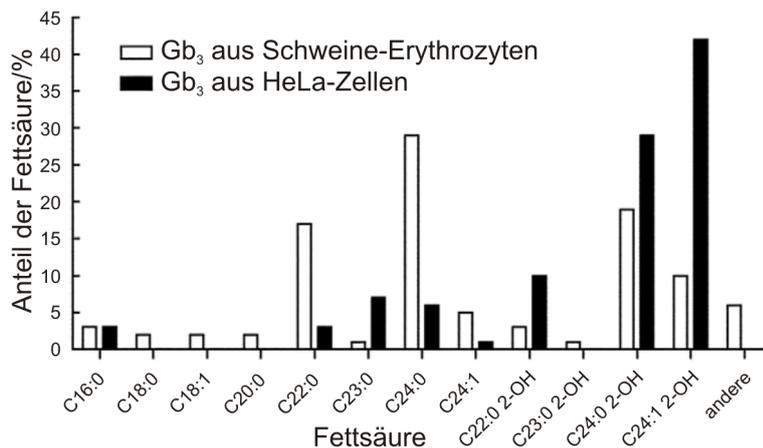


Abb. 3-6: Fettsäurezusammensetzung des nativen Gb₃ aus Schweine-Erythrozyten (weiße Balken) und des HeLa-Gb₃ (schwarze Balken).^[100]

Neben diesen beiden Gb₃-Gemischen wurden außerdem von der Arbeitsgruppe PD Dr. D. B. Werz synthetisierte Gb₃-Moleküle definierter Struktur verwendet. Dazu wurde einerseits ein Gb₃-Molekül verknüpft mit einer C24:0-Fettsäure, die in α -Position hydroxyliert ist, hergestellt (C₂₄- α -OH-Gb₃, C₆₀H₁₁₃NO₁₉, $M = 1152,53$ g/mol, Abb. 3-7).

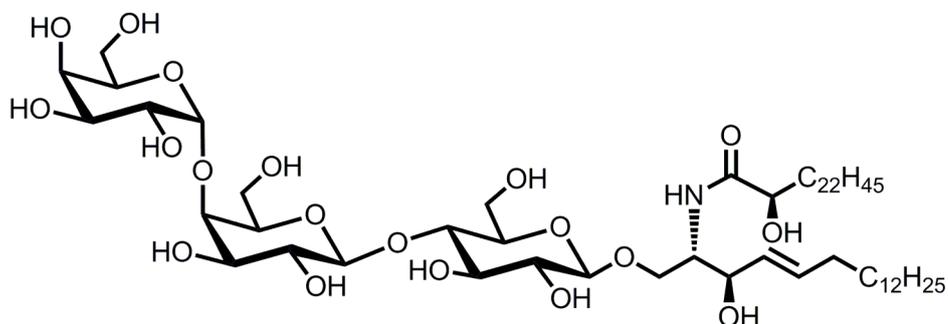


Abb. 3-7: Strukturformel des synthetischen Globotriaosylceramids C₂₄- α -OH-Gb₃.

Andererseits wurde Gb₃ mit einer C₂₄:1-Fettsäure synthetisiert, bei dem die (Z)-Doppelbindung an Position 15 ist (C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃, C₆₀H₁₁₁NO₁₈, M = 1134,52 g/mol, Abb. 3-8).

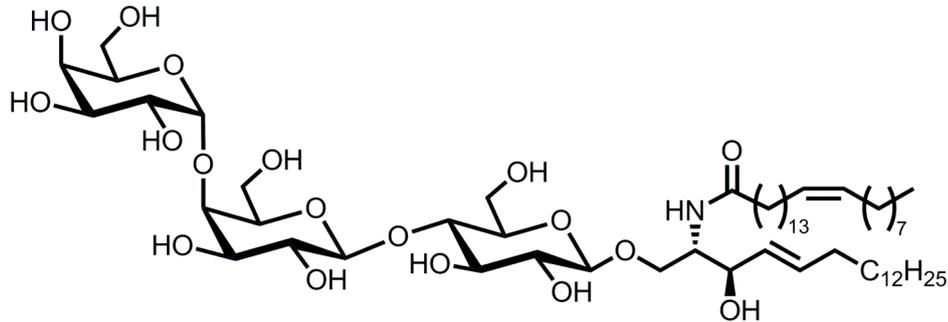


Abb. 3-8: Strukturformel des synthetischen Globotriaosylceramids C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃.

Das Gangliosid G_{M1}

Das Gangliosid G_{M1} (Monosialotetrahexosylgangliosid, C₇₃H₁₃₄N₄O₃₁, M = 1563,85 g/mol) ist der Rezeptor für die Cholera Toxin B-Untereinheit (CTxB). Es besteht aus einem Sphingosin-Grundgerüst, das über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft ist. Die Kopfgruppe wird von dem Oligosaccharid β-Galactose(1-3)-N-Acetyl-β-Galactosamin(1-4)-β-Galactose(3-2 NANA)(1-4)-β-Glucose gebildet. Dabei steht NANA für N-Acetylneuraminsäure (engl. N-Acetylneuramic Acid), eine negativ geladene Sialinsäure.

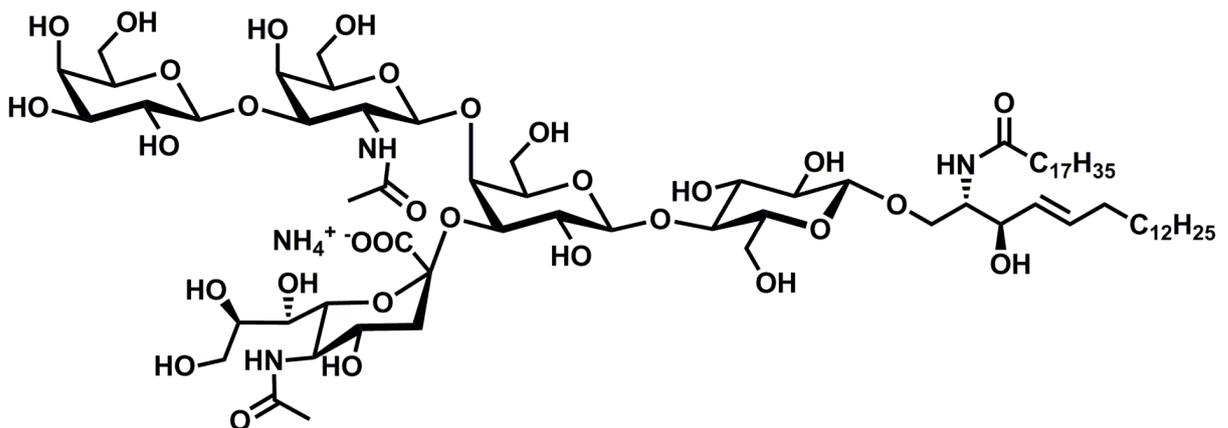


Abb. 3-9: Allgemeine Strukturformel des Gangliosids G_{M1}.

3.1.2 Fluoreszenzsonden

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Fluoreszenzsonden gearbeitet. Dazu wurden hauptsächlich fluoreszenzmarkierte Lipide, Sphingomyeline und ein Glykosphingolipid eingesetzt.

Fluoreszenzmarkierte Lipide zur Visualisierung der l_a -Phase

Zur Visualisierung der *liquid-disordered* (l_a) Phase der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20)^[67, 101] wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte Lipide eingesetzt. Das seitenkettenmarkierte Glycerophosphatidylcholin Bodipy-PC (β -Bodipy[®] C12-HPC, Abb. 3-10 A), das mit Sulforhodamin 101 kopfgruppenmarkierte TexasRed DHPE (Abb. 3-10 B), das mit einem Fluorescein-Derivat kopfgruppenmarkierte Oregon Green DHPE (Abb. 3-10 C) und das ebenfalls kopfgruppenmarkierte Pacific Blue DMPE (Abb. 3-10 D) wurden verwendet. Die Summenformeln, Molmassen und Absorptions- sowie Emissionsmaxima dieser Fluorophore sind zusammengefasst in Tab. 3-1 (S. 40) dargestellt.

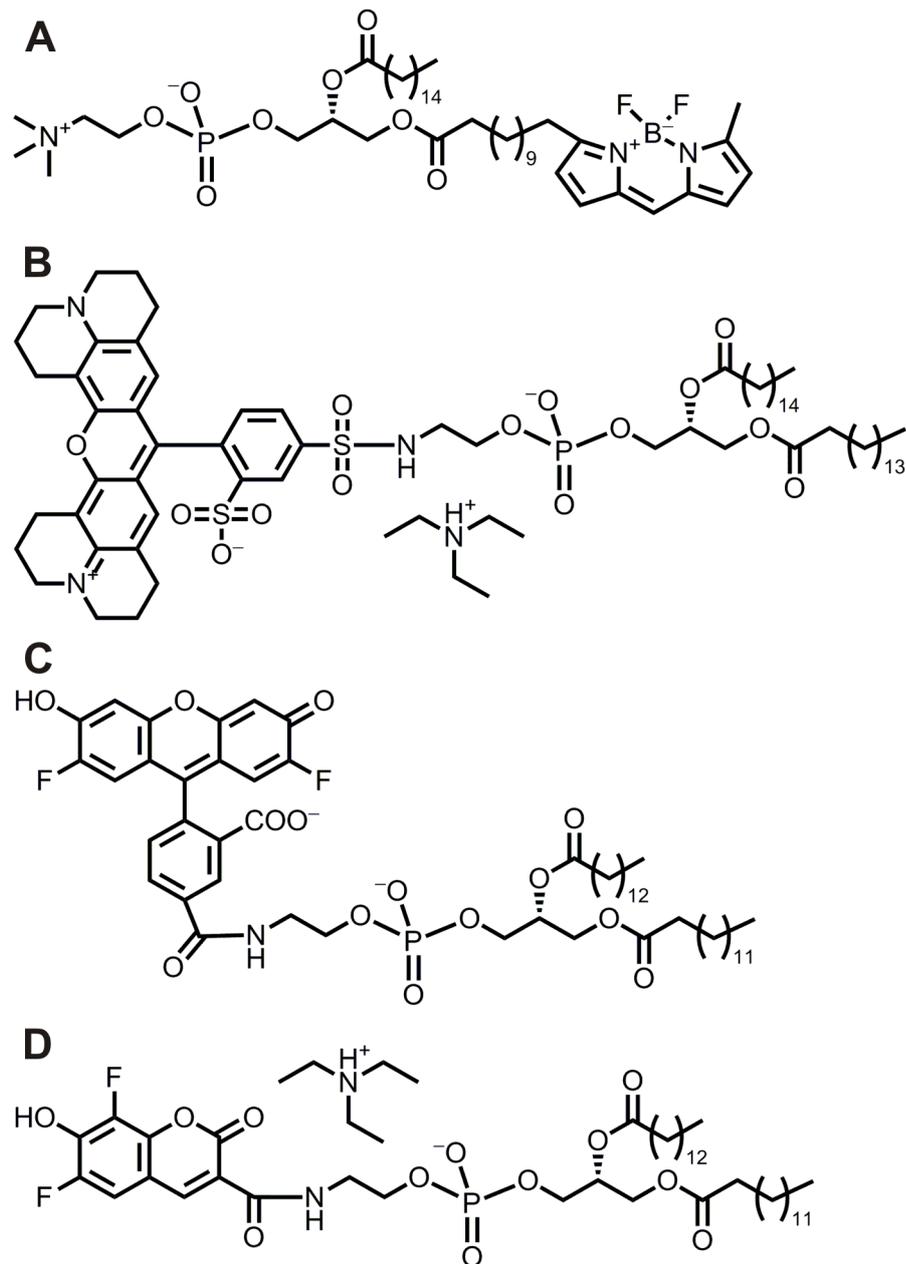


Abb. 3-10: Strukturformeln der fluoreszenzmarkierten Lipide, die zur Visualisierung der l_d -Phase eingesetzt wurden. (A) Bodipy-PC, (B) TexasRed DHPE (Triethylammoniumsalz), (C) Oregon Green DHPE und (D) Pacific Blue DMPE (Triethylammoniumsalz).

Der Fluorophor Perylen

Zur Fluoreszenzmarkierung wurde außerdem der polyzyklische Aromat Perylen in die untersuchten artifiziellen Lipidmembranen eingebracht (Abb. 3-11). Das Phasenverhalten dieses Fluorophors ist abhängig von dem verwendeten Modellmembransystem und den eingesetzten Lipiden. So wurde zum Beispiel in Untersuchungen an Riesenvesikeln (engl. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUVs) der Zusammensetzung DOPC/egg-Sphingomyelin/Cholesterin (in unterschiedlichen Molverhältnissen) ausschließlich eine Markierung der *liquid-ordered* (l_o) Phase beobachtet.^[102] Enthielten die GUVs Sphingomyelin aus Rinderhirn, so wurde eine Gleichverteilung des Perylens in l_o - und l_d -Phase gefunden.^[33] Die Eigenschaften von Perylen sind in Tab. 3-1 (S. 40) aufgeführt.

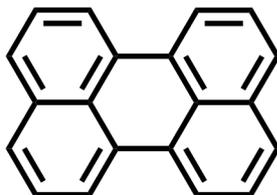


Abb. 3-11: Strukturformel des Fluorophors Perylen.

Fluoreszenzmarkierte Sphingomyeline

Zur möglichen Visualisierung der l_o -Phase der verwendeten Lipidmischung wurde das Phasenverhalten fluoreszenzmarkierter Sphingomyeline untersucht.

Der Fluorophor Atto647N-Sphingomyelin (Atto647N-SM, Abb. 3-12) wird aufgrund der hohen Fluoreszenzquantenausbeute und der photochemischen Stabilität bevorzugt in STED-Experimenten (*Stimulated Emission Depletion*) eingesetzt.^[13] Er ist aus einem Sphingosin-Grundgerüst aufgebaut, an dessen kurzer C₃-Fettsäurekette der Fluorophor Atto647N über eine Amidbindung gebunden wurde. Die Eigenschaften des Atto647N-SM sind in Tab. 3-1 (S. 40) aufgeführt.

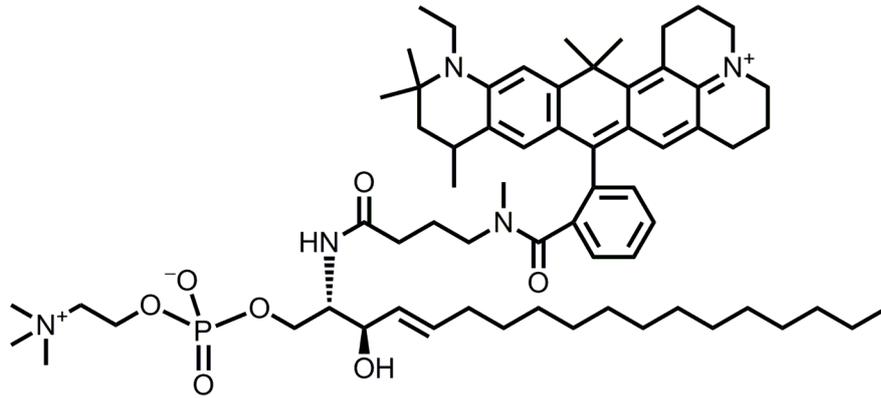


Abb. 3-12: Strukturformel des Atto647N-markierten Sphingomyelins (Atto647N-SM).

Ein weiteres fluoreszenzmarkiertes Sphingomyelin ist das C11 TopFluor-Sphingomyelin (C11 TopFluor-SM, Abb. 3-13). Das Grundgerüst dieses Fluorophors besteht aus einem Sphingosin-Molekül, an das eine C11:0-Fettsäurekette geknüpft ist. Am Ende dieser Fettsäure ist ein modifizierter Bodipy-Fluorophor angebunden. Die Eigenschaften des C11 TopFluor-SM sind in Tab. 3-1 (S. 40) aufgeführt.

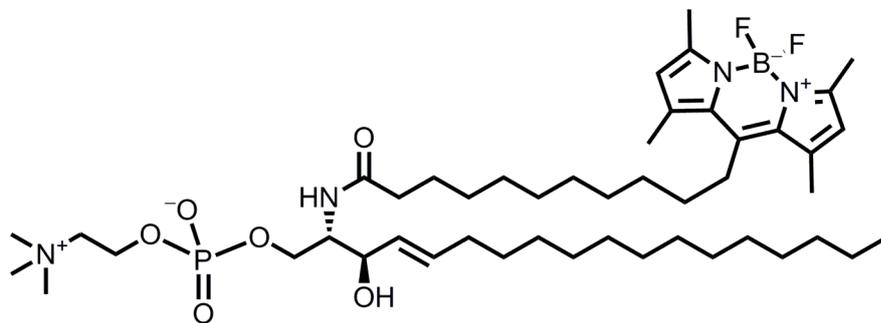


Abb. 3-13: Strukturformel des C11 TopFluor-Sphingomyelins (C11 TopFluor-SM).

Das fluoreszenzmarkierte Glykosphingolipid C₂₅*-Ph-GalCer

Von der Arbeitsgruppe PD Dr. D. B. Werz wurde das fluoreszenzmarkierte C₂₅*-Phenyl-Galactocerebroside (C₂₅*-Ph-GalCer, Abb. 3-14) synthetisiert. Es ist aus einem Sphingosin-Grundgerüst aufgebaut und besitzt eine β -Galactose als Kopfgruppe. Für die fluoreszierenden Eigenschaften sind fünf konjugierte, (*E*)-konfigurierte Doppelbindungen am Ende einer C₂₅-Fettsäurekette verantwortlich. Diese stehen in Konjugation mit dem π -System eines Phenylrings.

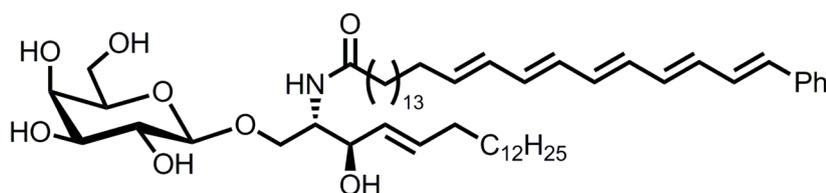


Abb. 3-14: Strukturformel des C₂₅*-Ph-Galactocerebroside (C₂₅*-Ph-GalCer).

Tab. 3-1: Übersicht der Summenformeln, Molmassen sowie Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluorophore.

Fluorophor	Abbildung	Summenformel	M/g mol ⁻¹	$\lambda_{\text{Abs,max/nm}}$	$\lambda_{\text{Em,max/nm}}$
Bodipy-PC	Abb. 3-10 A	C ₄₆ H ₇₉ BF ₂ N ₃ O ₈ P	881,93	500	510
TexasRed DHPE	Abb. 3-10 B	C ₇₄ H ₁₁₇ N ₄ O ₁₄ PS ₂	1381,84	584	607
Oregon Green DHPE	Abb. 3-10 C	C ₅₈ H ₈₂ F ₂ O ₁₄ P	1086,25	496	524
Pacific Blue DMPE	Abb. 3-10 D	C ₄₉ H ₈₃ F ₂ N ₂ O ₁₂ P	961,17	411	454
Perylen	Abb. 3-11	C ₂₀ H ₁₂	252,31	438	472
Atto647N-SM	Abb. 3-12	C ₆₅ H ₉₉ N ₅ O ₇ P	1093,48	645	670
C11 TopFluor-SM	Abb. 3-13	C ₄₇ H ₈₂ BF ₂ N ₄ O ₆ P	878,96	495	503
C ₂₅ *-Ph-GalCer	Abb. 3-14	C ₅₅ H ₈₉ NO ₈	892,30	350	463

3.1.3 Methyl- β -Cyclodextrin

Cyclodextrine (CD) sind zyklische Oligosaccharide, die aus α -(1-4)-verknüpften D-Glucose-Molekülen bestehen. Sie können zur Extraktion von Cholesterin aus Lipidmembranen genutzt werden (Kap. 3.2.5). In dieser Arbeit wurde Methyl- β -Cyclodextrin (m β CD, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit einem Methylierungsgrad von 50-70 % und einer mittleren molaren Masse von $M = 1320$ g/mol verwendet (Abb. 3-15).^[103]

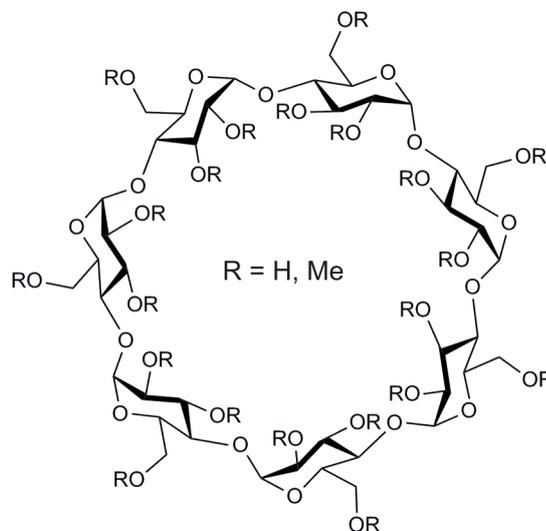


Abb. 3-15: Allgemeine Strukturformel von β -Cyclodextrin. In der vorliegenden Arbeit wurde Methyl- β -Cyclodextrin mit einem Methylierungsgrad von 50-70 % eingesetzt.

3.1.4 Thiole zur Substratfunktionalisierung

Zwei verschiedene Thiole wurden zur Funktionalisierung der porösen Substrate eingesetzt. Zur Herstellung der hydrophob funktionalisierten Substrate wurde Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3, $C_{34}H_{59}NO_4S$, $M = 577,90$ g/mol, Abb. 3-16 A) eingesetzt. Dieses Thiol besitzt eine Polyethylenoxy-Kette, die als Abstandshalter (engl. *Spacer*) dient, und einen Cholesterylrest, der in die untere Lipidmonoschicht einer Membran integriert. Hydrophil-funktionalisierte Substrate wurden durch die Verwendung von Mercaptoethanol (C_2H_6OS , $M = 78,13$ g/mol, Abb. 3-16 B) erhalten.

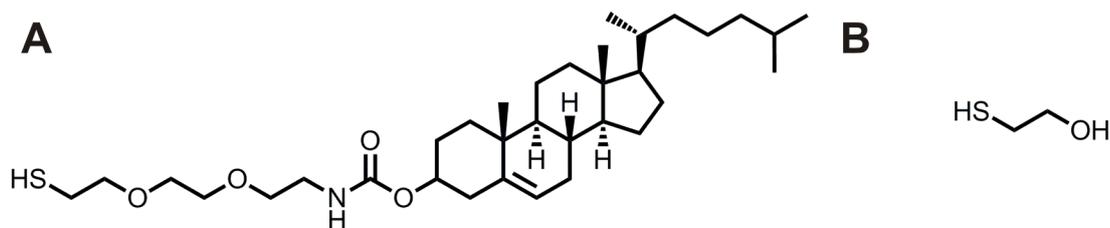


Abb. 3-16: Strukturformeln der Thiole, die zur Funktionalisierung der porösen Substrate verwendet wurden. (A) Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3) und (B) Mercaptoethanol.

3.2 Präparative Methoden

3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Lipidstammlösungen

Zunächst wurden Stammlösungen der verwendeten Lipide hergestellt. Dazu wurden diese in Chloroform bzw. einer Mischung aus Chloroform/Methanol gelöst. Das Phasenverhalten der untersuchten Lipidmischungen ist abhängig von dem molaren Verhältnis der Lipide. Daher ist es wichtig, die Konzentration der Lipidstammlösungen möglichst genau zu bestimmen. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe der Filmwaagetechnik durchgeführt.

Filmwaagetechnik

Die Filmwaage nach Pockels^[104] und Langmuir^[105] besteht aus einem Teflontrog mit beweglichen Teflonbarrieren (Abb. 3-17 A). In den Trog wird die Subphase gegeben und darauf eine oberflächenaktive, amphiphile Substanz gespreitet. Diese wurde zuvor in einem Spreithilfsmittel wie Chloroform gelöst. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels bildet sich eine monomolekulare Schicht auf der Subphase aus. Dabei sind die polaren Molekülanteile zur Subphase hin orientiert. Zur Ermittlung des Oberflächendrucks wird ein Wilhelmy-Messsystem^[106] über dem Trog platziert. Die Temperatur der Subphase kann mit Hilfe eines Thermostaten reguliert und konstant gehalten werden. Eine angeschlossene Kontrolleinheit dient zur Steuerung der Barrierenbewegung, des Auslesens der jeweiligen Trogfläche und des Oberflächendrucks. Mit Hilfe der beweglichen Barrieren ist es möglich, die zur Verfügung stehende Fläche zu verringern. Dabei treten die gespreiteten Moleküle in stärkere Wechselwirkung miteinander. Durch den damit

verbundenen Druckanstieg werden Druck/Flächen-Isothermen aufgenommen (Abb. 3-17 B). Die Druck/Flächen-Isothermen werden genutzt, um das Kompressionsverhalten von Lipiden zu untersuchen. Dieses ist charakteristisch für jedes Lipid und kann zur Bestimmung des Phasenverhaltens genutzt werden.^[107]

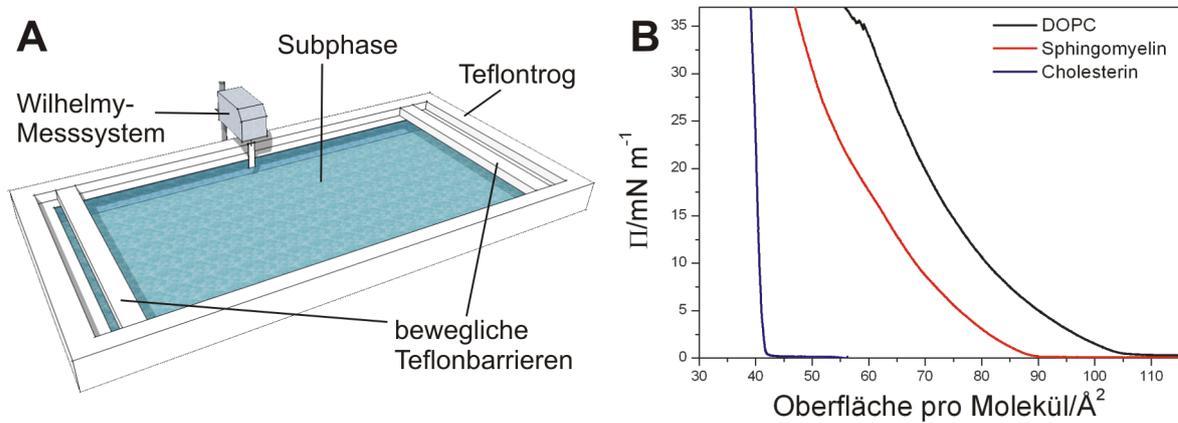


Abb. 3-17: (A) Schematische Darstellung einer Filmwaage mit Wilhelmy-Messsystem. (B) Exemplarische Isothermen der Lipide DOPC, Sphingomyelin und Cholesterin bei 20 °C, gemessen auf Reinstwasser.

Der Oberflächendruck Π wird mit dem Wilhelmy-Messsystem erfasst. Er setzt sich zusammen aus der Differenz der Oberflächenspannung der reinen Subphase σ_{Sub} und der filmbedeckten Oberfläche σ_{Film} (Gl. 3-1).

$$\Pi = \sigma_{\text{Sub}} - \sigma_{\text{Film}} \quad \text{Gl. 3-1}$$

Das Wilhelmy-Messsystem besteht aus einer Waage mit einer Feder, an der ein Filterpapier-Plättchen befestigt wird. Das Filterpapier wird senkrecht auf die Oberfläche gesetzt und vollkommen benetzt. Auf dieses wirken die Oberflächenspannung und der Auftrieb der Subphase, sowie die Gewichtskraft des Filterpapiers. Vor jedem Experiment muss das Wilhelmy-Messsystem kalibriert werden. Dazu werden der Wert für das frei schwebende Filterpapier auf 72,5 mN/m (Oberflächenspannung des Wassers) und der Wert für das eingetauchte Filterpapier (ohne gespreiteten Lipidfilm) auf 0 mN/m eingestellt.

Zur Konzentrationsbestimmung der Lipidstammlösung wurden Druck/Flächen-Isothermen des jeweiligen Lipids auf Reinstwasser aufgenommen. Anschließend wurde die Oberfläche pro Molekül $A_{20}(\text{Lipid})$ bei einem Oberflächendruck von $\Pi = 20 \text{ mN/m}$ be-

stimmt. Mit der Einwaagekonzentration c_1 und dem Referenzwert $A_{20}(\text{Ref.})$ (Tab. 3-2) konnte die tatsächliche Konzentration c_2 berechnet werden (Gl. 3-2).

$$c_2 = c_1 \cdot \frac{A_{20}(\text{Lipid})}{A_{20}(\text{Ref.})} \quad \text{Gl. 3-2}$$

Tab. 3-2: Übersicht der $A_{20}(\text{Ref.})$ -Werte der verwendeten Lipide.

Lipid	$A_{20}(\text{Ref.})/\text{\AA}^2$
DOPC	70,3
Sphingomyelin	57,4
Cholesterin	40,0

Durchführung

Die Druck/Flächen-Isothermen wurden auf Filmwaagen der Firma Riegler und Kirstein (Potsdam) mit Troglflächen von 175,5 und 192,3 cm² aufgenommen. Das Trogvolumen betrug jeweils 115 mL. Nach Reinigung der Filmwaage mit Mucosol[®]-Lösung wurde diese mit Reinstwasser befüllt und auf 20 °C temperiert. Nach dem Spreiten der Lipidmonoschicht wurde 15 min equilibriert und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 7,9 mm²/s komprimiert. Für jede Lipidstammlösung wurden drei Druck/Flächen-Isothermen aufgenommen und der Mittelwert für die Oberfläche pro Molekül bei einem Druck von $\Pi = 20$ mN/m bestimmt. Mit Hilfe von Gl. 3-2 wurde somit die Konzentration aller Stammlösungen (außer Gb₃- und G_{M1}-Stammlösungen) ermittelt.

3.2.2 Präparation von *Giant Unilamellar Vesicles*

Zur Präparation von Riesenvesikeln (engl. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUVs) wurde die Methode der Elektroformation verwendet. Diese führt zur Bildung von Vesikeln mit Durchmessern im Mikrometerbereich und wurde zuerst von Angelova *et al.* beschrieben.^[108] Beim Quellen von Lipidfilmen in Wasser werden die lamellaren Lipidstrukturen des Lipidfilms schichtweise in Anwesenheit eines elektrischen Wechselfelds abgelöst. Die „wachsenden“ Vesikel schwingen mit der Frequenz des angelegten Feldes und es kommt zur Bildung von riesigen, unilamellaren Vesikeln.^[109] All-

gemein werden bei dieser Methode homogene Populationen unilamellarer Vesikel in hohen Ausbeuten erhalten.^[110]

Durchführung

Zunächst wurden Lipidfilme auf halbleitend beschichteten Gläschen (engl. *Indium Tin Oxide* (ITO), $(\text{In}_2\text{O}_3)_{0,9} \cdot (\text{SnO}_2)_{0,1}$, Präzisions Glas & Optik GmbH, Iserlohn) erzeugt. Dazu wurden diese vorher sorgfältig mit Ethanol und Reinstwasser gereinigt. Die gewählten Lipidstammlösungen wurden, entsprechend des gewünschten molaren Verhältnisses, in einem gereinigten Braungläschen vermischt. Dabei wurde eine Konzentration der Lipidmischung von 1,7 mg/mL Gesamtlipid eingestellt. Mit einer Hamiltonspritze wurden jeweils 25 μL der Lipidmischung auf die Mitte der leitenden Seite der beiden ITO-beschichteten Gläschen gegeben und verteilt (Abb. 3-18 A). Die so erzeugten Lipidfilme wurden 3 h im Trockenschrank unter Vakuum bei 55 °C getrocknet, um das organische Lösungsmittel vollständig zu entfernen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde zuvor angerautes Kupferklebeband zur Kontaktierung auf die Teflon-Abstandshalter am Rand der ITO-beschichteten Gläschen geklebt. Um den Bereich des aufgetragenen Lipidfilms wurde ein seitlich angeschnittener Silikonring auf eines der Gläschen gelegt. Nun wurde das zweite ITO-beschichtete Gläschen auf diesen Ring gelegt, sodass die Kupfer-Elektroden jeweils beide Innenseiten der Gläschen kontaktieren und eine abgedichtete Kammer entsteht (Abb. 3-18 B, C).

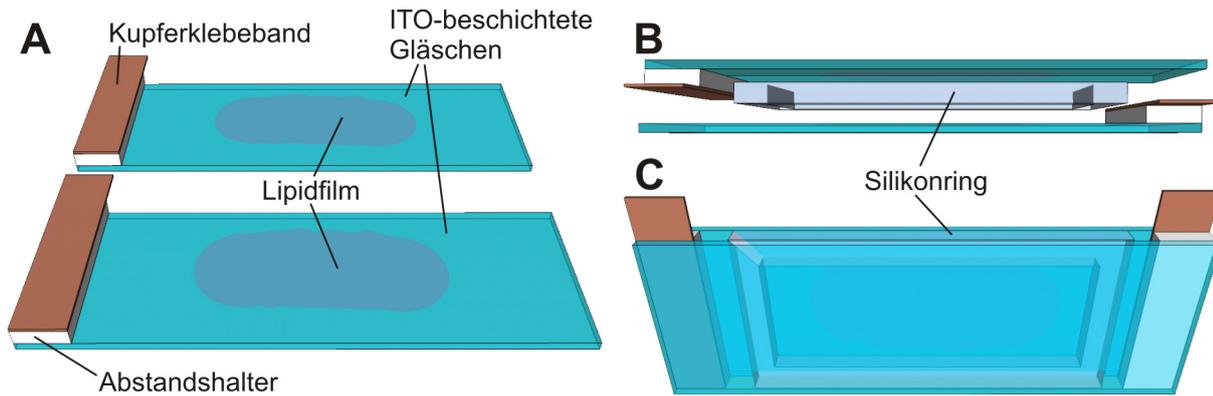


Abb. 3-18: Schematische Darstellung einer Kammer zur Herstellung von GUVs. (A) Zunächst wird ein Lipidfilm auf der leitenden Seite von ITO-beschichteten Gläschen erzeugt. Auf den Abstandshaltern wird angerautes Kupferklebeband angebracht. (B, C) Zwischen zwei ITO-beschichtete Gläschen wird ein Silikonring zur Abdichtung gesetzt. Die gebildete Kammer kann nun mit der Hydratationslösung befüllt und an den Frequenzgenerator angeschlossen werden. Zur zusätzlichen Stabilisierung wurden an den Seiten der Kammern Foldback-Klammern angebracht (hier nicht gezeigt).

An den Seiten dieser Kammer wurden zusätzlich Foldback-Klammern angebracht, um den elektrischen Kontakt und die Stabilität der Kammer auch bei höheren Temperaturen zu gewährleisten. In die Kammer wurden 1,5 mL einer entgasten 0,3 M Sucrose-Lösung ((332 ± 13) mOsmol/kg) gegeben und die Kupferelektroden mit dem Frequenzgenerator kontaktiert. Anschließend wurden die Kammern 15 min im Trockenschrank auf 55 °C vorgewärmt und danach eine sinusförmige Wechselspannung von 1,6 V mit einer Frequenz von 12 Hz, ebenfalls bei einer Temperatur von 55 °C, angelegt. Nach 3 h wurde die Frequenz langsam auf 5 Hz geregelt und für 15 min eine Rechteckspannung angelegt. Das Wechselfeld wurde abgestellt und die Kammern aus dem Trockenschrank genommen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mittels einer 1 mL-Pipette in Eppendorf-Cups überführt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert (maximal bis zum nächsten Tag).

3.2.3 Präparation porenüberspannender Membranen

Zur Präparation von porenüberspannenden Membranen wurden poröse Siliziumnitrid-Substrate mit Porendurchmessern von 0,45, 0,8, 1,2 und 2,0 μm (jeweils 5 mm \times 5 mm, fluXXion, Eindhoven, Niederlande) eingesetzt (Abb. 3-19).

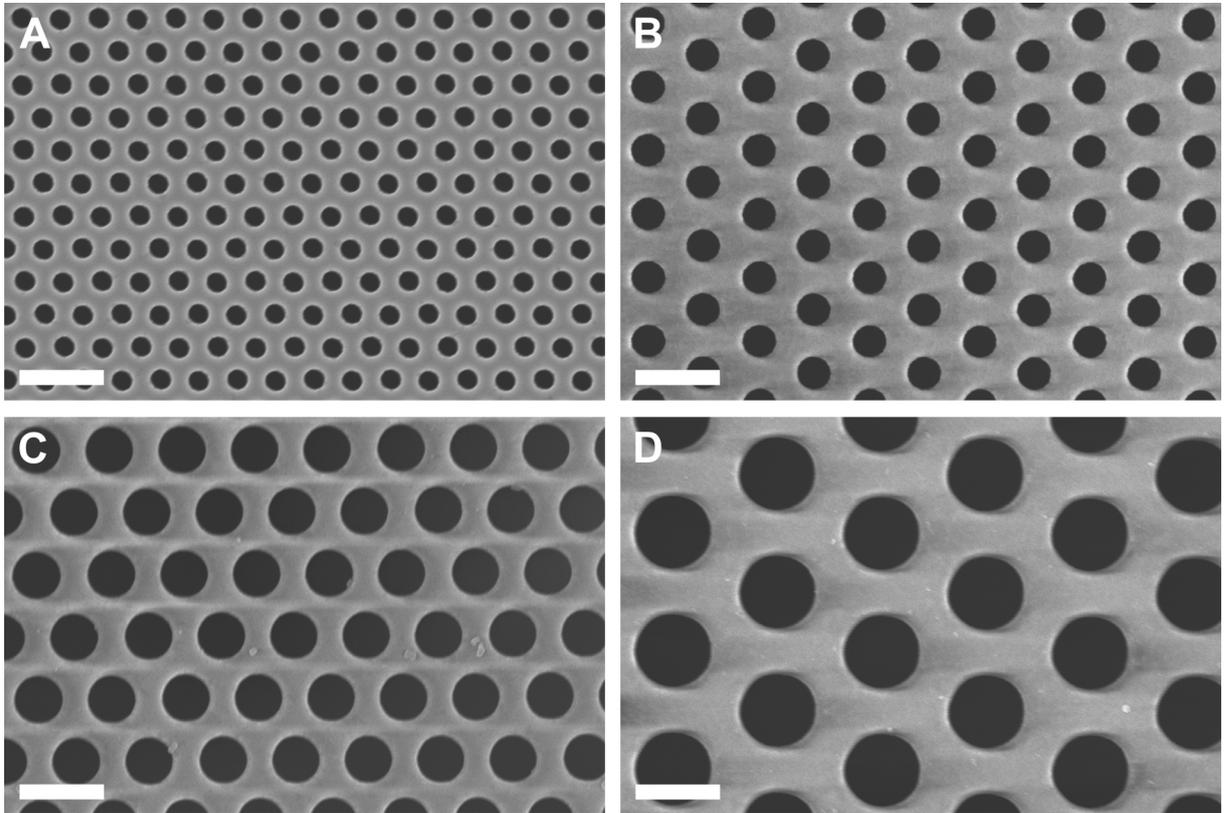


Abb. 3-19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der porösen Siliziumnitrid-Substrate mit 20 000-facher Vergrößerung. Porendurchmesser: (A) 0,45 μm , (B) 0,8 μm , (C) 1,2 μm , (D) 2,0 μm . Maßstabsbalken: 2 μm .

Diese wurden zunächst im Argonplasma (Plasma Cleaner PDC 32 G-2, Harrick, Ithaca, NY, USA) für 2 min gereinigt. Für die Herstellung von hydrophob funktionalisierten Substraten wurde eine 2,5 nm dicke Titan-Schicht mittels eines Kathodenzerstäubers (Sputter Coater 108 auto, Cressington Scientific Instruments, Watford, UK) aufgebracht, die als Haftvermittler zwischen dem Substrat und der Goldschicht dient. Diese 30 nm dicke Goldschicht wurde ebenfalls mit Hilfe des Kathodenzerstäubers aufgebracht. Anschließend wurden die Substrate sofort in eine Lösung von Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3, Kap. 3.1.4) (0,1 mM in *n*-Propanol) gegeben und für 12 h bei 4 °C inkubiert. Zur Präparation von hydrophil-funktionalisierten Substraten wurden diese mit 2,5 nm Chrom als Haftvermittler und 17,5 nm Gold im

Hochvakuum bedampft (MED 020, Balzers AG, Liechtenstein). Danach wurden sie in eine Mercaptoethanol-Lösung (0,1 mM in Ethanol) gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die funktionalisierten Substrate wurden 10× mit jeweils 5 mL *n*-Propanol (im Falle der hydrophoben Substrate) bzw. Ethanol (im Falle der hydrophilen Substrate) gespült, um überschüssiges Thiol zu entfernen. Anschließend wurden die Substrate im Stickstoffstrom trocken geblasen und in eine Messkammer mit 5 mL Gesamtvolumen eingebaut (Abb. 3-20).

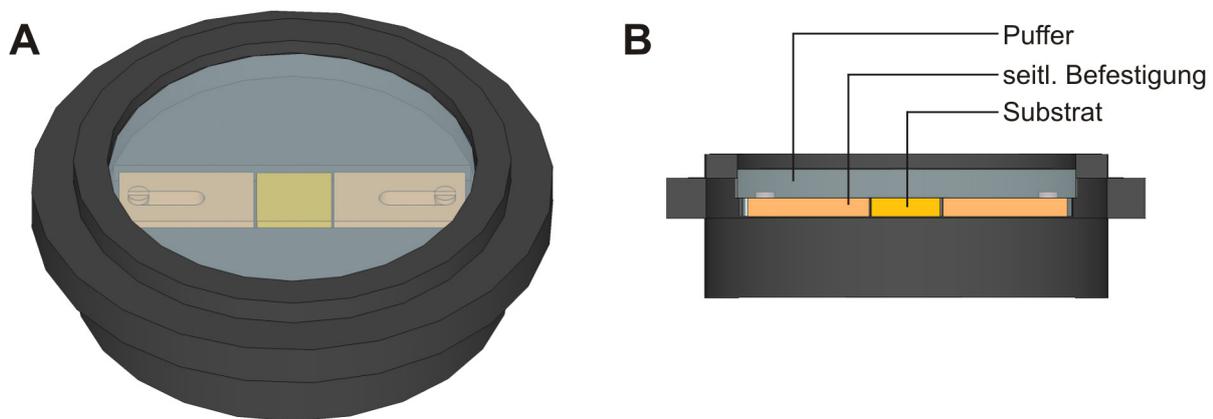


Abb. 3-20: Schematische Darstellung einer Messkammer zur Untersuchung von porenüberspannenden Membranen. Das poröse Substrat wurde zwischen zwei Plättchen seitlich befestigt. (A) Aufsicht und (B) Seitliche Ansicht.

Die CPEO3-funktionalisierten Substrate wurden mit *n*-Propanol versetzt und 10 min darin inkubiert. Dadurch wurden die Poren vollständig benetzt und eventuell vorhandene Luft aus den Poren der Substrate entfernt. Das *n*-Propanol wurde gegen den Spreitpuffer (100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, (230 ± 2) mOsmol/kg, pH 7,4) getauscht, indem 20× mit jeweils 5 mL Spreitpuffer vorsichtig gespült wurde. Durch die Überführung des CPEO3 von einem unpolaren Lösungsmittel in ein polares Medium wie Wasser ändert sich die Konformation des Polyethylenoxy-Spacers. SPR-Experimente zeigten eine Erhöhung der optischen Schichtdicke, sobald eine Monoschicht, gebildet aus Polyethylenoxythiol-Lipiden, in einen wässrigen Elektrolyten überführt wurde.^[111] Dies wurde sowohl in FTIR-Experimenten mit kurzkettigen Polyethylenoxy-Ketten^[112] als auch mit Hilfe der Impedanzspektroskopie an CPEO3-Monoschichten bestätigt.^[113] Es wird vermutet, dass sich die CPEO3-Moleküle bei

Überführung in ein Medium mit einer höheren Dielektrizitätskonstante aufrichten und somit die beobachtete Schichtdickenerhöhung verursachen.^[111-113] Daher wurde in allen Präparationen darauf geachtet, dass die CPEO3-funktionalisierten Substrate 1 h unter Spreitpuffer inkubiert wurden. Die Mercaptoethanol-funktionalisierten Substrate wurden nach dem sorgfältigen Spülen mit EtOH mit Spreitpuffer versetzt.

Zum Spreiten wurden 150 μL der GUV-Lösung (Präparation siehe Kap. 3.2.2) direkt auf das funktionalisierte Substrat gegeben und 2 h bei 55 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach Abkühlen auf 20 °C wurde die Ausbildung der porenüberspannenden Membranen fluoreszenzmikroskopisch überprüft und überschüssige GUVs durch vorsichtiges Spülen mit 100 mL Puffer entfernt. Bei Experimenten zur Bindung von STxB wurde dazu PBS-Puffer (2,7 mM KCl, 136,9 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , (288 ± 3) mOsmol/kg, pH 7,4) verwendet und CT-Puffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, (474 ± 4) mOsmol/kg, pH 7,5) im Falle von CTxB.

3.2.4 Präparation von festkörperunterstützten Membranen

Zur Präparation von festkörperunterstützten Membranen wurde entweder das Substrat Mica (Muskovit-Glimmer, Schichtsilikat der Zusammensetzung $\text{KAl}_2[(\text{OH},\text{F})_2/\text{AlSi}_3\text{O}_{10}]^{[114]}$) oder Silizium verwendet. Zur Vorbereitung des Mica wurde dieses in entsprechende Stücke geschnitten und mit Klebeband die obersten Schichten 3 \times abgespalten. Dadurch wurde eine glatte Oberfläche erhalten. Das Substrat Silizium, das bereits mit einer 100 nm SiO_2 -Schicht funktionalisiert war, wurde zunächst hydrophilisiert. Dazu wurden zugeschnittene Stücke 20 min bei 70 °C in einer Lösung aus $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (5:1:1 *v:v:v*) inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Substrate mit Reinstwasser gespült. Anschließend wurden die Substrate Mica bzw. Silizium in Teflon-Messkammern fixiert, die mit einem maximalen Volumen von 1 mL befüllt werden können (Abb. 3-21).

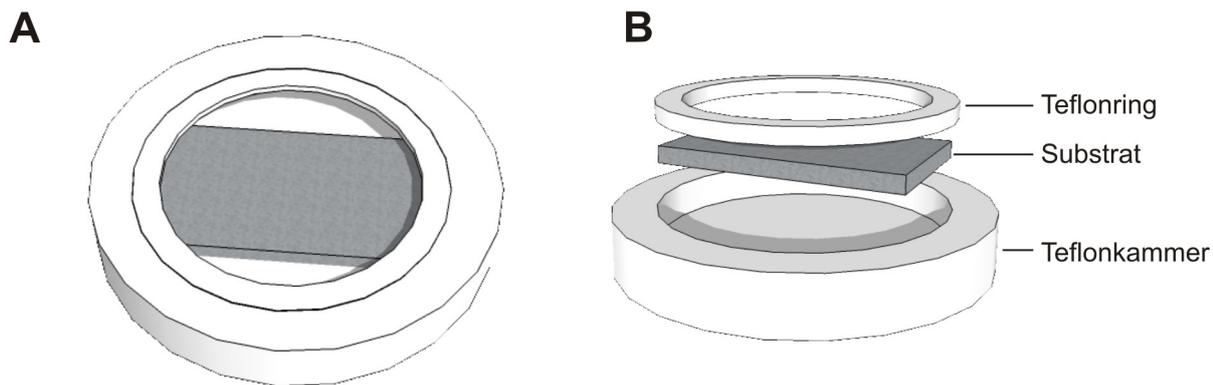


Abb. 3-21: Schematische Darstellung einer Teflon-Messkammer zur Untersuchung von festkörperunterstützten Membranen mittels der Rasterkraftmikroskopie. Das Substrat wurde mit einem Teflonring befestigt. (A) Aufsicht und (B) Seitliche Ansicht.

Von den Stammlösungen der Lipide wurden zunächst Lipidfilme hergestellt. Dazu wurden die gewählten Lipide mit einer Gesamtlipidmenge von 0,3 mg im gewünschten molaren Verhältnis in ein gereinigtes Reagenzglas gegeben und anschließend das organische Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 55 °C verblasen. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wurden die erhaltenen Lipidfilme 3 h unter Vakuum bei 55 °C getrocknet und anschließend bei 4 °C gelagert. Der Lipidfilm wurde 20 min bei 55 °C unter 1 mL Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 1 mM CaCl₂, (225 ± 1) mOsmol/kg, pH 7,4) quellen gelassen. Nach 3x Schütteln für jeweils 30 s im Abstand von 5 min wurden multilamellare Vesikel erhalten. Diese wurden anschließend in unilamellare Vesikel (engl. *Large Unilamellar Vesicles*, LUVs) überführt. Dazu wurde die Vesikellösung 31× in einem Miniextruder (LiposoFast, Avestin, Ottawa, Kanada) durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 50 nm bei 55 °C gedrückt.

Anschließend wurden 200 µL der LUV-Lösung auf die vorbereiteten Substrate, die bereits auf 55 °C temperiert worden waren, gegeben. Die Ca²⁺-Konzentration wurde auf 10 mM erhöht und 10 min inkubiert. Danach wurden 800 µL Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 1 mM CaCl₂, (225 ± 1) mOsmol/kg, pH 7,4) gegeben und weitere 50 min bei 55 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden überschüssige Vesikel durch Spülen mit 100 mL PBS-Puffer (2,7 mM KCl, 136,9 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, (288 ± 3) mOsmol/kg, pH 7,4) oder CT-Puffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, (474 ± 4) mOsmol/kg, pH 7,5) entfernt

und die Ausbildung der festkörperunterstützten Membran fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

3.2.5 Cholesterinextraktion mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin

Mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin ist es möglich, selektiv Cholesterin aus Lipiddoppelschichten zu entfernen. Cyclodextrine sind wasserlöslich und enthalten eine hydrophobe Kavität, in die Moleküle geeigneter Größe eingelagert werden können. Die Größe der Kavität wird durch die Ringgröße bestimmt. Die häufigsten Ringgrößen sind hexamere (α CD), heptamere (β CD) und oktamere (γ CD) Cyclodextrine.^[115] β -Cyclodextrine haben aufgrund der Größe der Kavität die höchste Affinität für Cholesterin. Eine exemplarische Darstellung eines Cholesterin- β CD-Komplexes ist in Abb. 3-22 gezeigt.

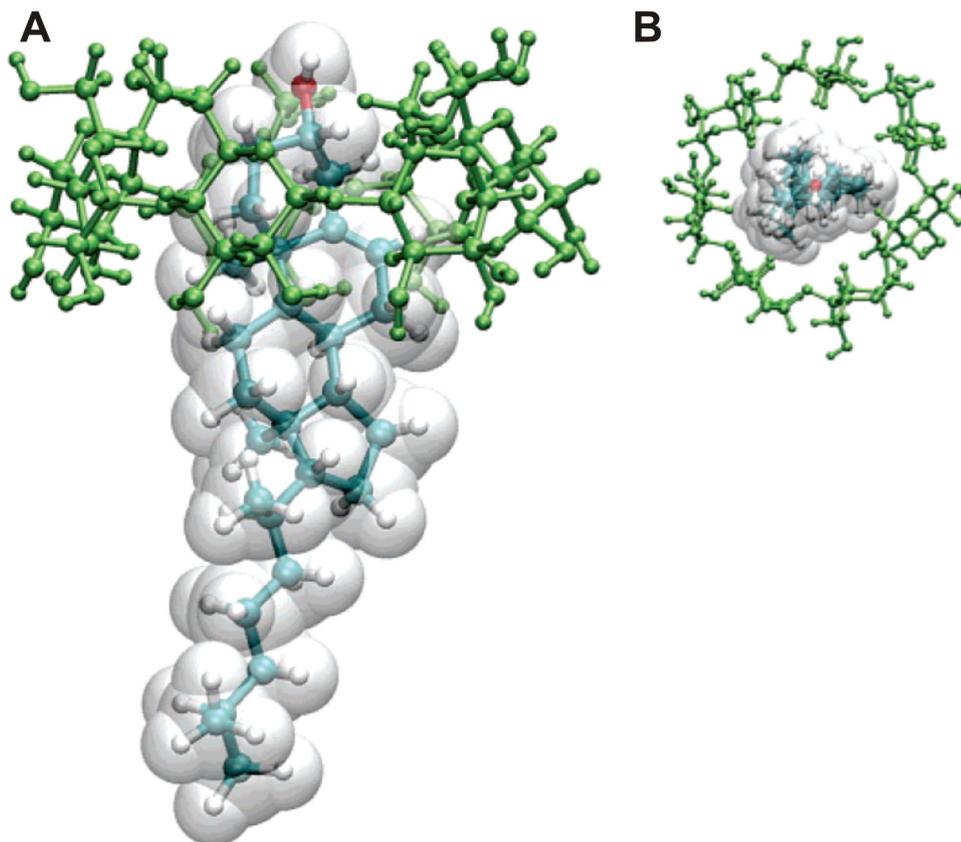


Abb. 3-22: Darstellung eines Cholesterin- β CD-Komplexes, berechnet anhand einer MD-Simulation.^[116] (A) Seitenansicht und (B) Aufsicht.

Die Wasserlöslichkeit des β -Cyclodextrins ist mit 2 % (*w:w*) niedrig, verglichen mit 13 % für α CD und 26 % für γ CD. Dies liegt an der Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen den sekundären Hydroxylgruppen. Die Einbringung von Methylgruppen unterbindet die Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken und erhöht dadurch die Wasserlöslichkeit des β -Cyclodextrins.^[34] Die Effektivität der Cholesterinextraktion hängt von vielen Faktoren ab. So sind z. B. die Konzentration des Cyclodextrins, die Inkubationszeit und die Temperatur der Probe entscheidend.^[117]

Durchführung

Zur Extraktion des Cholesterins in GUVs, porenüberspannenden und festkörperunterstützten Membranen wurde zunächst eine $m\beta$ CD-Stammlösung in Reinstwasser mit einer Konzentration von 50 mg/mL hergestellt. Von dieser wurden bei 20 °C entsprechende Volumina zu den Lipiddoppelschichten gegeben, sodass in der überstehenden Lösung eine $m\beta$ CD-Konzentration zwischen 0,5 und 10 mM erhalten wurde. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen konnte die sofortige Cholesterinextraktion beobachtet werden. Nach der jeweiligen Inkubationszeit (Kap. 4.2.3) wurden die Proben mit 100 mL PBS-Puffer gespült.

3.2.6 Anbindung der bakteriellen Shiga und Cholera Toxine

Die Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB) wurde am Institut Curie (Centre de Recherche, CNRS UMR 144, Laboratoire Trafic, Signalisation et Ciblage Intracellulaires, Paris, Frankreich) in *E. coli* exprimiert und über Ionenaustauschchromatografie gereinigt.^[118] Bis zur Verwendung wurde das aliquotierte Protein in PBS-Puffer bei -80 °C gelagert. Außerdem wurde fluoreszenzmarkiertes STxB eingesetzt, welches mit dem Fluorophor Cy3 über einen Lysinrest verknüpft wurde (Abb. 3-23). Dieser besitzt ein Absorptionsmaximum bei 548 nm und ein Emissionsmaximum bei 562 nm. Die Aktivität des Proteins wird durch die Fluoreszenzmarkierung nicht beeinflusst.^[67]

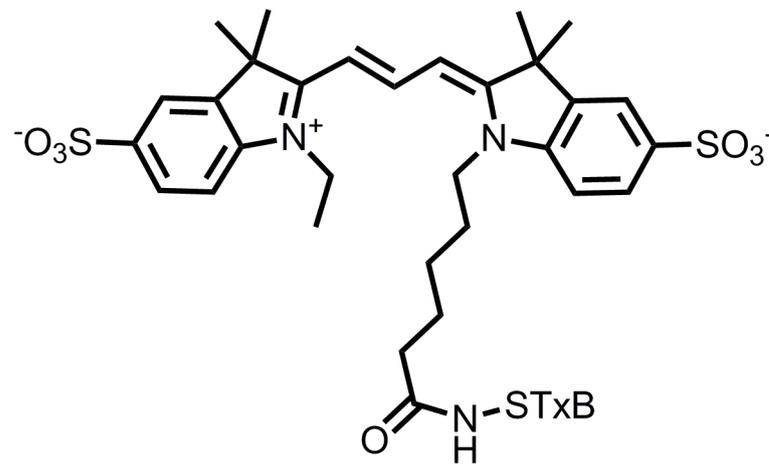


Abb. 3-23: Strukturformel des Fluorophors Cy3, der über einen Lysinrest unter Ausbildung einer Amidbindung an STxB angekoppelt wurde.

Die Cholera Toxin B-Untereinheit (CTxB, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) aus *Vibrio cholerae*, gelöst in CT-Puffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 3 mM NaN₃, 1 mM EDTA, pH 7,5) wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Visualisierung der Proteinanbindung wurde FITC-markiertes CTxB, gekoppelt über einen Lysinrest, (CTxB-FITC, Abb. 3-24, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) eingesetzt. Der Fluorophor FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) besitzt ein Absorptionsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum bei 525 nm.

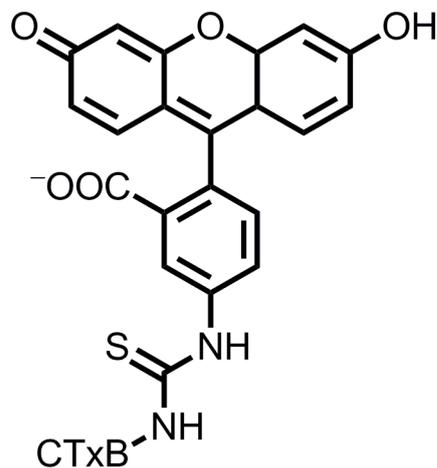


Abb. 3-24: Strukturformel von Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), das über einen Lysinrest unter Ausbildung eines Thioharnstoffs an CTxB angekoppelt wurde.

Durchführung

Die Experimente zur Bindung von STxB an porenüberspannende und festkörperunterstützte Membranen wurden in PBS-Puffer (2,7 mM KCl, 136,9 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , (288 ± 3) mOsmol/kg, pH 7,4) durchgeführt. 60 nM STxB oder fluoreszenzmarkiertes STxB-Cy3 (bezogen auf das STxB-Pentamer) wurden zu der jeweiligen Probe gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes und unspezifisch gebundenes Protein wurde durch vorsichtiges Spülen mit 100 mL PBS-Puffer entfernt.

Alle Experimente zur Bindung von CTxB an porenüberspannende und festkörperunterstützte Membranen wurden unter CT-Puffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, (474 ± 4) mOsmol/kg, pH 7,5) durchgeführt. ELISA-Aktivitätstests (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) zeigten, dass eine Belegung von 50 % gewährleistet wurde, wenn die Inkubationslösung eine Konzentration von 0,5 bis 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CTxB bzw. CTxB-FITC enthält.^[119] Zur vollständigen Bindung aller G_{M1} -Rezeptormoleküle wurde daher 1 h mit einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (entspricht 34,5 nM bezogen auf das CTxB-Pentamer) bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes und unspezifisch gebundenes Protein wurde durch vorsichtiges Spülen mit 100 mL CT-Puffer entfernt.

3.3 Fluoreszenzmikroskopie

3.3.1 Grundlagen

Als Fluoreszenz wird der Prozess bezeichnet, bei dem ein elektronisch angeregtes Molekül unter Aussendung eines Photons in seinen Grundzustand übergeht.^[120, 121] Die emittierte Strahlung klingt dabei innerhalb von Nanosekunden ab. Im Allgemeinen erfolgt der Übergang von einem angeregten Singulett-Zustand in den Singulett-Grundzustand. Bei der Phosphoreszenz hingegen erfolgt der Übergang nach einem *Intersystem Crossing* aus einem angeregten Triplett-Zustand in den Singulett-Grundzustand. Dieser Übergang ist verboten, da die Spinmultiplizität nicht erhalten bleibt. Daher dauert der Phosphoreszenzprozess länger (10^{-3} bis 1 s nach Ausschalten der Energiequelle). Beide Lumineszenzprozesse können anschaulich mit Hilfe eines Jablonski-Diagramms dargestellt werden (Abb. 3-25).

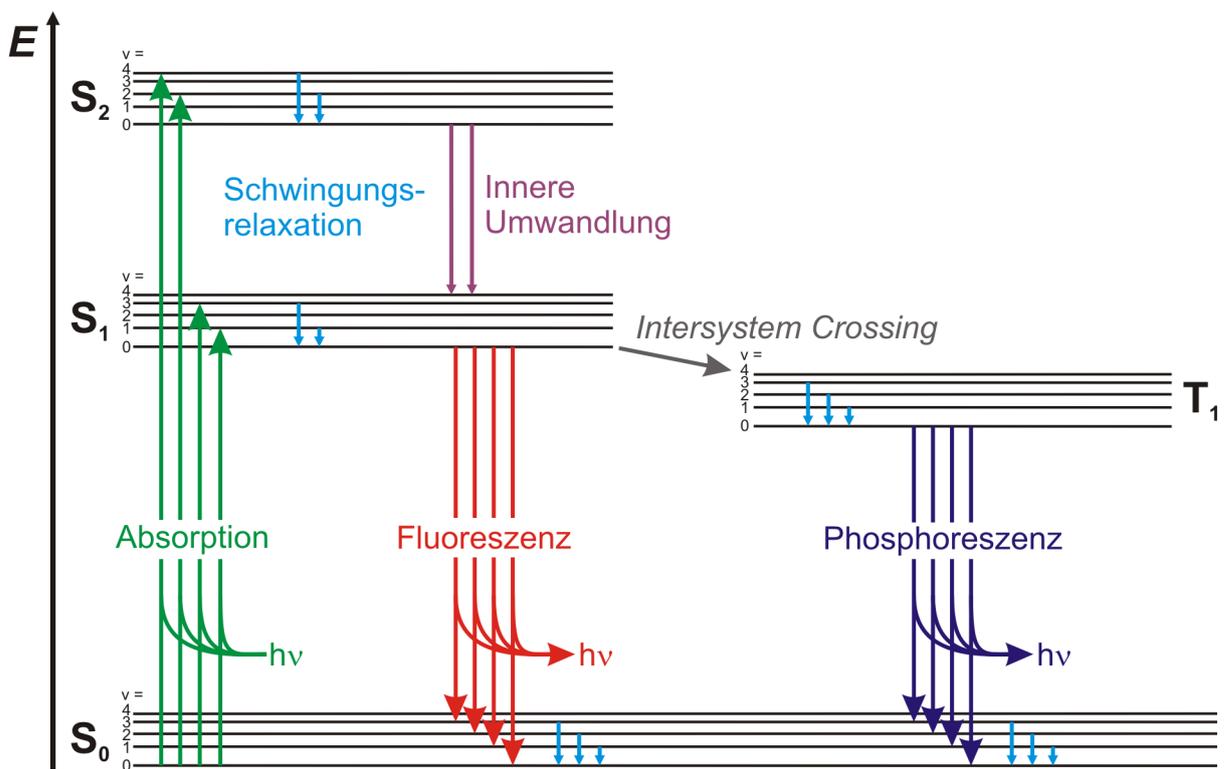


Abb. 3-25: Jablonski-Diagramm der möglichen Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen S_0 , S_1 , S_2 und T_1 . Die jeweiligen Schwingungsenergieniveaus sind durch die Schwingungsquantenzahl v ($v = 0, 1, 2 \dots$) gekennzeichnet.

Der Singulett-Grundzustand und die ersten beiden angeregten Singulett-Zustände sind als S_0 , sowie S_1 und S_2 dargestellt. In jedem dieser elektronischen Zustände sind die Schwingungsenergieniveaus mit der Schwingungsquantenzahl v ($v = 0, 1, 2 \dots$) gekennzeichnet. Bei der Anregung durch Licht geeigneter Wellenlänge erfolgt ein Übergang aus dem Grundzustand S_0 in höhere Schwingungsenergieniveaus der Zustände S_1 und S_2 . Dieser Übergang erfolgt schneller (10^{-15} s) als die Bewegung der Atomkerne (10^{-13} s) und es resultiert ein vertikaler Übergang (Franck-Condon-Prinzip^[122]). Die Anregung kann bereits durch ein Photon der entsprechenden Energie erzielt werden. Es ist aber auch möglich, dass die Anregung durch mehrere Photonen erfolgt (Multiphotonenanregung). Werden beispielsweise zwei Photonen mit der doppelten Wellenlänge (entsprechend der halben Energie) gleichzeitig eingestrahlt, so ist ebenfalls eine Anregung möglich (Zwei-Photonen-Anregung).^[123]

Der Fluorophor gelangt nach der Anregung in den untersten Schwingungszustand des ersten angeregten Zustands S_1 . Dies geschieht entweder durch Innere Umwandlung (engl. *Internal Conversion*) oder durch Schwingungsrelaxation. Innere Umwandlung bezeichnet einen Übergang zwischen verschiedenen elektronischen Zuständen (z. B. von S_2 nach S_1), während das Molekül im Falle der Schwingungsrelaxation Energie strahlungslos durch Stöße an Lösungsmittelmoleküle in der Umgebung abgibt und somit energetisch auf niedrigere Schwingungsniveaus abgesenkt wird. Beide Prozesse erfolgen innerhalb von 10^{-12} s und damit deutlich schneller als die Fluoreszenz in Lösung.^[123] Die Rückkehr in den Singulett-Grundzustand S_0 erfolgt nach dem Franck-Condon-Prinzip vertikal unter spontaner Emission eines Photons. Dieses Photon besitzt eine niedrigere Energie als das eingestrahelte Licht, da bereits Energie durch die Schwingungsrelaxation an Moleküle in der Umgebung abgegeben wurde. Die Verschiebung des emittierten Lichts zu niedrigeren Energien bzw. höheren Wellenlängen wird Stokes-Verschiebung genannt (Abb. 3-26).^[120, 124]

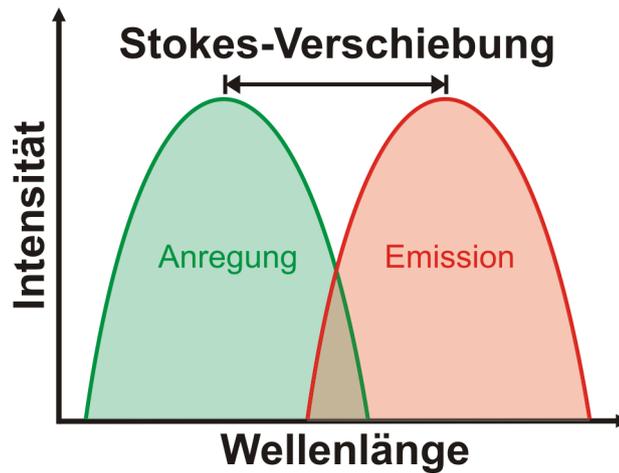


Abb. 3-26: Schematische Darstellung der Stokes-Verschiebung zwischen Anregungs- und Emissionslicht.

3.3.2 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

In der Fluoreszenzmikroskopie wird die Stokes-Verschiebung genutzt, um Moleküle gezielt mit einer Wellenlänge anzuregen und nur die rotverschobene Emission zu detektieren. Das eingestrahlte kürzerwellige Licht, das evtl. von der Probe reflektiert wird, wird dabei komplett herausgefiltert. Ein typischer Strahlengang eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops ist in Abb. 3-27 dargestellt.

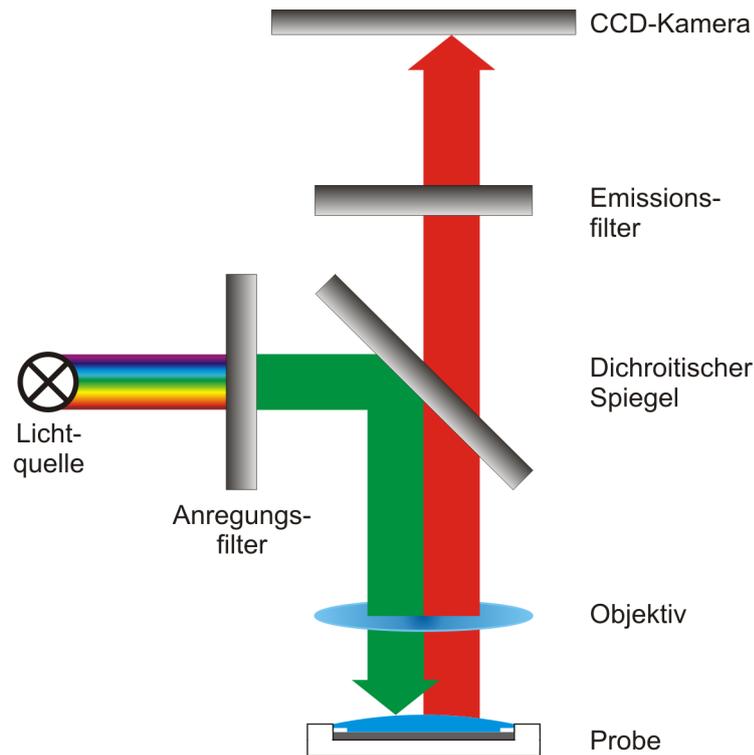


Abb. 3-27: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop.

Als Lichtquelle wird entweder eine Quecksilberdampf- oder eine Halogen-Lampe verwendet. Das weiße Licht, das noch alle Wellenlängen enthält, wird durch einen Anregungsfilter geleitet, der nur die selektierte Wellenlänge zur Anregung der Probe passieren lässt. Über einen dichroitischen Spiegel gelangt das Anregungslicht auf die zu untersuchende Probe. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht kann den dichroitischen Spiegel passieren, nicht jedoch das kürzerwellige Anregungslicht, das von der Probe reflektiert wird. Durch einen weiteren Filter, den Emissionsfilter, wird nur das emittierte Fluoreszenzlicht zum Okular oder zur CCD-Kamera (*Charge-Coupled Device*) weitergeleitet.

Die Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops ist begrenzt. Unter der Auflösung versteht man den kleinsten Abstand von zwei Punkten, bei dem diese Punkte noch getrennt wahrgenommen werden können. Die Auflösungsgrenze d kann mit Hilfe der Abbe'schen Formel (Gl. 3-3) berechnet werden.

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha}$$

Gl. 3-3

Dabei ist λ die Wellenlänge des Anregungslichts, n der Brechungsindex des Mediums und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs. Aus Gl. 3-3 wird deutlich, dass eine höhere Auflösung, und damit ein niedrigerer Wert für d , durch die Verwendung eines Objektivs mit einem größeren Öffnungswinkel erreicht werden kann. Häufig wird bei Objektiven die numerische Apertur NA angegeben (Gl. 3-4).

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad \text{Gl. 3-4}$$

Je höher die numerische Apertur, desto höher ist die resultierende Auflösung. Aus Gl. 3-3 wird außerdem ersichtlich, dass die Auflösung wellenlängenabhängig ist. Als Faustregel lässt sich ableiten, dass die Auflösungsgrenze ungefähr der halben Wellenlänge des Lichts entspricht.

Durchführung

In dieser Arbeit wurde das Auflicht-Fluoreszenzmikroskop AxioTech Vario (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit 40x Vergrößerung (W Achroplan, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) und einer numerischen Apertur von 0,8 eingesetzt.

Die artifiziellen Membranen wurden mit unterschiedlichen Fluorophoren dotiert. Die Fluorophore Bodipy-PC, C11 TopFluor-SM und Oregon Green DHPE wurden unter Einsatz des Filtersatzes 44 (Zeiss), der Fluorophor TexasRed DHPE und das fluoreszenzmarkierte STxB-Cy3 unter Einsatz des Filtersatzes 45 (Zeiss) angeregt und detektiert. Der Filtersatz 47 (Zeiss) wurde genutzt, um Perylen anzuregen und zu detektieren. Alle Filtersätze und deren Eigenschaften sind in Tab. 3-3 aufgeführt.

Tab. 3-3: Verwendete Filtersätze der Firma Zeiss (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland).

Filtersatz	$\lambda(\text{Absorption})/\text{nm}$	$\lambda(\text{Emission})/\text{nm}$	$\lambda(\text{Strahlteiler})/\text{nm}$
44	475 ± 40	530 ± 50	500
45	560 ± 40	630 ± 75	585
47	436 ± 20	480 ± 40	455

Die Nachbearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit der Software *AxioVision 4.8 LE* (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) und die Bildanalyse mit der Software *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

3.3.3 Konfokale Laserrastermikroskopie

Ein Nachteil der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie ist, dass Fluoreszenzlicht aus allen Ebenen der Probe gleichzeitig detektiert wird. Dadurch resultiert eine Aufnahme, die mit unscharfen Bildern der Ebenen, die sich nicht im Fokus befinden, überlagert wird. Um dieses Problem zu umgehen, entwickelte Minsky bereits in den 1950er Jahren das Konfokalmikroskop.^[125]

Zur Ausblendung des Fluoreszenzlichts, das nicht aus der Fokusebene stammt, wird eine zusätzliche Lochblende (engl. *Pinhole*) im Strahlengang des Mikroskops platziert (Abb. 3-28). Das eingestrahlte Licht wird in einem Punkt einer Ebene fokussiert. Die Blendengröße der Lochblende wird so eingestellt, dass die Brennebene der Lochblende im gleichen Punkt liegt, wie die des fokussierten Lichts. Beide Ebenen sind dadurch konfokal zueinander. Die Lochblende sorgt also dafür, dass nur Licht aus einer eingestellten Fokusebene in den Detektor gelangt. Durch diese Anordnung ist es nötig, die Probe im Rasterverfahren abzubilden, da jeweils nur ein Punkt der Probe beleuchtet und detektiert wird.

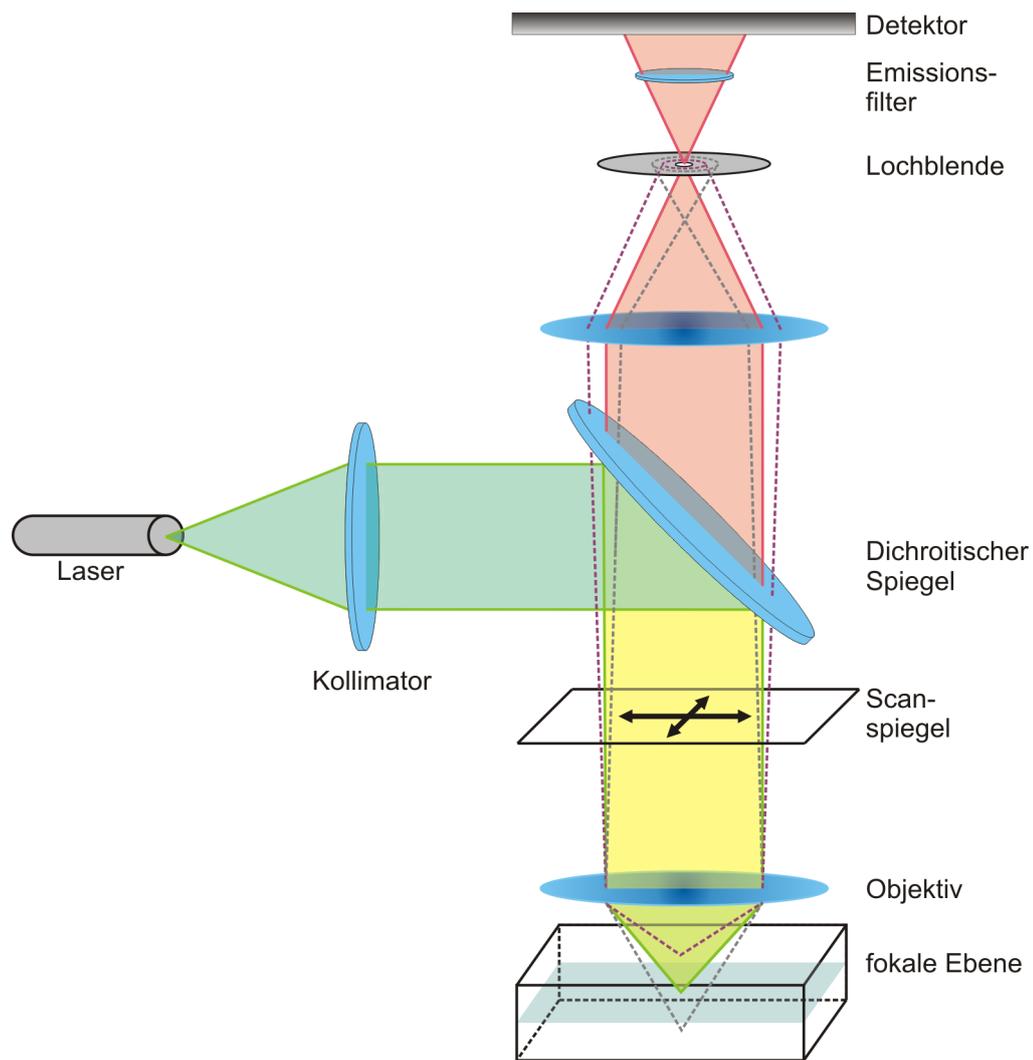


Abb. 3-28: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM).

In modernen Konfokalmikroskopen werden Laser eingesetzt, da sie monochromatisches Licht mit hoher Intensität erzeugen können. Über einen Kollimator wird der Laserstrahl zunächst aufgeweitet und über zusätzliche Scanspiegel im Strahlengang (Abb. 3-28) können alle Punkte innerhalb einer Ebene zeilenweise abgerastert werden. Daher wird diese Methode auch als konfokale Laserrastermikroskopie (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) bezeichnet. Eine zusätzliche Ansteuerung der Fokusebenen erlaubt die Aufnahme mehrerer übereinanderliegender Schnittebenen, die anschließend rekonstruiert werden können, um ein dreidimensionales Bild der Probe zu erhalten. Als Detektoren werden Sekundärelektronenvervielfacher (engl. *Photomultiplier Tube*, PMT) eingesetzt, da sie ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *Signal-To-Noise Ratio*, SNR) besitzen und über eine schnelle Reakti-

onszeit verfügen.^[126] Die laterale Auflösung ist, wie im Falle des Epifluoreszenzmikroskops, durch die Abbe-Bedingung (Gl. 3-3) begrenzt, kann aber durch die Verkleinerung der Lochblendengröße etwas gesteigert werden.

Durchführung

In dieser Arbeit wurde das Konfokalmikroskop LSM 710 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) mit der Software ZEN 2008 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Alle Aufnahmen wurden mit einem Wasserobjektiv mit 63x Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,0 (W Plan-Apochromat, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt.

In Tab. 3-4 sind die verwendeten Laser zur Anregung der jeweiligen Fluorophore und die Anregungswellenlängen λ_{exc} aufgeführt, sowie die Wellenlängenbereiche λ_{em} , in denen die Emission spektral getrennt aufgenommen wurde.

Tab. 3-4: Verwendete Laserlinien für die Anregung und jeweilige Detektionsbereiche der Emission aller eingesetzten Fluorophore.

λ_{exc}/nm	Lasertyp	Fluorophor	λ_{em}/nm
405	Diode	Perylen, Pacific Blue DMPE	409-479
488	Ar-Ionen	Bodipy-PC, Oregon Green DHPE, C11 TopFluor-SM	496-575
561	DPSS	TexasRed DHPE, Cy3	574-619
633	HeNe	Atto647N-SM	638-684

Zur Verbesserung der Abbildungsqualität wurden die einzelnen Laserlinien jeweils nacheinander eingestrahlt und die Emission dabei detektiert (*Track Scanning*). Des Weiteren wurde eine Farbtiefe von 16 Bit gewählt und bei Aufnahmen, die keine hohe zeitliche Auflösung erforderten, jede Scanlinie 16-fach gemittelt.

Die Nachbearbeitung der konfokalen Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit der Software ZEN 2009 LE (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) und die Bildanalyse mit der Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

3.3.4 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

Zur Bestimmung der lateralen Mobilität von Lipiden kann die Methode des *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) verwendet werden. Sie wurde vor allem von Axelrod^[127] und Soumpasis^[128] ausgearbeitet.

Bei FRAP-Experimenten wird eine Membran in einem meist kreisförmigen Bereich (*Region Of Interest*, ROI) gebleicht. Dabei wird die Fähigkeit der Fluorophore zu Fluoreszieren in diesem Bereich photochemisch zerstört.^[129] Aufgrund der lateralen Mobilität innerhalb der Membran können nicht-gebleichte Lipide in diesen ROI diffundieren bzw. gebleichte hinaus und die Fluoreszenzintensität des ROI steigt wieder an. Über eine zeitabhängige Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität im gewählten ROI ist es somit möglich, die laterale Mobilität der Lipide zu bestimmen.^[130]

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Software *ZEN 2008* (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland). An die Daten wurde ein monoexponentieller Fit angepasst (Gl. 3-5).

$$I(t) = I_{\text{eq}} - I_1 \cdot \exp(-t/T_1) \quad \text{Gl. 3-5}$$

Dabei ist $I(t)$ die Intensität am jeweiligen Zeitpunkt t , I_{eq} die Intensität des gebleichten ROI nach Erreichen des Gleichgewichtszustands und I_1 der mobile Anteil. Erhalten wird der Fitparameter T_1 . Zur Verdeutlichung sind alle Parameter in der normalisierten *Recovery*-Kurve eingetragen (Abb. 4-10).

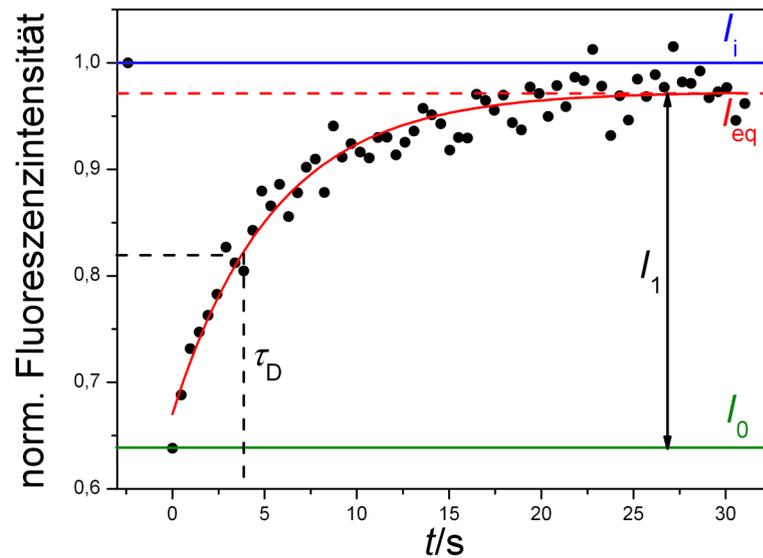


Abb. 3-29: Recovery-Kurve des FRAP-Experiments aus Abb. 4-10 mit eingetragenen Parametern I_i , I_{eq} , I_0 und τ_D , normalisiert auf die Fluoreszenzintensität vor Beginn des Bleichens unter Abzug der Fluoreszenzintensität des Referenz-ROI.

Aus T_1 lässt sich über Gl. 3-6 die Zeit τ_D , in der die Hälfte der Intensität des gebleichten ROI im Gleichgewicht erreicht wurde, berechnen.

$$\tau_D = \ln 0,5 \cdot (-T_1) \quad \text{Gl. 3-6}$$

Der Diffusionskoeffizient D kann aus der Halbwertszeit τ_D und dem Radius ω des ROI berechnet werden (Gl. 3-7).

$$D = \frac{\omega^2}{4 \cdot \tau_D} \quad \text{Gl. 3-7}$$

Mit Hilfe der Fluoreszenzintensität I_i vor dem Bleichen und der Intensität I_0 direkt nach dem Bleichen kann außerdem der prozentuale mobile Anteil F_m (Gl. 3-8) und der immobile Anteil F_i (Gl. 3-9) berechnet werden.

$$F_m = \frac{I_1}{I_i - I_0} \quad \text{Gl. 3-8}$$

$$F_i = 1 - F_m \quad \text{Gl. 3-9}$$

3.4 Rasterkraftmikroskopie

Die Auflösung von Lichtmikroskopen ist, wie in Kap. 3.3 dargestellt, durch die Abbe'sche Bedingung (Gl. 3-3) begrenzt. So können mit Licht im sichtbaren Bereich nur Strukturen bis zu einer Grenze von etwa 200 nm unterschieden werden. Eine Aufhebung dieser Grenze ist nicht möglich. Jedoch wurden weitere Fluoreszenzmethoden entwickelt, die eine deutlich bessere Auflösung ermöglichen (*Superresolution Microscopy*). Bei der STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion*) können Fluoreszenzfarbstoffe gezielt ausgeschaltet werden. Dazu wird die Probe mit einem Laserstrahl angeregt und gleichzeitig mit einem zweiten Laserstrahl überlagert. Letzterer ist torusförmig und führt dazu, dass die angeregten Fluoreszenzmoleküle in diesem Bereich durch stimulierte Emission wieder in den Grundzustand gelangen. Dadurch fluoreszieren nur die Moleküle im Zentrum des Anregungsfokus und eine Auflösung im Bereich von 30 nm kann erreicht werden.^[27, 131, 132]

Eine weitere Möglichkeit der Umgehung der klassischen Auflösungsgrenze ist möglich durch Verwendung von Methoden wie PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*) und STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*). Dabei wird auch die Fluoreszenzemission im Bereich des sichtbaren Lichts detektiert, allerdings werden die einzelnen Fluorophore gezielt ein- und ausgeschaltet. Das fortlaufende Ein- und Ausschalten der Moleküle wird eine bestimmte Zeit lang aufgenommen. Anschließend wird aus allen aufgenommenen Fluoreszenzbildern die genaue Position errechnet. Dadurch kann eine Auflösung von 2 bis 20 nm erzielt werden.^[133]

Ein Nachteil aller Fluoreszenzmethoden ist die mögliche Störung des zu untersuchenden Systems durch eingebrachte Fluoreszenzsonden. Je nach Größe der fluorophoren Gruppen können diese z. B. das Phasenverhalten von Lipiden in Membranen beeinflussen. Eine hochauflösende Mikroskopieart, bei der die zu untersuchenden Proben nicht mit zusätzlichen Farbstoffmolekülen dotiert werden müssen, ist die Rasterkraftmikroskopie (engl. *Scanning Force Microscopy*, SFM oder *Atomic Force Microscopy*, AFM). Diese wurde erstmals 1986 von Binnig vorgestellt.^[134] Sie beruht auf dem mechanischen Abtastvorgang einer feinen Messspitze. Dadurch ist es möglich, ein topographisches Höhenbild der Probe aufzunehmen. Mit Hilfe der Raster-

kraftmikroskopie ist es möglich, biologische Proben zu untersuchen. Im Gegensatz zu weiteren hochauflösenden Methoden, wie Rasterelektronenmikroskopie (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) und Rastertunnelmikroskopie (engl. *Scanning Tunneling Microscopy*, STM), müssen AFM-Experimente nicht unter Vakuum durchgeführt werden und können daher in Lösung erfolgen. Außerdem können nichtleitende Proben untersucht werden. Die laterale Auflösung ist abhängig von der Spitzegeometrie und beträgt 1 nm, während die vertikale Auflösung 0,1 nm beträgt.

3.4.1 Messprinzip

Die Messspitze des Rasterkraftmikroskops ist an der Unterseite eines Federbalkens (engl. *Cantilever*) befestigt. Die Ansteuerung der *Cantilever*-Bewegung in *x*-, *y*- und *z*-Richtung erfolgt über Piezo-Elemente. Dies sind Keramik-Elemente, die sich unter Anlegen einer Spannung mechanisch verformen. Auf die Rückseite des *Cantilevers* wird ein Laserstrahl positioniert. Dieser wird reflektiert, über einen Spiegel geleitet und auf einer 4-Quadranten-Photodiode detektiert (Abb. 3-30). Über die Flächenanteile der beleuchteten Quadranten kann die Verbiegung des *Cantilevers* in *z*-Richtung (vertikale Verbiegung, engl. *Vertical Deflection*) und in seitlicher Richtung (laterale Verbiegung, engl. *Lateral Deflection*) ermittelt werden. Die vertikale *Cantilever*-Verbiegung wird beispielsweise aus dem Anteil der beleuchteten Fläche der A-Quadranten ($A_A - A_B$, obere Quadranten in Abb. 3-30) an der Gesamtfläche der beleuchteten Photodiode ($A_A + A_B$) mit Hilfe von Gl. 3-10 bestimmt.

$$A_A (\%) = \frac{A_A - A_B}{A_A + A_B} \quad \text{Gl. 3-10}$$

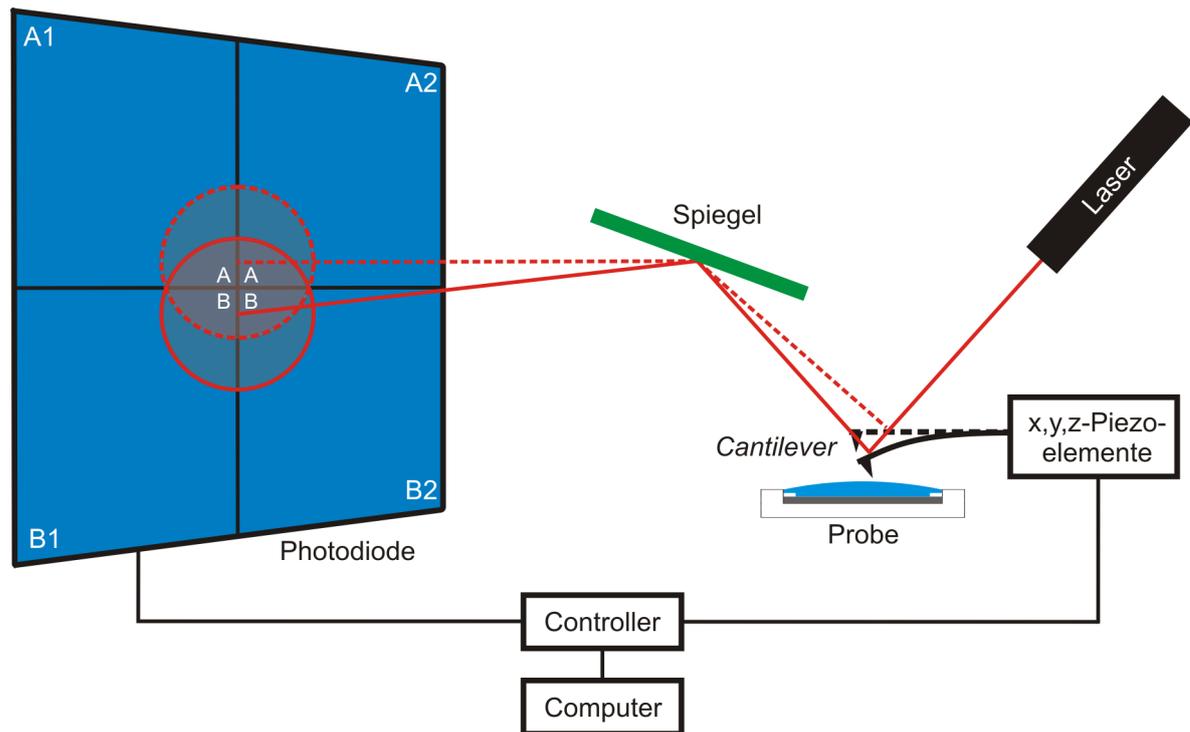


Abb. 3-30: Schematische Darstellung des AFM-Messprinzips. Ein Laserstrahl wird auf die Rückseite eines *Cantilevers* positioniert. Dessen Reflektion wird über einen Spiegel auf eine 4-Quadranten-Photodiode geleitet. Der Steuerung erfolgt über einen Controller mit angeschlossenem Computer.

Bei der Abweichung einer Regelgröße (z. B. der eingestellten vertikalen Verbiegung) erfolgt die Rückregelung über einen PID-Regler (Proportional-Integral-Differential-Regler). Regler vergleichen das eingestellte Soll-Signal mit dem gemessenen Ist-Signal und ermitteln aus der Differenz der beiden Signale, der sogenannten Regelabweichung, eine Stellgröße, die die Regelabweichung minimiert. Weicht z. B. die vertikale Verbiegung des *Cantilevers* vom eingestellten Soll-Wert ab, so kann der Ist-Wert über die Ansteuerung eines z-Piezo-Elementes (entspricht der Stellgröße) verändert werden.

In Abb. 3-31 ist das Verhalten der jeweiligen Regler auf eine registrierte Höhenänderung (Abb. 3-31 A), ermittelt durch die vertikale Verbiegung des *Cantilevers*, dargestellt. Der Proportional-Regler (P-Regler) ist ein proportionaler Verstärker. Er reagiert unmittelbar auf die Regelabweichung (in diesem Fall die Abweichung von der eingestellten vertikalen Verbiegung), aber kann die Regelabweichung nicht exakt kompensieren. Dadurch über- oder untersteuert ein P-Regler oft. Die Sprungantwort des Ausgangssignals ist in Abb. 3-31 B dargestellt.

Der Integral-Regler (I-Regler) berücksichtigt das zeitliche Verhalten der Regelabweichung, indem er über eine gewisse Zeit diese integriert. Dadurch ist der I-Regler zwar ein sehr genauer Regler, aber insgesamt ein langsamer Regler. Die Sprungantwort des Ausgangssignals liefert einen linearen Anstieg (Abb. 3-31 C).

Der Differential-Regler (D-Regler) differenziert nur. Er reagiert zwar auf die Regelabweichung, also auf die Abweichung der eingestellten vertikalen Verbiegung, aber nicht auf die Höhe dieser Abweichung. Die Sprungantwort des Ausgangssignals (Abb. 3-31 D) zeigt die Reaktion auf die Regelabweichung. Die Sprungantwort des gesamten PID-Reglers ist in Abb. 3-31 E dargestellt und zeigt nach dem Registrieren der Höhenänderung eine Übersteuerung, sowie nach dem Abfall auf die ursprüngliche Höhe eine Untersteuerung.

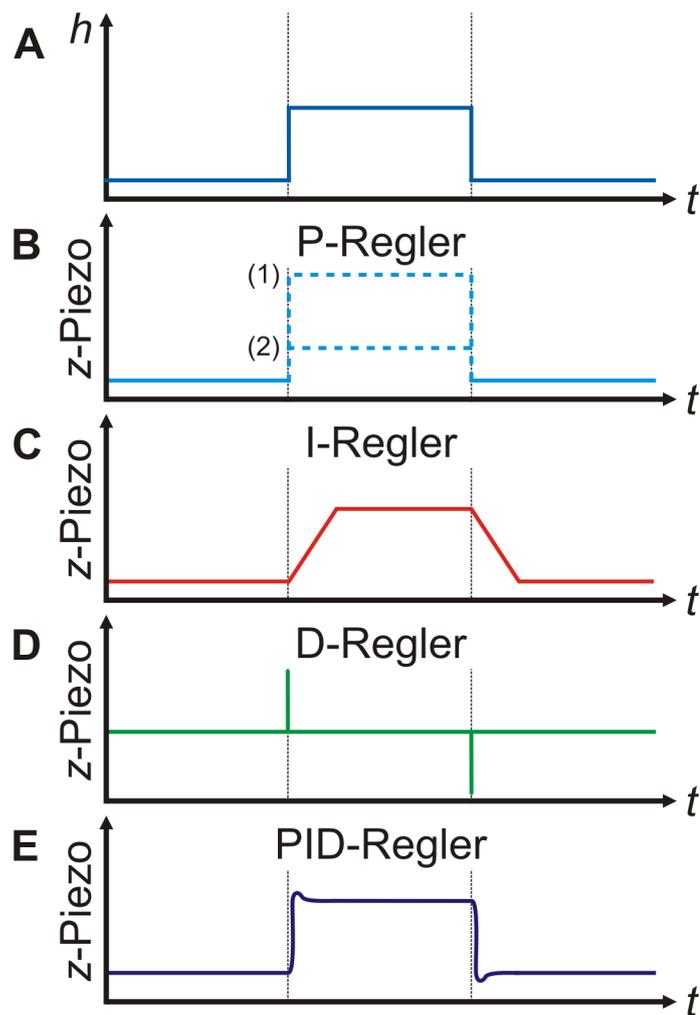


Abb. 3-31: Darstellung der PID-Regelung in der Rasterkraftmikroskopie. (A) Die registrierte Höhenänderung, ermittelt durch die vertikale Verbiegung des *Cantilevers*, und die jeweiligen Sprungantworten des P-Regler (B), I-Reglers (C), D-Reglers (D) und des gesamten PID-Reglers (E). Eine Übersteuerung des P-Reglers ist im Fall (1) und eine Untersteuerung im Fall (2) gezeigt.

3.4.2 Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen im *Contact Mode*

Der *Contact Mode* ist der wichtigste statische Modus des Rasterkraftmikroskops. Bei der Messung befindet sich die Messspitze in ständigem Kontakt mit der Probe (Abb. 3-32). Dabei gibt es zwei verschiedene Betriebsmodi. Beim *Constant Height Mode* erfolgt keine Nachregelung der Höhe durch den z-Piezo. Dieser Modus wird daher auch oft „unregelter Modus“ genannt und ist gut für ebene Proben geeignet, die aufgrund der fehlenden Nachregelung, sehr schnell abgerastert werden können.

Im *Constant Force Mode* wird die auf den *Cantilever* wirkende Kraft konstant gehalten. Dazu wird die zu applizierende Kraft vorgegeben (*Setpoint Force*). In einer Rück-

kopplungsschleife wird diese Kraft mit der tatsächlich auf den *Cantilever* wirkenden Kraft verglichen. Eine Höhenänderung auf der Substratoberfläche resultiert in einer Änderung der vertikalen Verbiegung des *Cantilevers* und wird auf der Photodiode detektiert. Die am z-Piezo-Element anliegende Spannung wird nun durch die Rückkopplungsschleife geändert. Dadurch wird der Abstand zwischen *Cantilever* und Substratoberfläche so verändert, dass die eingestellte Verbiegung und damit die auf den *Cantilever* wirkende Kraft wieder erreicht wird. Während des Rasterns der Probe wird die Spannung, die auf den z-Piezo gegeben wird, um die vertikale Verbiegung konstant zu halten, aufgezeichnet. Aus dieser Information wird schließlich die Höheninformation der Probe erhalten.^[135]

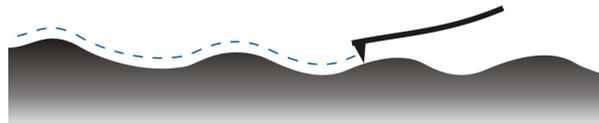


Abb. 3-32: Schematische Darstellung der rasterkraftmikroskopischen Messung im *Contact Mode*. Die Messspitze befindet sich in ständigem Kontakt mit der Probenoberfläche.

3.4.3 Einflüsse auf die Bildqualität

Bei der Durchführung von AFM-Experimenten wird die Probe zeilenweise gerastert. Dabei fährt die Messspitze während des Scannens, z. B. in x -Richtung (*Trace*) und wieder zurück (*Retrace*). Anschließend wird die nächste Zeile, versetzt in y -Richtung, auf diese Weise gescannt. Das entstehende Bild kann somit in eine schnell zu scannende Achse (in diesem Fall die x -Achse, *Fast Scan Axis*) und eine langsam zu scannende Achse (in diesem Fall die y -Achse, *Slow Scan Axis*) eingeteilt werden. Es ist zusammengesetzt aus der tatsächlichen Oberfläche der Probe und der Geometrie der Messspitze.

Eine zu breite Messspitze führt dazu, dass feine Übergänge nicht scharf genug dargestellt werden und die genauen Abmessungen von Objekten auf der Oberfläche fehlerhaft bestimmt werden (Abb. 3-33 A). Die Tiefe von Löchern in der Probe kann durch eine zu breite Messspitze nicht korrekt ermittelt werden, da diese den tiefsten Punkt nicht erreichen kann (Abb. 3-33 B). Weiterhin werden oft sphärische Objekte,

z. B. runde Löcher in Substraten, nicht korrekt abgebildet und abhängig von der Form der Messspitze dreieckförmig dargestellt.^[136]

Stärkere Abbildungsfehler entstehen bei Verunreinigungen und Fehlstellen an der Messspitze. So können z. B. Defekte der Messspitze dazu führen, dass ein doppeltes Bild erhalten wird („Doppelspitze“, Abb. 3-33 C). Verunreinigungen der Spitze sind daran erkennbar, dass sich die Abbildungsqualität während des Scannens unerwartet verschlechtert. Da die Spitze in diesem Fall eine unregelmäßig geformte Struktur bekommt, wird die Probenoberfläche nicht korrekt abgebildet (Abb. 3-33 D).^[136]

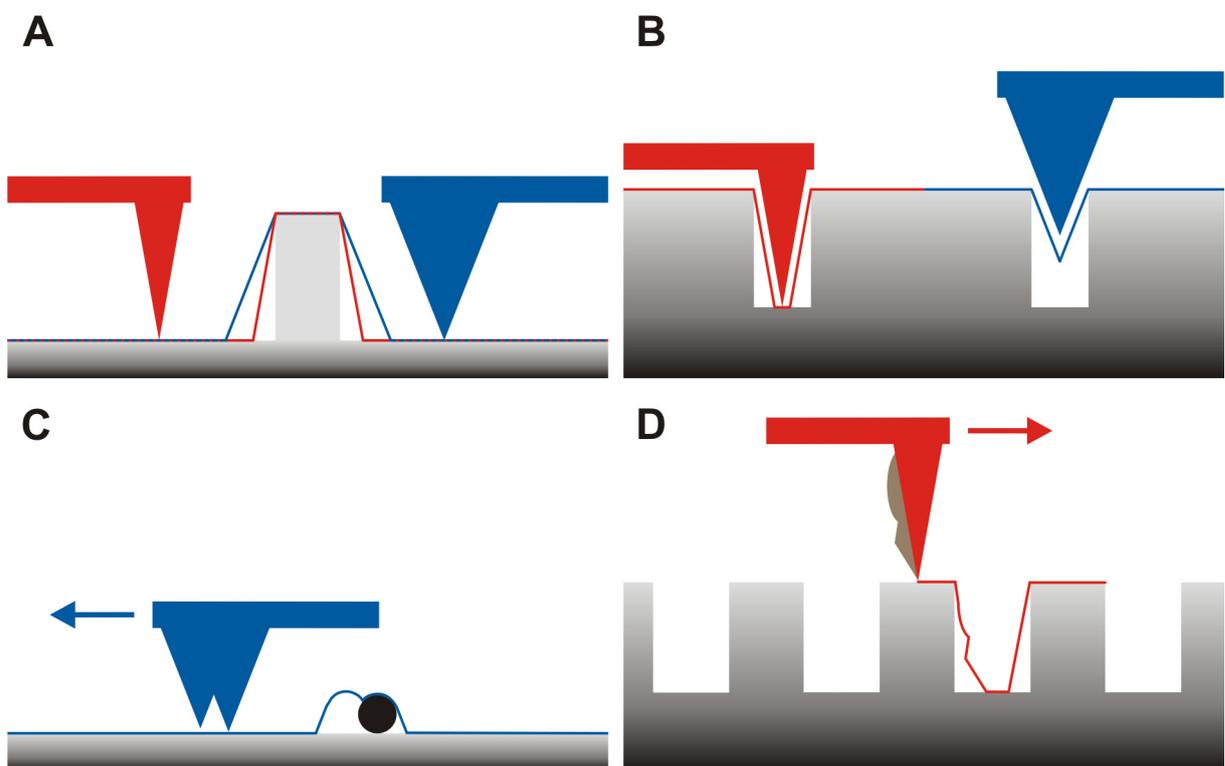


Abb. 3-33: Typische Abbildungsfehler während rasterkraftmikroskopischer Messungen. (A) Zu breite Spitzen (blaue Spitze) führen dazu, dass Objekte breiter dargestellt werden. (B) Die exakte Tiefe von Löchern kann durch zu breite Spitzen (blaue Spitze) nicht abgebildet werden. (C) Eine „Doppelspitze“ verursacht ein doppeltes Bild. (D) Verunreinigungen an der Spitze führen zu einer fehlerhaften Abbildung der Proben topografie.

Die oben genannten Fehlerquellen betreffen hauptsächlich die laterale Abbildungsqualität. Die vertikale Auflösung ist unabhängig von der Spitzengeometrie. Sie wird hauptsächlich durch andere Faktoren beeinträchtigt. Externe Schwingungen, z. B. Gebäudeschwingungen oder akustische Schwingungen, liegen oft im Bereich der Resonanzfrequenzen der verwendeten *Cantilever*. Diese führen zu Artefakten, da die

hohe Sensitivität des AFM bereits sehr geringe Unterschiede in der *Cantilever*-Verbiegung detektieren kann. Abhilfe schaffen hier Schallschutzboxen und die Platzierung des Messkopfes auf einem schwingungs isolierten Tisch. Auch die fehlerhafte Einstellung der Regelgrößen kann zur Einbringung von Schwingungen in der Aufnahme führen. Daher müssen bei jeder Aufnahme Parameter wie die Scangeschwindigkeit und die voreingestellte Kraft, sowie die Rückregelung durch die proportionalen und integralen Regler erneut eingestellt werden.^[136]

3.4.4 Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Rasterkraftmikroskop NanoWizzard I und II (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) mit der Software *SPM Desktop 4.0* (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Die Substrate Silizium und Mica wurden in Teflonkammern eingespannt und die darauf gespreiteten festkörperunterstützten Membranen unter PBS-Puffer vermessen (Kap. 3.2.4). Alle Aufnahmen wurden im *Contact Mode* unter Benutzung des *Constant Force Mode* durchgeführt. Dabei wurden Silizium-*Cantilever* (CSC38/no Al, MikroMasch, Tallinn, Estland) mit einer nominalen Federkonstante von $k = 0,03 \text{ N/m}$ und einer Resonanzfrequenz von $f_0 = 10 \text{ kHz}$ verwendet. Die Auflösung betrug 512×512 Pixel, die Scanfrequenz lag zwischen 0,5 und 1,5 Hz (entspricht einer Scangeschwindigkeit von 30 bis $90 \mu\text{m/s}$) und es wurde mit einer typischen Kraft von $F = 0,24 \text{ nN}$ gemessen.

Die Nachbearbeitung der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit der *Data Processing Software 4.0* (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) und die Höhenanalyse mit der Statistikfunktion von *Gwyddion 2.25* (<http://gwyddion.net>).

4 Ergebnisse

Zur Untersuchung der lateralen Organisation der zellulären Plasmamembran werden häufig artifizielle Modellmembranen eingesetzt. Dabei wurde der Einfluss einer unterliegenden Netzwerkstruktur bisher wenig berücksichtigt. Die zelluläre Plasmamembran ist an das Zytoskelett der Zelle geknüpft. Porenüberspannende Membranen sind dazu geeignet, diesen Aufbau nachzubilden, da die Membran einerseits auf den Stegbereichen verankert ist und andererseits freistehende Membranbereiche aufweist.

Zunächst lag der Fokus dieser Arbeit auf der Entwicklung eines neuartigen Modellsystems für die zelluläre Plasmamembran basierend auf porenüberspannenden Membranen. Dieses System wurde nach dessen Charakterisierung genutzt, um die Lipidreorganisationsprozesse, ausgelöst durch die Bindung von bakteriellen Toxinen, wie Shiga und Cholera Toxin, detaillierter aufzuklären. Weiterhin wurde im Speziellen der Einfluss der molekularen Struktur des Shiga Toxin-Rezeptors Gb₃ auf die laterale Organisation von festkörperunterstützten Membranen in Abhängigkeit der Proteinbindung analysiert.

4.1 Die Phasenseparation der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20)

Die ternäre Lipidmischung 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC)/Sphingomyelin/Cholesterin wird häufig als Modellsystem für die exoplasmatische Seite der zellulären Plasmamembran eingesetzt.^[29-31] Bei Raumtemperatur bildet diese Mischung in einem bestimmten Mischungsbereich (Abb. 1-6) Sphingomyelin- und Cholesterin-angereicherte Domänen aus, die sich im flüssig-geordneten Zustand (engl. *liquid-ordered*, *l_o*) befinden. In Koexistenz mit diesen Bereichen befindet sich eine DOPC-angereicherte, flüssig-ungeordnete (engl. *liquid-disordered*, *l_a*) Phase. In Mo-

dellmembransystemen wird dieses Phasenverhalten untersucht, um Rückschlüsse auf die Situation in Zellen ziehen zu können.^[95] In der zellulären Plasmamembran, die auf der exoplasmatischen Seite mit Sphingomyelin und Glykosphingolipiden angereichert ist^[4, 96, 137, 138], wird die Ausbildung von Membran-Nanodomänen, sogenannten *Lipid Rafts*, diskutiert.^[5, 139] Diese bestehen vermutlich aus (Glykosphingo-)lipiden und Cholesterin.^[12] Die gewählte Lipidmischung soll die Eigenschaften der zellulären Plasmamembran simulieren (Zusammensetzung siehe Kap. 1.1). Dabei werden die postulierten *Lipid Rafts* den l_o -Domänen in der artifiziellen Membran zugeordnet. *In vitro*-Experimente an artifiziellen Membranen zeigen jedoch l_o -Domänen im Mikrometerbereich^[30, 36], da die Linienspannung an den Domänenrändern durch eine Kondensation der l_o -Domänen minimiert wird.^[39, 40] Daraus ergibt sich der Vorteil, dass die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht wird.

Frühere Untersuchungen an porenüberspannenden Membranen basierten häufig auf sogenannten mikro-*Black Lipid Membranes* (mikro-BLMs).^[46, 47, 140] Diese werden mit Hilfe der *Painting*-Technik aus einer organischen Lipidlösung hergestellt. Dabei kann restliches Lösungsmittel in den porenüberspannenden Membranen verbleiben und einen Einfluss auf die laterale Organisation ausüben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher auf diese Art der Präparation verzichtet und es wurde das Spreiten von Vesikeln auf porösen Substraten angewendet. Dazu mussten zunächst Riesenvesikel (engl. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUVs) hergestellt werden, deren Durchmesser größer als der Durchmesser der porösen Substrate ist. Zur Visualisierung der Vesikel und des Phasenverhaltens der Lipidmischung wurden diese mit Fluorophoren dotiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

4.1.1 Phasenseparation in Riesenvesikeln

Zur Visualisierung des Phasenverhaltens in GUVs wurde die Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) mit zwei verschiedenen Fluoreszenzsonden dotiert. Das Glykosphingolipid Gb₃ wurde in diese GUVs inkorporiert, da es der zelluläre Rezeptor für die Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB) ist, dessen

Einfluss auf die laterale Organisation porenüberspannender Membranen in Kap. 4.2.4 untersucht wird. Der Fluorophor Bodipy-PC wurde eingesetzt, da bekannt ist, dass dieser in der l_d -Phase angereichert ist (Kap. 3.1.2). Fluoreszenzaufnahmen von GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) bei Raumtemperatur zeigen sowohl im äquatorialen Schnitt (Abb. 4-1 A) als auch im rekonstruierten 3D-Bild (Abb. 4-1 B), dass der Fluorophor selektiv in einigen Membranbereichen (grüne Bereiche) angereichert ist, die somit der l_d -Phase zugeordnet werden können. Die dunklen Membranbereiche in den Bodipy-PC-Fluoreszenzaufnahmen werden der l_o -Phase zugeordnet (Abb. 4-1 A, B).

Als weitere Fluoreszenzsonde wurde Perylen verwendet. Dieser Fluorophor zeigt in GUVs der gewählten Lipidmischung keine Präferenz für eine bestimmte Phase, sondern ist homogen in der Lipiddoppelschicht verteilt (Abb. 4-1 C). Er kann deshalb als Nachweis einer Membran verwendet werden. Die Betrachtung beider Fluoreszenzkanäle ermöglicht die eindeutige Zurechnung von unterschiedlichen Membrandomänen zur l_d - (grün im Bodipy-PC-Kanal, blau im Perylen-Kanal) und zur l_o -Phase (dunkel im Bodipy-PC-Kanal, blau im Perylen-Kanal).

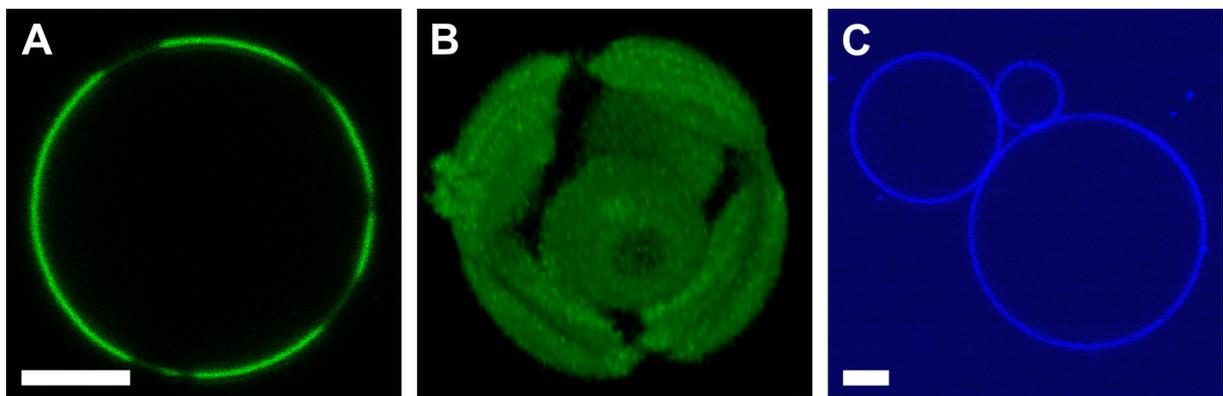


Abb. 4-1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUVs, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5). Der Fluorophor Bodipy-PC zeigt die Separation in eine *liquid-disordered* (grüne Bereiche, l_d) und eine *liquid-ordered* (schwarze Bereiche, l_o) Phase. (A) Äquatorialer Schnitt und (B) rekonstruiertes 3D-Bild. (C) Der Fluorophor Perylen ist homogen in der Membran verteilt. Maßstabsbalken: 5 μ m.

Das Glykosphingolipid Gb₃ wurde in GUVs inkorporiert, indem 5 mol% des Sphingomyelins substituiert wurden. Die Wechselwirkung der Zuckerkopfgruppe dieses Moleküls könnte die laterale Organisation der Membran über Wasserstoffbrü-

cken mit umgebenden Lipiden zusätzlich beeinflussen. Um dies zu überprüfen, wurden GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) hergestellt, die ebenfalls mit den Fluorophoren Bodipy-PC und Perylen dotiert wurden. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dieser Vesikel zeigten eine ähnliche Domänenmorphologie und das gleiche Phasenverhalten der beiden Fluorophore, wie im Falle der Gb₃-enthaltenden Vesikel. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Substitution des Sphingomyelins gegen Gb₃ keine signifikante Änderung auf das Phasenverhalten von Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) und deren laterale Organisation hat. Safouane *et al.* konnten in Experimenten mit GUVs ebenfalls zeigen, dass die Substitution von Sphingomyelin gegen Gb₃ das Phasenverhalten der Vesikel nicht beeinflusste.^[141]

4.1.2 Untersuchung von Fluorophoren zur Markierung der *l_o*-Phase

In der Literatur sind zahlreiche Fluorophore bekannt, die sich in den weniger geordneten Phasen von phasenseparierten Lipidmischungen bevorzugt anreichern und wenige, die selektiv geordnete Membranbereiche markieren.^[33] Für viele Moleküle gilt, je ausgedehnter das π -System, desto besser sind die Fluoreszenzeigenschaften. Deshalb werden oft große Fluoreszenzsonden an das zu untersuchende Molekül angehängt. Diese können das Phasenverhalten deutlich beeinflussen und somit möglicherweise zu Verfälschungen der Ergebnisse führen.^[32]

Für die spätere Charakterisierung der porenüberspannenden Membranen wurde versucht, einen Fluorophor zu finden, der selektiv die *l_o*-Phase von Membranen markiert. Ausgehend von früheren Untersuchungen von Baumgart *et al.*, die eine ausschließliche Markierung der *liquid-ordered* (*l_o*)-Phase von GUVs der Zusammensetzung DOPC/egg-Sphingomyelin/Cholesterin (in unterschiedlichen Molverhältnissen) beobachteten^[102], wurde, wie in Kap. 4.1.1 beschrieben, zunächst das Phasenverhalten des Perylens getestet. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) zeigten, dass dieses homogen in beiden beobachteten Phasen der Lipiddoppelschicht verteilt

ist (Abb. 4-1), wie von Baumgart *et al.* in späteren Arbeiten an GUVs, die ebenfalls Sphingomyelin aus Rinderhirn enthielten, ebenfalls beobachtet wurde.^[33]

Da vermutet wird, dass die l_o -Phase artifizierlicher Membranen hauptsächlich mit Sphingomyelin und Cholesterin angereichert ist, wurde als nächstes versucht, mittels fluoreszenzmarkierter Sphingomyeline eine Markierung der l_o -Phase zu erzielen.

Phasenverhalten des Atto647N-markierten Sphingomyelins

Zunächst wurde in GUVs das Phasenverhalten eines Atto647N-markierten Sphingomyelins (Atto647N-SM, Kap. 3.1.2) untersucht. Dazu wurde die Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) mit Atto647N-SM dotiert, so dass ein Lipid/Fluorophor-Verhältnis von 10 000:1 erhalten wurde. Die l_a -Phase von GUVs wurde mit 0,5 mol% des Fluorophors Pacific Blue DMPE visualisiert, da dieses analog zu Bodipy-PC in der l_a -Phase angereichert ist (Kap. 3.1.2). Die Fluoreszenzaufnahmen der GUVs zeigen, dass das Atto647N-markierte Sphingomyelin in der gleichen Phase angereichert ist, wie Pacific Blue DMPE und somit ebenfalls die l_a -Phase markiert (Abb. 4-2).

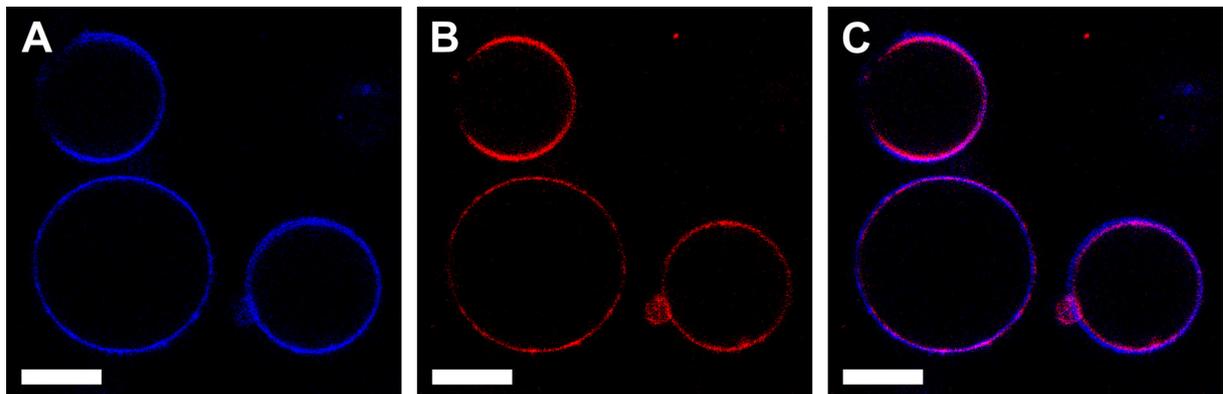


Abb. 4-2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20), dotiert mit Atto647N-Sphingomyelin in einem Lipid/Fluorophor-Verhältnis von 10 000:1 und 0,5 mol% Pacific Blue DMPE, zeigen, dass sowohl Pacific Blue DMPE (A) als auch Atto647N-SM (B) in der l_a -Phase angereichert sind. (C) Der Overlay verdeutlicht die Kollokalisierung beider Fluorophore anhand der violetten Farbe. Maßstabsbalken: 10 μm .

Vermutlich ist im Falle des Atto647N-Sphingomyelins die große Fluoreszenzsonde an der Fettsäure des Moleküls (Kap. 3.1.2) für die bevorzugte Anreicherung in der

ungeordneten l_d -Phase verantwortlich. Daher wurde als nächstes ein fluoreszenzmarkiertes Sphingomyelin mit einer kleineren Fluoreszenzsonde untersucht.

Phasenverhalten des C11 TopFluor-Sphingomyelins

Zur Untersuchung von Mikrodomänen in lebenden Zellen und in artifiziellen Membranen werden oft Sphingomyelin-Moleküle untersucht, bei denen der Fluorophor über eine C5- bzw. C6-Fettsäurekette angekoppelt ist.^[142] Wang *et al.* zeigten, dass diese kurzen Fettsäureketten das Phasenverhalten des Sphingomyelins verändern und zur Anreicherung in der l_d -Phase führen.^[143] Daher wurde in dieser Arbeit das Bodipy-markierte C11 TopFluor-Sphingomyelin (C11 TopFluor-SM, Kap. 3.1.2) mit einer längeren C11-Fettsäurekette untersucht.

GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) wurden mit 0,2 mol% C11 TopFluor-SM dotiert und ebenfalls mit 0,1 mol% TexasRed DHPE versetzt, da letzteres selektiv in der l_d -Phase von phasenseparierten Lipidmischungen angereichert ist (Kap. 3.1.2). Die Fluoreszenzaufnahmen beider Fluorophore zeigen, dass C11 TopFluor-SM in den gleichen Membranbereichen angereichert ist, wie TexasRed DHPE (Abb. 4-3) und somit ebenfalls die l_d -Phase visualisiert.

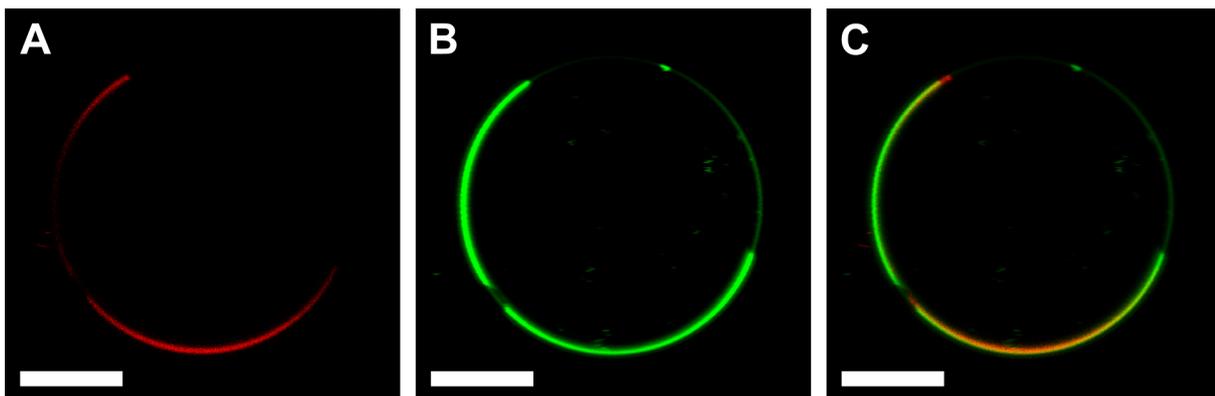


Abb. 4-3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20), dotiert mit 0,2 mol% C11 TopFluor-SM und 0,1 mol% TexasRed DHPE zeigen, dass sich der C11 TopFluor-SM (B) in der gleichen Phase anreichert, wie TexasRed DHPE (A) und somit die l_d -Phase markiert. (C) Dies wird verdeutlicht anhand der Kolo-kalisation beider Fluorophore im Overlay. Maßstabsbalken: 10 μm .

Anhand der Fluoreszenzaufnahmen wird deutlich, dass auch dieses fluoreszenzmarkierte Sphingomyelin mit einer kleineren Fluoreszenzsonde nicht geeignet ist, die l_o -Phase der untersuchten Lipidmischung zu markieren. Vermutlich stört die angehängte Fluoreszenzsonde sowohl im Falle des C11 TopFluor-SM als auch im Falle des Atto647N-Sphingomyelins die Einlagerung der Moleküle in die l_o -Phase, sodass diese daraus ausgeschlossen werden.

Fluoreszierende Galactocerebroside zur Markierung der l_o -Phase

Nachdem alle untersuchten Fluorophore, die zur Visualisierung der l_o -Phase eingesetzt wurden, nicht das erwünschte Phasenverhalten zeigten, wurde ein Lipid untersucht, bei dem das delokalisierte π -System, das zur Fluoreszenzanregung benötigt wird, nicht durch Anhängen einer zusätzlichen Fluoreszenzsonde realisiert wurde. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe PD Dr. D. B. Werz wurde das fluoreszenzmarkierte Polyen-Lipid C_{25}^* -Phenyl-Galactocerebroside (C_{25}^* -Ph-GalCer, Abb. 3-14) synthetisiert. Für die fluoreszierenden Eigenschaften sind fünf konjugierte, (*E*)-konfigurierte Doppelbindungen am Ende einer C_{25} -Fettsäurekette verantwortlich. Diese stehen in Konjugation mit dem π -System eines Phenylrings, der sowohl aus synthetischen Gründen als auch zur Erweiterung des π -Systems eingeführt wurde. Da alle konjugierten Doppelbindungen (*E*)-konfiguriert sind (Kap. 3.1.2) und sich wie der Phenylring am Ende der Fettsäurekette befinden, wurde vermutet, dass sich das C_{25}^* -Ph-GalCer wie ein gesättigtes Glykosphingolipid verhält. Die Geometrie ist ähnlich der einer gesättigten Fettsäure und Modifikationen an diesen Positionen haben einen geringeren Einfluss auf die umgebenden Lipide.^[144]

Da vermutet wurde, dass das Polyen-Lipid aufgrund der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen im UV-Bereich angeregt werden müsste, wurden zunächst dessen Absorptions- und Emissionseigenschaften in der Umgebung einer Membran untersucht. Dazu wurden die Absorptions- und Emissionsspektren kleiner, unilamellarer Vesikel (engl. *Small Unilamellar Vesicles*, SUVs) der Zusammensetzung DOPC/Sphin-

gomyelin/Cholesterin/C₂₅*-Ph-GalCer (40:30:20:10) mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers aufgenommen (Abb. 4-4).

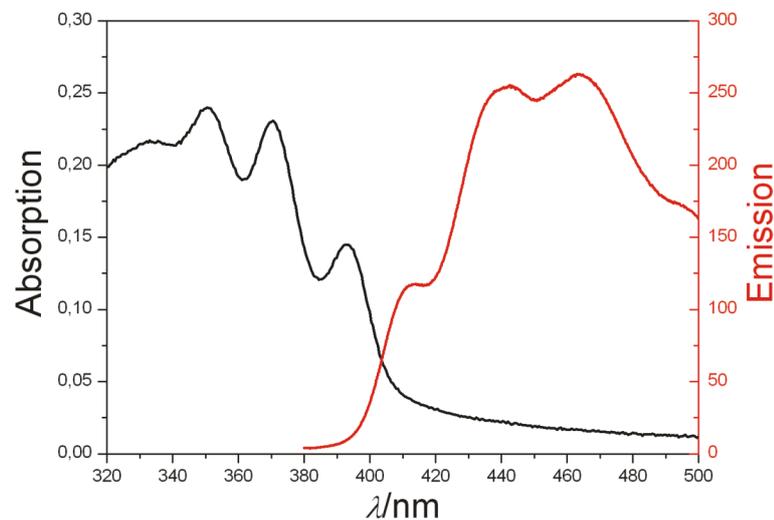


Abb. 4-4: Absorptions- (schwarze Linie) und Emissionsspektrum (rote Linie) von SUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₅*-Ph-GalCer (40:30:20:10) in PBS-Puffer bei 20 °C. Das Emissionsspektrum wurde bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 370$ nm aufgenommen.

Die Spektren zeigen Absorptionsmaxima des fluoreszenzmarkierten Galactocerebroside bei $\lambda_{\text{ex}} = 350, 370$ und 393 nm. Die Emissionsmaxima liegen bei $\lambda_{\text{em}} = 412, 442$ und 463 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm).

Zur Bestimmung des Phasenverhaltens wurde C₂₅*-Ph-GalCer in GUVs inkorporiert. GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₅*-Ph-GalCer (40:30:20:10) wurden zusätzlich mit 0,1 mol% Bodipy-PC dotiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Anreicherung des Bodipy-PC in der *l_d*-Phase (Abb. 4-5 A, D). Aus den Aufnahmen der C₂₅*-Ph-GalCer-Fluoreszenz wird ersichtlich, dass das fluoreszierende Galactocerebroside selektiv in der *l_o*-Phase der Riesenvesikel angereichert ist (Abb. 4-5 B, E). Dies wird verdeutlicht durch die Overlays der gezeigten Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 4-5 C und F.

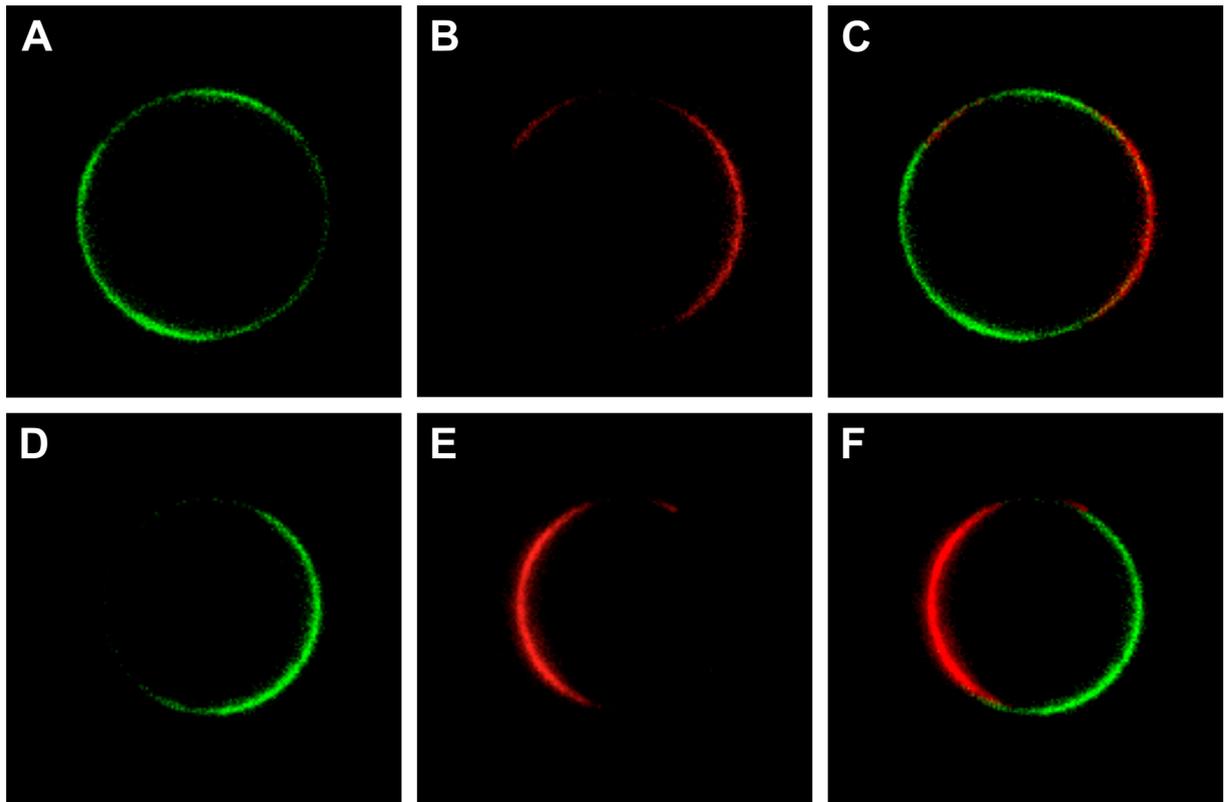


Abb. 4-5: (A, D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₅*-Ph-GalCer (40:30:20:10), dotiert mit 0,1 mol% Bodipy-PC zeigen die Anreicherung des Bodipy-PC in der *l_α*-Phase der Vesikel. (B, E) Das fluoreszenzmarkierte C₂₅*-Ph-GalCer reichert sich in der *l_o*-Phase an. (C, F) Die Overlays der beiden Aufnahmen zeigen, dass die Fluorophore nicht kolokalisiert sind.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das fluoreszierende Galactocerebroside zur Visualisierung geordneter Lipidphasen geeignet ist. Es könnte außerdem als Basis für weitere Experimente zur Lokalisation von Glykosphingolipiden, wie Gb₃ und G_{M1}, eingesetzt werden, ohne die Bindung eines fluoreszenzmarkierten Toxins, wie Shiga Toxin oder Cholera Toxin, oder eines Antikörpers an diese Rezeptormoleküle ausnutzen zu müssen. Deren Lokalisation vor der Proteinbindung ist bisher noch unbekannt. Es wird aber vermutet, dass sich diese Glykosphingolipide bevorzugt in der *l_o*-Phase anreichern.^[39, 67, 86, 90, 91, 145, 146] Zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeit standen keine weiteren Polyen-Lipide zur Verfügung, sodass im weiteren Verlauf der Arbeit mit den Fluorophoren Bodipy-PC und Perylen gearbeitet wurde.

4.2 Phasenseparierte Lipidmischungen in porenüberspannenden Membranen als Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran

Um den Einfluss eines unterliegenden Netzwerks auf die laterale Organisation von Membranen zu untersuchen, wurden porenüberspannende Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) präpariert. Dazu wurden GUVs dieser Lipidmischung, dotiert mit den Fluorophoren Bodipy-PC und Perylen, auf porösen Substraten gespreitet. Nach der Charakterisierung wurden die Lipidreorganisationsprozesse, ausgelöst durch die Bindung von bakteriellen Toxinen, wie Shiga und Cholera Toxin, an diese Membranen, sowie der Einfluss der Substratfunktionalisierung untersucht.

4.2.1 Untersuchung der Eigenschaften von phasenseparierten, porenüberspannenden Membranen

Nach dem Spreiten von GUVs auf CPEO3-funktionalisierten porösen Substraten (Kap. 3.2.3) werden porenüberspannende Membranen erhalten, in denen die Cholesteryleinheit des CPEO3 in die untere Lipidmonoschicht der gebildeten Membranen integriert wird (Kap. 1.2.3). Dabei wird das gleiche Verhalten der Fluorophore beobachtet, wie in den zuvor betrachteten GUVs. Der Fluorophor Perylen zeigt keine Präferenz für eine bestimmte Phase, sondern ist homogen in der porenüberspannenden Membran verteilt und dient damit dem Nachweis einer porenüberspannenden Membran. Erfolgreich ausgebildete porenüberspannende Membranen werden als blaue Bereiche in der Perylen-Fluoreszenz sichtbar, während nicht-überspannte Poren dunkel erscheinen (Abb. 4-6 A). Der Fluorophor Bodipy-PC ist in porenüberspannenden Membranen selektiv in der *l_d*-Phase angereichert und wird sichtbar als hellgrüne Bereiche in der Bodipy-PC-Fluoreszenz (Abb. 4-6 B). Die erwarteten Sphingomyelin- und Cholesterin-angereicherten *l_o*-Domänen erscheinen in diesen Fluoreszenzaufnahmen als dunkle Bereiche (Abb. 4-6 B). Zur Erhöhung der Aufnahmequalität der Fluoreszenzaufnahmen wurden jeweils 16 horizontale Scanlinien aufgezeichnet und gemittelt.

Über die Situation auf den Stegbereichen kann keine Aussage über das Phasenverhalten der Membranen getroffen werden, da in diesen Bereichen die Fluoreszenz durch die darunterliegende Goldschicht gelöscht wird. Die Stegbereiche erscheinen nur hell aufgrund des reflektierten Laserlichts, das für die Anregung genutzt wird.

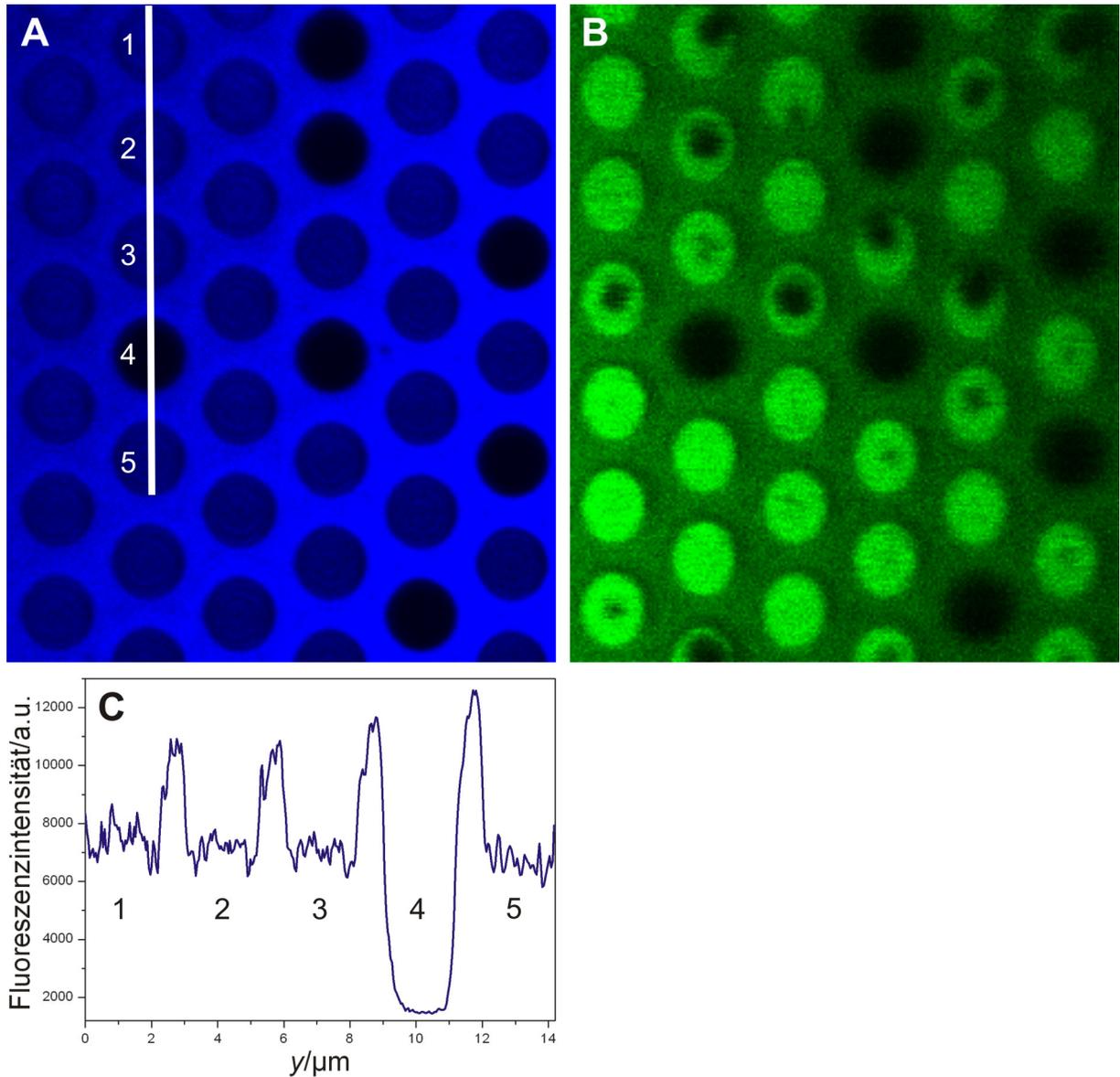


Abb. 4-6: Porenüberspannende Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf einem porösen, CPEO3-funktionalisiertem Substrat. (A) Die Perylen-Fluoreszenz zeigt, ob Poren mit einer Membran überspannt sind (blau) oder nicht (schwarz). (B) Die Bodipy-PC-Fluoreszenz zeigt die Phasenseparation der Lipidmischung in *l_a*- (grün) und *l_o*-Phase (schwarze Domänen) an. (C) Ein gemittelttes Profil aus 7 Linien der Perylen-Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie in A verdeutlicht die Unterscheidung anhand der Perylen-Fluoreszenz, ob Poren mit einer Membran überspannt sind oder nicht. Porendurchmesser: 2,0 μm.

Die quantitative Analyse von 16 783 porenüberspannenden Membranen ergab, dass 36 % der porenüberspannenden Bereiche der Membranen nur die l_d -Phase zeigten, während 12 % nur aus l_o -Phase bestanden. Die verbleibenden 52 % der porenüberspannenden Membranbereiche enthielten sowohl l_d - als auch l_o -Phase.

Abhängigkeit der Domänengröße von der Porengröße des Substrats

Die l_o -Domänen in GUVs kondensieren aufgrund der Minimierung der Linienenergie zu größeren Domänen, sodass oft Vesikel beobachtet werden, die zur Hälfte aus l_d - und zur Hälfte aus l_o -Phase bestehen.^[31, 90] In der zellulären Plasmamembran werden geordnete Nanodomänen und ein Einfluss des unterliegenden Netzwerk auf die Domänenkondensation vermutet. Daher stellte sich die Frage, ob das unterliegende poröse Substrat einen Einfluss auf die Domänengröße in porenüberspannenden Membranen hat.

Dazu wurden phasenseparierte GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf porösen Substraten mit Durchmessern von 2,0, 1,2, 0,8 und 0,45 μm gespreitet. Exemplarische Aufnahmen der Bodipy-PC-Fluoreszenz sind in Abb. 4-7 dargestellt. Alle porenüberspannenden Membranen sind phasensepariert in l_d - und l_o -Phase, erkennbar an den dunklen l_o -Domänen innerhalb der Membranen. Ein erster Vergleich der vier Fluoreszenzaufnahmen zeigt, dass die Größe der l_o -Domänen abhängig von der Porengröße des unterliegenden Substrats ist.

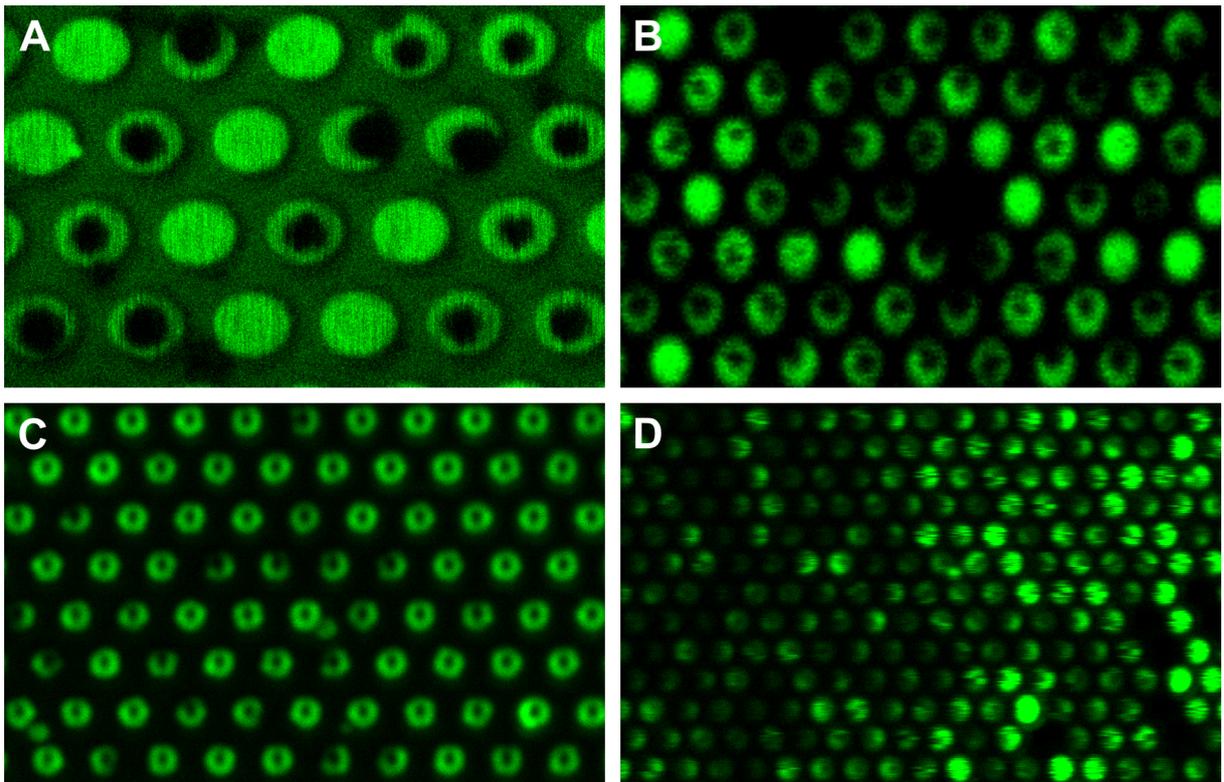


Abb. 4-7: Aufnahmen der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), wie sie typischerweise nach dem Spreiten von GUVs auf porösen Substraten erhalten wurden. Porendurchmesser: (A) 2,0 μm , (B) 1,2 μm , (C) 0,8 μm und (D) 0,45 μm . Alle vier Fluoreszenzaufnahmen wurden auf die gleiche Bildgröße von 16,9 $\mu\text{m} \times 10,8 \mu\text{m}$ zugeschnitten und zur Erhöhung der Bildqualität wurde jeweils der Durchschnitt von 16 horizontalen Scanlinien aufgezeichnet.

Um dies zu quantifizieren, wurden mit Hilfe der Software *ImageJ* der Flächenanteil der l_o -Domänen an der Gesamtfläche des porenüberspannenden Membranbereichs und die absolute Fläche der l_o -Domänen bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamtfläche der porenüberspannenden Membran wurde eine kreisförmige Region der Probe (engl. *Region Of Interest*, ROI) um die gesamte porenüberspannende Membran gelegt (Abb. 4-8 A). Als nächstes wurde ein weiterer ROI mit Hilfe der „Polygon-Auswahl“ um die l_o -Domäne gelegt und die eingeschlossene Fläche ausgelesen (Abb. 4-8 B).

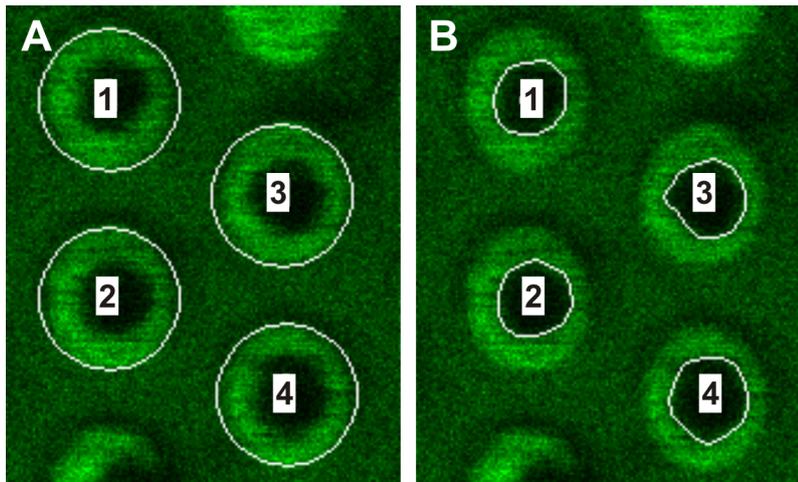


Abb. 4-8: Quantitative Bildanalyse mit Hilfe des Programms *ImageJ*. (A) Zunächst wurde in der Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz mittels einer kreisförmigen Region der Probe (ROI) die Gesamtfläche der porenüberspannenden Membran bestimmt. (B) Anschließend wurde mit Hilfe der „Polygon-Auswahl“ ein ROI um die schwarze l_o -Domäne innerhalb der porenüberspannenden Membran gelegt und die eingeschlossene Fläche ausgelesen. Porendurchmesser: 2,0 μm .

Die Ergebnisse der Größenanalyse der l_o -Domänen in Tab. 4-1 zeigen, dass der Anteil der l_o -Phase in porenüberspannenden Membranen unabhängig von dem unterliegenden Substrat ist. Dieser ist bei allen betrachteten Porendurchmessern zwischen 20 und 29 %. Die absolute Fläche der l_o -Domänen zeigt hingegen eine Abhängigkeit vom Porendurchmesser. So wurden in porenüberspannenden Membranen mit einem Porendurchmesser von 1,2 μm vierfach kleinere l_o -Domänen beobachtet, verglichen mit Porendurchmessern von 2,0 μm (Tab. 4-1). Porenüberspannende Membranen mit einem Porendurchmesser von 0,8 μm zeigen erneut dreifach kleinere l_o -Domänen im Vergleich zu Porendurchmessern von 1,2 μm (Tab. 4-1).

Tab. 4-1: Ergebnisse der Analyse des l_o -Domänenanteils und der l_o -Domänenfläche in Abhängigkeit vom Porendurchmesser des jeweiligen Substrates.

Porendurchmesser/ μm	Fläche der Pore/ μm^2	l_o -Domänenfläche/ μm^2	l_o -Domänenanteil/%	n
2,0	3,14	$0,92 \pm 0,69$	29 ± 22	865
1,2	1,13	$0,25 \pm 0,17$	22 ± 15	936
0,8	0,50	$0,10 \pm 0,05$	20 ± 11	975

Die Analyse der porenüberspannenden Membranen in Substraten mit einem Porendurchmesser von $0,45\ \mu\text{m}$ war nicht möglich, da diese l_o -Domänen nicht mehr sauber aufgelöst werden konnten. Dies mag an der hohen lateralen Mobilität der l_o -Domänen liegen. Die einzelnen Scanlinien wurden während der Aufnahme jeweils 16-fach gemittelt, sodass im Falle dieser sehr kleinen l_o -Domänen nur dunkle, horizontale Streifen abgebildet wurden. Unter der Annahme eines ähnlichen Anteils der l_o -Domäne an der gesamten porenüberspannenden Membran im Bereich von 20 bis 30 %, ergibt die Umrechnung auf eine kreisförmige l_o -Domäne einen Durchmesser zwischen $0,20$ und $0,24\ \mu\text{m}$. Dieser liegt an der Auflösungsgrenze des konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Kap. 3.3.2) und kleinere l_o -Domänen können somit nicht aufgelöst werden.

Zur Verdeutlichung wurden die Ergebnisse der Analyse der l_o -Domänenfläche in Abhängigkeit vom Porendurchmesser des jeweiligen Substrats aus Tab. 4-1 graphisch in Abb. 4-9 dargestellt.

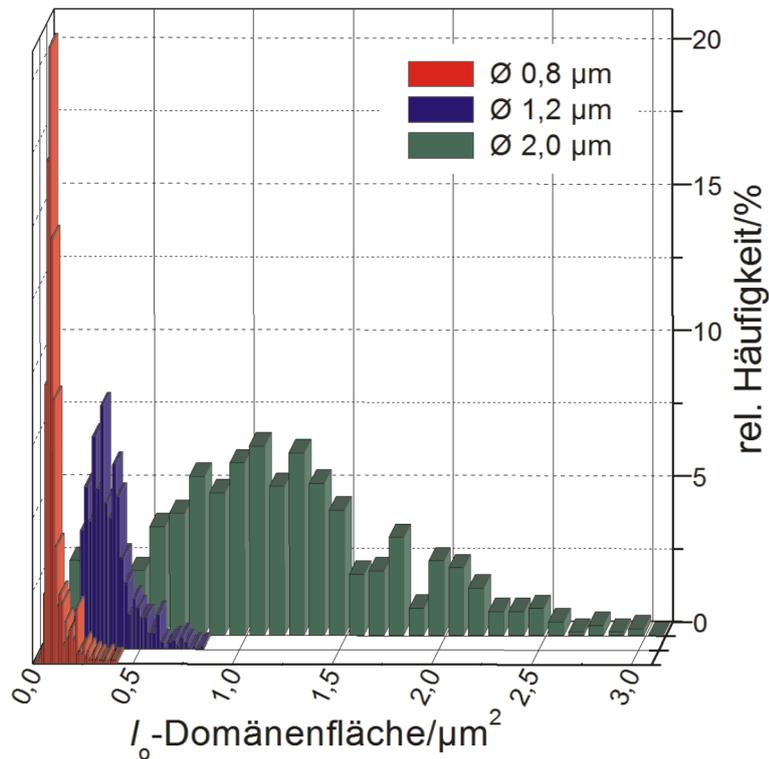


Abb. 4-9: Verteilung der absoluten l_o -Domänenfläche in porenüberspannenden Membranen auf Substraten mit Porendurchmessern von 2,0 μm (Fläche = 3,14 μm^2 , $n = 865$, grüne Balken), 1,2 μm (Fläche = 1,13 μm^2 , $n = 936$, blaue Balken) und 0,8 μm (Fläche = 0,50 μm^2 , $n = 975$, rote Balken). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die porenüberspannenden Membranen, die keine l_o -Phase zeigten, in allen Histogrammen nicht dargestellt.

4.2.2 Laterale Mobilität der Lipide und der l_o -Domänen

Die bisher gezeigten Fluoreszenzaufnahmen wurden zur Erhöhung der Aufnahmequalität gemittelt. Dazu wurde jeweils der Durchschnitt von 16 horizontalen Scanlinien aufgezeichnet. Bei der Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen fällt auf, dass die beobachteten l_o -Domänen keine perfekt runde Form aufweisen, sondern leichte horizontale Streifen zeigen (vgl. Abb. 4-6 B, Abb. 4-7 B, D). Dies deutet auf eine Bewegung dieser l_o -Domänen hin, die im Folgenden, nach der Betrachtung der lateralen Mobilität der Lipide, untersucht wurde.

Laterale Mobilität der Lipide

Zunächst wurde die laterale Mobilität der Lipide mit Hilfe von *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) Experimenten bestimmt. Dazu wurde der Bodipy-PC-Fluorophor in einem Bereich von sieben porenüberspannenden Membranen gebleicht (Abb. 4-10 A) und der darauffolgende Anstieg der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet (Abb. 4-10 B). Anschließend wurde eine Berechnung des Diffusionskoeffizienten und des immobilen Anteils, wie in Kap. 3.3.4 dargestellt, vorgenommen.

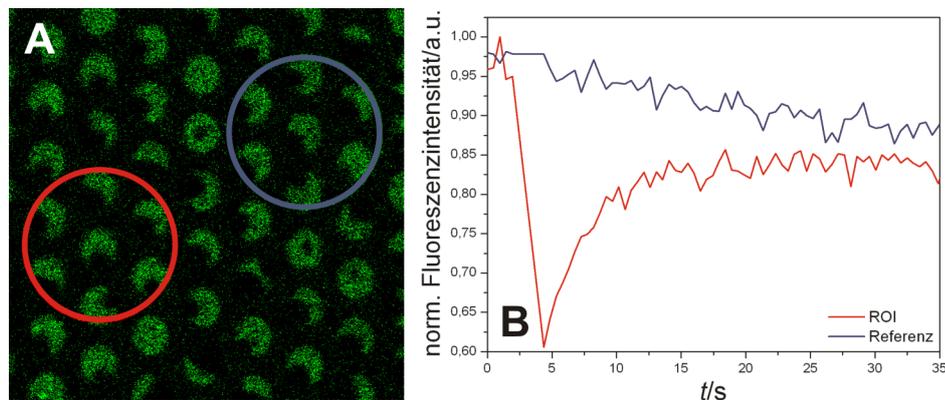


Abb. 4-10: Exemplarisches FRAP-Experiment an porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5). In einem Bereich von sieben membranüberspannten Poren wurde der Bodipy-PC-Fluorophor gebleicht (A, roter ROI) und der Anstieg der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet (B, rote Kurve). Als Referenz wurde ein weiterer Bereich von sieben membranüberspannten Poren gewählt (blauer ROI in A und blaue Kurve in B). Porendurchmesser: 2,0 μm .

Erhalten wurde ein mittlerer Diffusionskoeffizient von $D = (1,3 \pm 0,3) \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dieser setzt sich aus verschiedenen Anteilen zusammen und kann somit nur qualitativ betrachtet werden. Zum einen wurden sowohl freistehende Anteile der Membranen über den Poren als auch Membranen, gekoppelt an die Stegbereiche, gebleicht und zum anderen ist die Membran der Lipidzusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) phasensepariert in eine l_a - und eine l_o -Phase. Die Lipiddiffusion ist unterschiedlich in den beiden Phasen. Kahya *et al.* ermittelten in GUVs ähnlicher Zusammensetzung einen Diffusionskoeffizienten von $D = 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die l_o -Phase und $D = 5,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die l_a -Phase, wenn sie den Fluorophor DiI-C₁₈ bleichten.^[90] Der ermittelte Diffusionskoeffizient in porenüberspannenden Membran-

nen liegt somit zwischen den Literaturwerten und beschreibt die Lipiddiffusion in beiden Membranphasen.

Der immobile Anteil ist mit einem Wert von $F_i = (11 \pm 6) \%$ ($n = 14$) niedrig. Dies impliziert, dass sowohl die obere als auch die untere Lipidmonoschicht eine laterale Lipiddiffusion ermöglichen und eine unvollständige Belegung der Substratoberfläche mit CPEO3-Molekülen erhalten wurde. Würde man eine vollständige Belegung der Goldoberfläche mit CPEO3-Molekülen voraussetzen, die eine Diffusion in der unteren Lipidmonoschicht komplett verhindern würde, so würde ein Wert für den immobilen Anteil von 50 % erwartet werden. Allgemein wird aber ein Einfluss der CPEO3-Monoschicht auf die Lipiddiffusion vermutet, der dazu führt, dass die Diffusion in der oberen Lipidmonoschicht schneller sein sollte als in der unteren.

Laterale Mobilität der l_o -Domänen

In den Fluoreszenzaufnahmen von porenüberspannenden Membranen, die eine Phase-separation in l_o - und l_a -Phase zeigen, wird deutlich, dass sich ein Teil der l_o -Domänen bevorzugt am Rand und ein Teil der Domänen bevorzugt in der Mitte aufhält. Eine detaillierte Analyse der Position der l_o -Domänen ($n = 8\,663$) ergab, dass 75 % der detektierten l_o -Domänen an den Rändern der porenüberspannenden Membran lokalisiert sind und keine laterale Mobilität zeigen. Die restlichen 25 % der l_o -Domänen sind in der Mitte der porenüberspannenden Membran lokalisiert. Zeitliche Aufnahmen der Bodipy-PC-Fluoreszenz zeigen, dass sich die l_o -Domänen, die in der Mitte der porenüberspannenden Membran lokalisiert sind, lateral bewegen (Abb. 4-11).

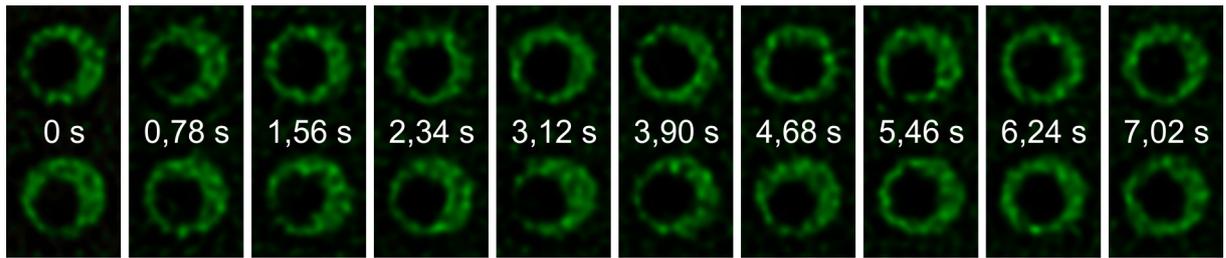


Abb. 4-11: Die Zeitserie der Bodipy-PC-Fluoreszenz von zwei porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) zeigt die laterale Beweglichkeit der schwarzen l_o -Domänen innerhalb der Membran. Zur Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit wurden die Scanlinien in dieser Aufnahme nicht gemittelt. Porendurchmesser: 2,0 μm .

Während dieser lateralen Bewegung änderte sich die Form und Größe der l_o -Domänen kontinuierlich, wie in Abb. 4-11 deutlich wird. Zur Quantifizierung dieser Beobachtung wurde mit Hilfe der Software *ImageJ* eine Bildanalyse analog zu Abb. 4-8 durchgeführt. Zusätzlich wurde neben der Bestimmung des Anteils der l_o -Phase an der gesamten porenüberspannenden Membran die Zirkularität C (Gl. 4-1) der l_o -Domänen ausgelesen. Sie gibt Auskunft über die Form der Domänen.

Die Zirkularität ist definiert als

$$C = \frac{4\pi \cdot A_D}{U^2}, \quad \text{Gl. 4-1}$$

dabei ist A_D die Fläche der l_o -Domäne und U der Domänenumfang. Eine l_o -Domäne, die eine Kreisform besitzt, würde eine Zirkularität von $C = 1$ ergeben.

Eine Betrachtung über kurze (bis 10 s) und längere Zeiträume (bis zu 1 h) zeigt, dass der Anteil der l_o -Phase an der gesamten porenüberspannenden Membran und die Zirkularität C schwanken. Dies ist exemplarisch an einer ausgewählten l_o -Domäne in einer porenüberspannenden Membran in Abb. 4-12 aufgezeigt.

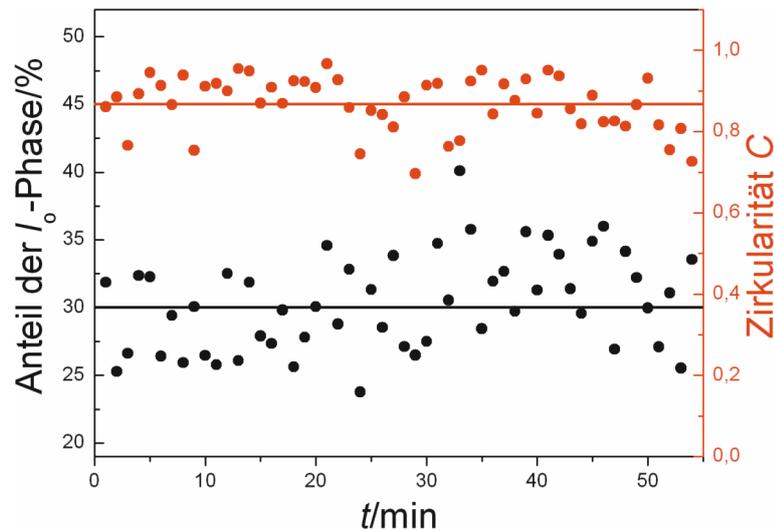


Abb. 4-12: Anteil der l_o -Phase (schwarze Punkte) und der Zirkularität C (rote Punkte) einer l_o -Domäne in einer porenüberspannenden Membran als Funktion der Zeit. Porengröße: $2,0 \mu\text{m}$.

Deutlich ist zu erkennen, dass der Anteil der l_o -Phase innerhalb der porenüberspannenden Membran um einen Wert von 30 % schwankt, aber keinem generellen Trend zu höheren oder niedrigeren Werten folgt. Dies deutet darauf hin, dass einzelne Lipide über die Porenstege diffundieren können und dabei temporär die l_o -Domänen vergrößern bzw. verkleinern. Gestützt wird dies durch die Betrachtung der Zirkularität. Während des Beobachtungszeitraumes ändert sich die Form der l_o -Domänen. Die Zirkularität schwankt dabei in einem Bereich von 0,8 und 1,0, was daraufhin deutet, dass die l_o -Domänen tendenziell eine runde Form bevorzugen.

4.2.3 Modulation der Phasenseparation in porenüberspannenden Membranen

Um nachzuweisen, dass es sich im Falle der dunklen Domänen, die in der Bodipy-PC-Fluoreszenz beobachtet werden, um l_o -Phasedomänen handelt, wurden zwei Methoden verwendet. Die Temperaturabhängigkeit des Phasenverhaltens der Lipidmischung und die Reduzierung des Cholesteringehaltes der porenüberspannenden Membranen durch Zugabe von Methyl- β -Cyclodextrin ($m\beta\text{CD}$) wurden untersucht.

Temperaturabhängigkeit der l_o -/ l_d -Phasenseparation

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der l_o -/ l_d -Phasenseparation wurde zunächst die Bodipy-PC-Fluoreszenz der porenüberspannenden Membranen, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5), bei einer Temperatur von 20 °C aufgenommen. Anschließend wurde die Probe auf eine Temperatur oberhalb der Übergangstemperatur von 37 °C^[29] erhitzt und die Bodipy-PC-Fluoreszenz aufgenommen. Danach wurde die auf 20 °C temperierte Probe erneut fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Nach dem Spreiten der GUVs sind bei 20 °C phasenseparierte, porenüberspannende Membranen in der Bodipy-PC-Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 4-13 A). Wird die Temperatur auf über 37 °C erhöht, so kann eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 4-13 B). Dies zeigt, dass die porenüberspannenden Membranen nicht mehr phasensepariert sind und sich komplett in der l_d -Phase befinden, in der sich der Bodipy-PC-Fluorophor homogen verteilen kann. Beim Abkühlen der Probe auf 20 °C zeigen sich in der l_d -Phase wieder l_o -Domänen (Abb. 4-13 C). Dieser Prozess verläuft vollkommen reversibel. Nach dem Abkühlen wurde die Phasenseparation komplett wiederhergestellt.

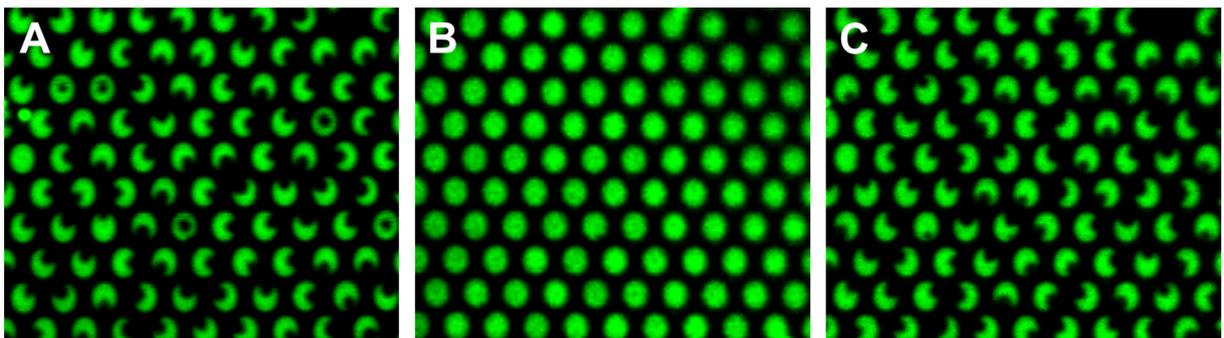


Abb. 4-13: (A) Die Bodipy-PC-Fluoreszenz-Aufnahme porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5) bei einer Temperatur von 20 °C zeigt eine Phasenseparation in l_o - und l_d -Phase. (B) Bei Erhöhung der Temperatur auf über 37 °C wird eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz beobachtet. (C) Nach Abkühlen der Probe auf 20 °C bildet sich die Phasenseparation in l_o - und l_d -Phase wieder aus. Porendurchmesser: 1,2 μ m.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die beobachtete Phasenseparation in porenüberspannenden Membranen mit der beobachteten Separation in l_d - und l_o -Phase von GUVs ähnlicher Zusammensetzung übereinstimmt.^[29, 30]

Modulation des Cholesteringehaltes porenüberspannender Membranen

Ein weiterer Beweis für die Phasenseparation in eine l_o - und eine l_d -Phase der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) wurde durch die Modulierung des Cholesteringehaltes der porenüberspannenden Membranen erbracht. Dazu wurde Methyl- β -Cyclodextrin ($m\beta$ CD, Kap. 3.1.3) eingesetzt, von dem bekannt ist, dass es in der Lage ist, Cholesterin selektiv aus Lipidmembranen zu extrahieren.^[117]

Zunächst musste die optimale $m\beta$ CD-Konzentration, die zur Cholesterin-Extraktion nötig ist, bestimmt werden. Ist die Konzentration zu hoch, so werden weitere Lipide aus der Membran entfernt und schließlich die Membran zerstört.^[117]

Es wurden zunächst Vorversuche an festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium durchgeführt. Diese wurden 30 min mit Konzentrationen von 1, 2 und 10 mM $m\beta$ CD bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer gespült (Kap. 3.2.5).

Vor Inkubation mit $m\beta$ CD ist die Phasenseparation der Lipidmischung anhand der TexasRed DHPE- und der Perylen-Fluoreszenz erkennbar: Der TexasRed DHPE-Fluorophor ist, analog zu Bodipy-PC, in der l_d -Phase angereichert (Abb. 4-14 A), während Perylen, im Gegensatz zu porenüberspannenden Membranen, in der l_o -Phase lokalisiert ist (Abb. 4-14 B). Diese bevorzugte Anreicherung des Perylens in der l_o -Phase festkörperunterstützter Membranen ähnlicher Zusammensetzung wurde auch in früheren Arbeiten beobachtet.^[67, 147] In dem Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen wird deutlich sichtbar, dass beide Fluorophore nicht kolokalisiert sind (Abb. 4-14 C). Hierbei wurden alle hellen Bereiche in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz rot und alle hellen Bereiche in der Perylen-Fluoreszenz grün eingefärbt.

Wären beide Fluorophore in derselben Phase lokalisiert, so würde die Überlagerung in der Farbe Gelb dargestellt.

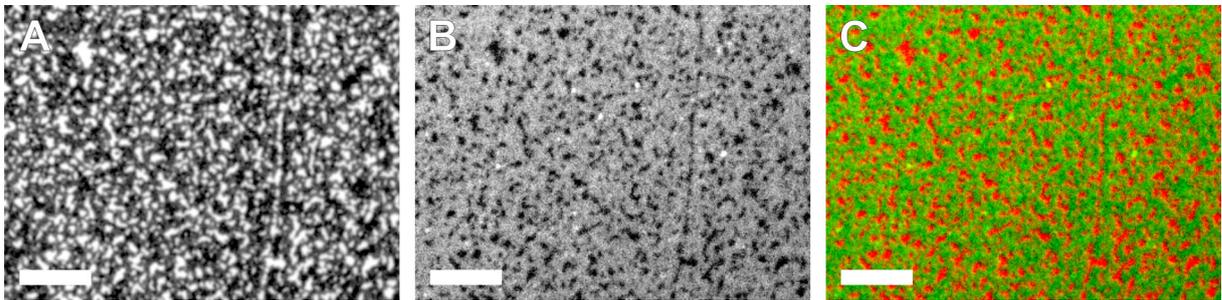


Abb. 4-14: (A) Die TexasRed DHPE-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium zeigt eine Phasenseparation in *l_a*- (helle Bereiche) und *l_o*-Phase (schwarze Bereiche). (B) Der Fluorophor Perylen ist in der *l_o*-Phase (helle Bereiche) angereichert. (C) Der Overlay der Falschfarbenbilder von A und B mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz verdeutlicht, dass beide Fluorophore nicht kolokalisiert sind. Maßstabsbalken: 10 μm .

Nach der Inkubation mit 1 mM *m* β CD ist noch eine leichte Phasenseparation in den Fluoreszenzaufnahmen der festkörperunterstützten Membran sichtbar. Texas-Red DHPE ist weiterhin in der *l_a*-Phase angereichert (Abb. 4-15 A) und Perylen in der *l_o*-Phase (Abb. 4-15 B). Der Overlay verdeutlicht, dass beide Fluorophore nicht kolokalisiert sind.

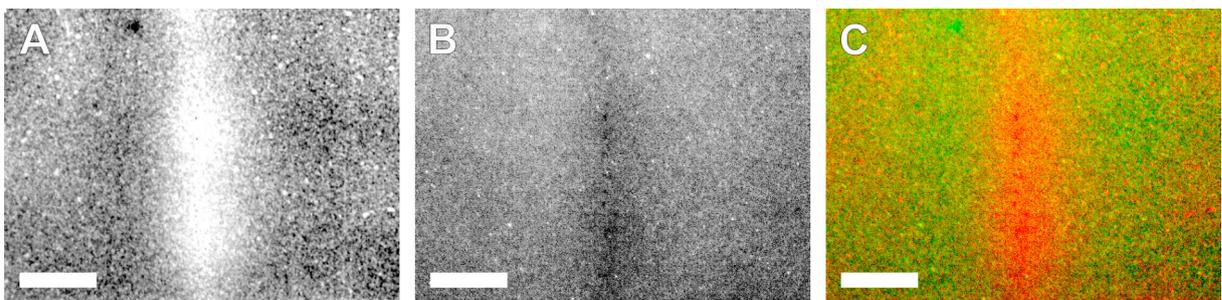


Abb. 4-15: Fluoreszenzaufnahmen von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), dotiert mit TexasRed DHPE (A) und Perylen (B), nach 30 min Inkubation mit 1 mM *m* β CD, sowie dem Overlay der Falschfarbenbilder (C) mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz. Maßstabsbalken: 20 μm .

Nach der Inkubation der festkörperunterstützten Membranen mit 2 mM *m* β CD sind die Fluorophore TexasRed DHPE (Abb. 4-16 A) und Perylen (Abb. 4-16 B) in der gleichen Phase angereichert. Vermutlich wurde mittels *m* β CD soviel Cholesterin aus der Membran extrahiert, dass die Lipidmischung nur noch eine *l_d*-Phase ausbildet, in der

die eingesetzten Fluorophore homogen verteilt sind. Der Overlay verdeutlicht dies, da bei der Überlagerung der rot gefärbten TexasRed DHPE-Fluoreszenz und der grün eingefärbten Perylen-Fluoreszenz die Mischfarbe Gelb entsteht (Abb. 4-16 C). Die schwarzen Bereiche, die in beiden Fluoreszenzkanälen sichtbar sind, wurden einer Defektbildung in der Membran zugeordnet.

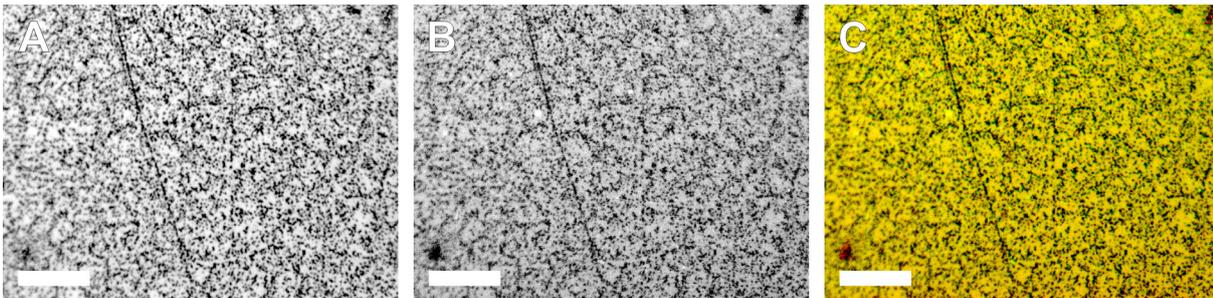


Abb. 4-16: Fluoreszenzaufnahmen von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), dotiert mit TexasRed DHPE (A) und Perylen (B), nach 30 min Inkubation mit 2 mM m β CD, sowie dem Overlay der Falschfarbenbilder (C) mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Die Inkubation der festkörperunterstützten Membranen mit 10 mM m β CD zeigt ebenfalls, dass die Fluorophore TexasRed DHPE (Abb. 4-17 A) und Perylen (Abb. 4-17 B) in der gleichen Phase angereichert sind, die der l_d -Phase zugeordnet wird. Zusätzlich fallen in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz runde dunkle Stellen auf, die Membrandefekten zugeordnet werden können. Vermutlich wurde in diesem Falle nicht nur Cholesterin, sondern auch weitere Lipide aus der Membran durch die Inkubation mit m β CD extrahiert, sodass Defekte entstehen können. Die Mitte dieser Defekte erscheinen in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz in einem mittleren Grau und in der Aufnahme der Perylen-Fluoreszenz (Abb. 4-17 B) als helle Bereiche, die im Overlay der beiden Fluoreszenzkanäle als grüne Bereiche sichtbar werden (Abb. 4-17 C). Vermutlich lagert sich in der Mitte dieser Membrandefekte das extrahierte Lipidmaterial ab, das mit einer niedrigeren Intensität in beiden Fluoreszenzkanälen erscheint.

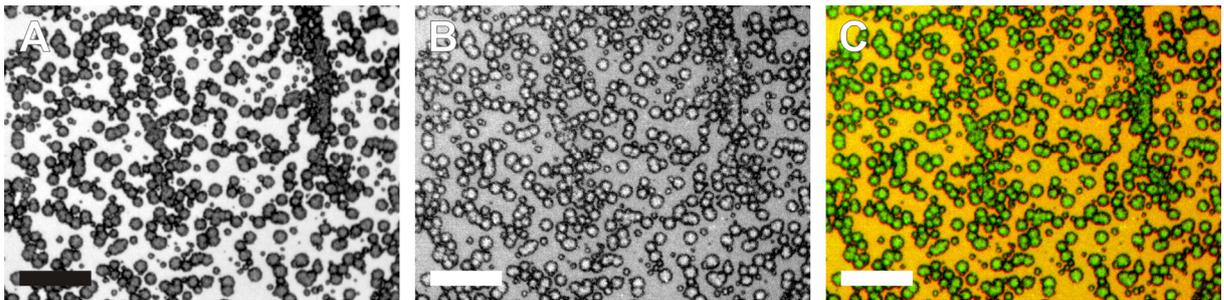


Abb. 4-17: Fluoreszenzaufnahmen von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), dotiert mit TexasRed DHPE (A) und Perylen (B), nach 30 min Inkubation mit 10 mM $m\beta$ CD, sowie dem Overlay der Falschfarbenergebnisse (C) mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Zur Unterstützung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen derselben festkörperunterstützten Membranen aufgezeichnet. Das Höhenbild der AFM-Aufnahme nach Inkubation mit 1 mM $m\beta$ CD zeigt zwei unterschiedliche Höhen, deren Höhenunterschied 0,8 bis 1,0 nm beträgt (Abb. 4-18 A). Die tiefer liegenden Bereiche, die dunkel erscheinen, werden der l_a -Phase zugeordnet, die mit DOPC angereichert ist. Die l_o -Phase ist angereichert mit Sphingomyelin und Cholesterin. Eine dichtere Packung der Lipide in dieser Phase führt zu einer höheren Membrandicke.^[148, 149] Daher erscheint die l_o -Phase als hellere Bereiche in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen. Vor der Inkubation mit $m\beta$ CD wurden ähnliche rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der festkörperunterstützten Membranen erhalten, daher wurde auf die Abbildung der Aufnahmen vor Cholesterinextraktion verzichtet. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Inkubation mit 1 mM $m\beta$ CD nicht zum Verschwinden der Phasenseparation führt.

Ab einer Konzentration von 2 mM $m\beta$ CD ist die Höhendifferenz zwischen l_o - und l_a -Phase nicht mehr erkennbar (Abb. 4-18 B) und es konnten nur noch glatte Membranen abgebildet werden. Die rasterkraftmikroskopische Aufnahme bestätigt somit die Erkenntnis, die bereits aus der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der festkörperunterstützten Membran nach Inkubation mit 2 mM $m\beta$ CD erhalten wurde (Abb. 4-16), dass nur noch eine Membranphase vorliegt. Diese wurde, aufgrund der Anreicherung des TexasRed DHPE-Fluorophors, der l_a -Phase zugeordnet.

Nach Inkubation der festkörperunterstützten Membran mit einer höheren Konzentration von 10 mM $m\beta$ CD (Abb. 4-18 C) wurde ebenfalls keine Phasenseparation in l_d - und l_o -Phase mehr beobachtet. Hier wird jedoch deutlich erkennbar, dass Defekte in der Membran entstehen. Das Höhenprofil entlang der blauen Linie in Abb. 4-18 C zeigt eine glatte Membran, die einen Höhenunterschied von 6 nm zum Substrat aufweist. Auf dem Substrat werden viele weiße Punkte beobachtet, die eine Höhe von 20 bis 40 nm aufweisen. Bei diesen könnte es sich um Lipidmaterial handeln, das nach der Cholesterinextraktion an das Substrat adsorbiert. Der Vergleich mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4-17 bestätigt somit die Bildung von Defekten und die Ablagerung von Lipidmaterial in diesen.

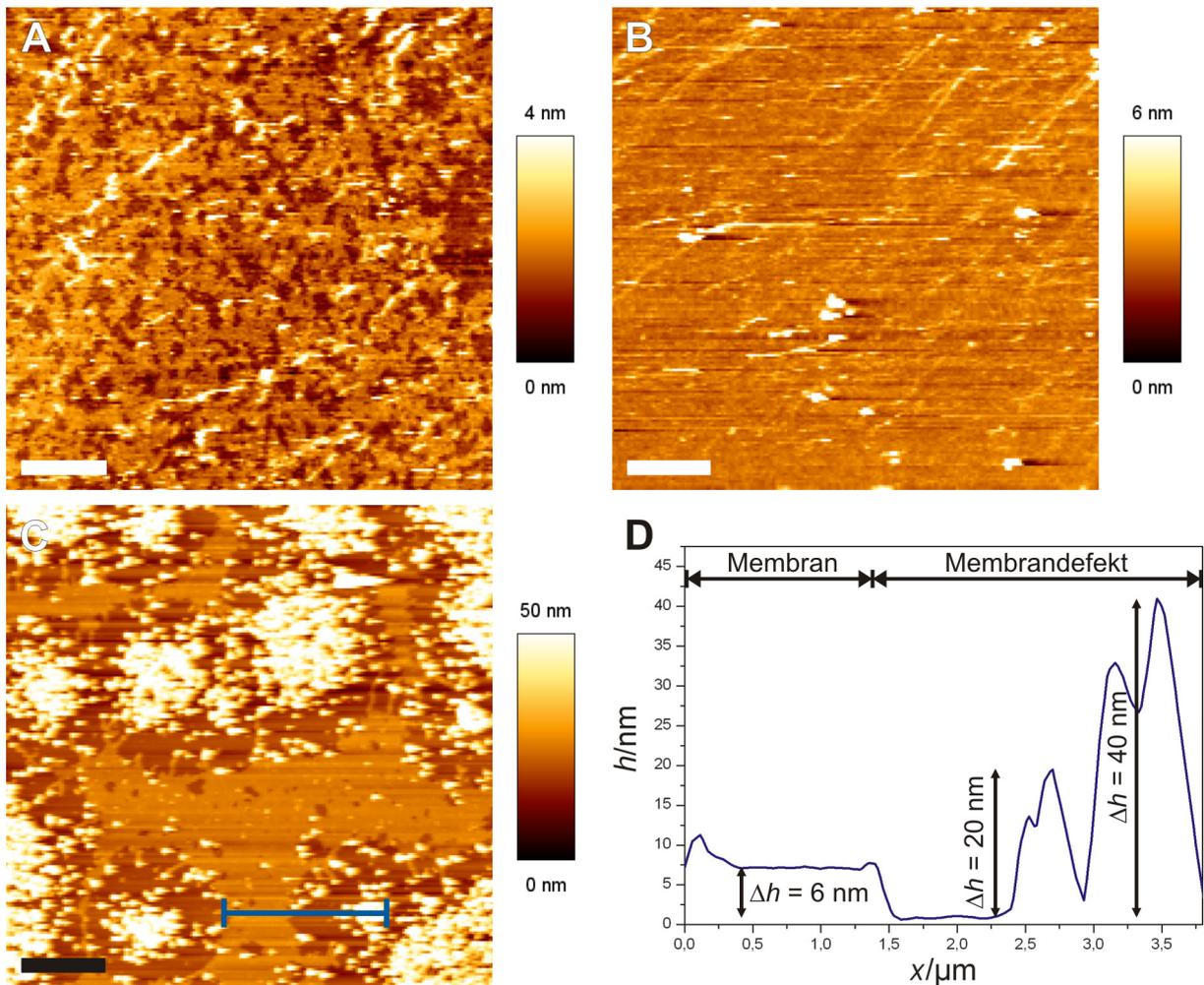


Abb. 4-18: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) zeigt nach Inkubation mit 1 mM mβCD eine Phasenseparation in *l_o*- (helle, höhere Bereiche) und *l_a*-Phase (dunkle, niedrigere Bereiche). (B) Nach Inkubation mit 2 mM mβCD ist keine Phasenseparation mehr sichtbar und eine glatte Membran wird abgebildet. Die weißen Strukturen entsprechen vermutlich schwach adsorbiertem Lipidmaterial wie Vesikeln oder Membranpatches. (C) Die Aufnahme nach der Inkubation mit 10 mM mβCD zeigt vermehrt weiße, höhere Bereiche, die einer Ablagerung von Lipidmaterial in den gebildeten Membrandefekten zugeordnet werden können. (D) Das Höhenprofil entlang der blauen Linie in C zeigt eine Höhendifferenz zwischen Membran und Substrat von 6 nm. In den Membrandefekten wird außerdem abgelagertes Lipidmaterial mit Höhen zwischen 20 und 40 nm beobachtet.

Aus den Ergebnissen der Inkubation von festkörperunterstützten Membranen mit mβCD wurde geschlossen, dass die mβCD-Konzentration nicht höher als 2 mM liegen sollte, damit porenüberspannende Membranen nicht zerstört werden, aber die Phasenseparation trotzdem aufgehoben wird.

Ein weiteres Vorexperiment zur Cholesterinextraktion wurde an freistehenden Membranen in GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), dotiert mit dem Fluorophor Bodipy-PC, durchgeführt, um bereits im Vorfeld zu untersuchen, wie sich die m β CD-Zugabe auf die freistehenden Membranbereiche über den Poren auswirkt.

Vor Inkubation mit m β CD ist in der 3D-Aufnahme der Bodipy-Fluoreszenz von GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) deutlich eine Phasenseparation in *l_a*- und *l_o*-Phase erkennbar (Abb. 4-19 A). Der Bodipy-PC-Fluorophor ist in der *l_a*-Phase angereichert, die somit als hellgrüne Bereiche in Abb. 4-19 A erscheint (rote Pfeile). Nach 15 min Inkubation mit 1 mM m β CD verschwindet die Phasenseparation und nur noch Vesikel mit homogener Bodipy-PC-Fluoreszenz werden beobachtet (Abb. 4-19 B). Nach 30 min Inkubation ist ebenfalls eine homogene Verteilung des Bodipy-PC-Fluorophors in der Membran der GUVs erkennbar (Abb. 4-19 C), die darauf hindeutet, dass diese eine *l_a*-Phase ausbilden.

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits eine Konzentration von 1 mM m β CD ausreicht, um so viel Cholesterin aus GUVs zu extrahieren, dass keine *l_o*-/*l_a*-Phasenseparation mehr auftritt und nur noch die *l_a*-Phase gebildet wird. Des Weiteren ist erkennbar, dass diese niedrige Konzentration auch ausreicht, um einen GUV so zu destabilisieren, dass dieser komplett reißt (vgl. größter GUV in Abb. 4-19 A, der in B und C nicht mehr sichtbar ist, weißer Pfeil).

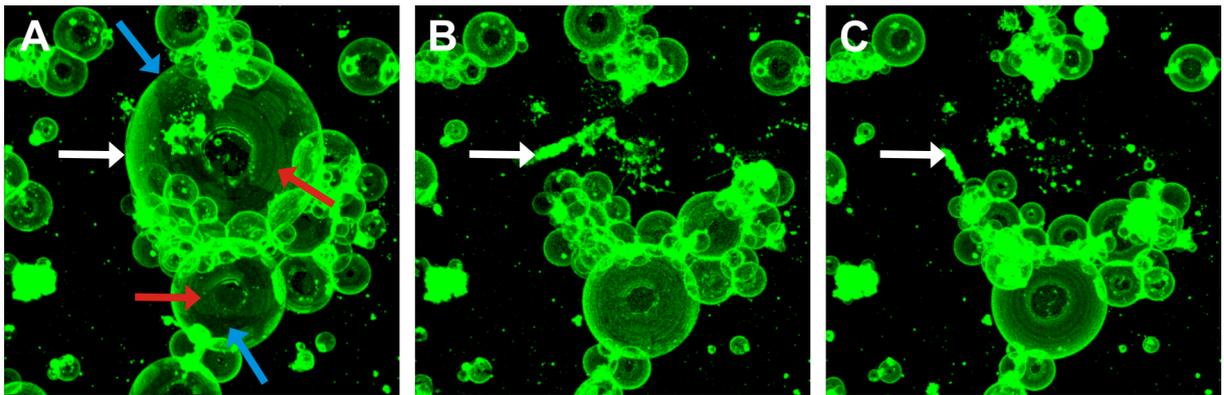


Abb. 4-19: (A) Die rekonstruierte 3D-Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz in GUVs (Aufsicht) der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) zeigt eine Phasenseparation in *l_o*- (dunkle Domänen, blaue Pfeile) und *l_a*-Phase (helle Domänen, rote Pfeile). (B) Nach 15 min Inkubation mit 1 mM mβCD ist keine Phasenseparation mehr in den Vesikeln erkennbar, da nur noch eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz in der Membran der GUVs beobachtet wird. Einige der Vesikel reißen nach mβCD-Zugabe (weißer Pfeil). (C) Auch nach 30 min Inkubation mit 1 mM mβCD ist nach der Cholesterin-Extraktion nur noch eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz in den Vesikeln sichtbar.

Die Erkenntnisse aus den Ergebnissen mit festkörperunterstützten und freistehenden Membranen in GUVs wurden nun auf porenüberspannende Membranen übertragen. In GUVs wurde gezeigt, dass bereits die Inkubation mit 1 mM mβCD ausreicht, um freistehende Membranen so zu destabilisieren, dass diese zerstört werden. Zunächst wurde daher mit einer niedrigeren Konzentration von 0,5 mM mβCD inkubiert.

Vor Inkubation von porenüberspannenden Membranen, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), ist eine Phasenseparation in der Bodipy-PC-Fluoreszenz erkennbar und dunkle *l_o*-Domänen sind sichtbar (Abb. 4-20 A). Nach 30-minütiger Inkubation mit 0,5 mM mβCD nimmt die Größe der *l_o*-Domänen in den porenüberspannenden Membranen ab (Abb. 4-20 B). Eine weitere Erhöhung der mβCD-Konzentration auf 1,0 mM führt zum Verschwinden der Phasenseparation und eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz ist erkennbar (Abb. 4-20 C). Dies zeigt, dass die resultierende porenüberspannende Membran nur noch in der *l_a*-Phase vorliegt. Die Intensitätsprofile in Abb. 4-20 D verdeutlichen die Modulation des Cholesteringehaltes in porenüberspannenden Membranen. Vor der Inkubation (blaue Kurve) sind zwei unterschiedliche Bodipy-PC-Intensitäten er-

kennbar. Nach der Inkubation mit $m\beta$ CD (rote und graue Kurve) ist im Bereich der membranüberspannten Poren nur noch eine Bodipy-PC-Intensität erkennbar.

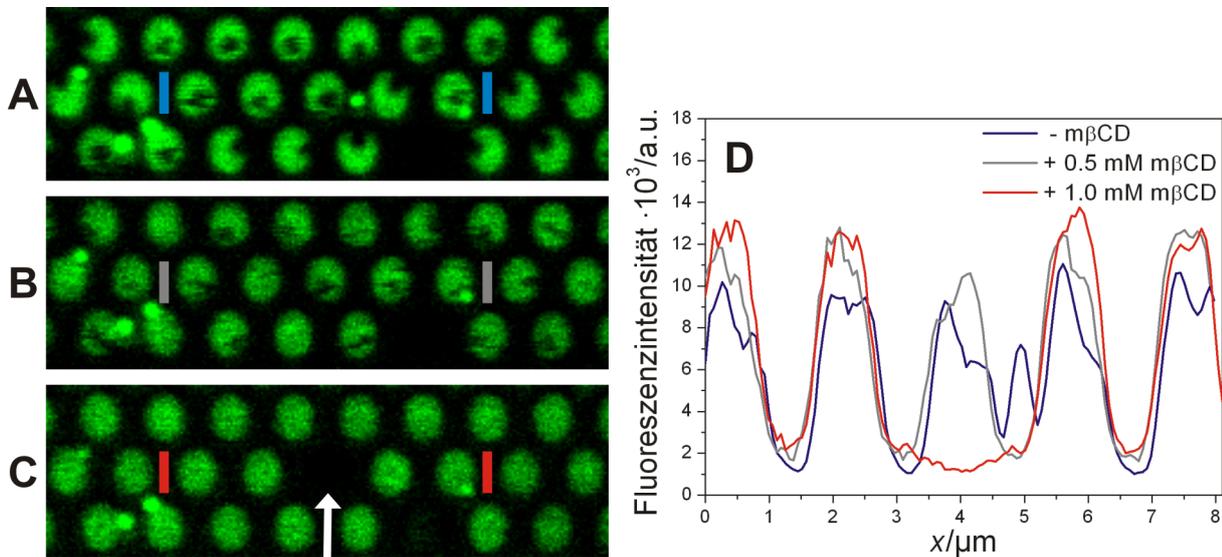


Abb. 4-20: (A) Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5) zeigt eine Phasenseparation in l_o - (schwarze Domänen) und l_d -Phase (grüne Bereiche). (B) Nach der Inkubation mit 0,5 mM $m\beta$ CD nimmt die Größe der l_o -Domänen ab, (C) bis keine Phasenseparation mehr nach Inkubation mit 1 mM $m\beta$ CD sichtbar ist. Die Destabilisierung kann zum Reißen der porenüberspannenden Membranen führen (weißer Pfeil). Die Intensitätsprofile von jeweils sieben gemittelten Scanlinien innerhalb der markierten Bereiche in A, B und C sind in D dargestellt. Porendurchmesser: 1,2 μ m.

In porenüberspannenden Membranen kann die Entfernung von Lipidmaterial zur Destabilisierung und damit zum Reißen der Membran über der Pore führen. Ein Beispiel dafür ist bei der Pore in der Mitte von Abb. 4-20 C durch den weißen Pfeil gekennzeichnet. Dies ist auch im Intensitätsprofil in Abb. 4-20 D (rote Kurve) sichtbar.

Durch selektive Cholesterinextraktion mittels $m\beta$ CD konnte gezeigt werden, dass die Reduzierung des Cholesteringehaltes zur Abnahme der l_o -Phase in porenüberspannenden Membranen führt, bis schließlich nur noch die l_d -Phase vorliegt und somit ein eindeutiger Nachweis für das Phasenverhalten dieser Membranen erbracht wurde.

4.2.4 Lipidreorganisation nach der Bindung von Shiga Toxin an porenüberspannende Membranen

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die laterale Organisation porenüberspannender Membranen durch das unterliegende Substrat beeinflusst wird. Sie können somit ein realistischeres Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran darstellen, die ebenfalls mit einem unterliegenden Netzwerk, dem Zytoskelett der Zelle, verknüpft ist.

Das Protein Shiga Toxin (STx) bindet über dessen B-Untereinheit (STxB) an Gb₃ in der Plasmamembran. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass STxB in der Lage ist, eine Reorganisation der Membranlipide in artifiziellen Membranen zu induzieren.^[67] Als Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran werden häufig festkörperunterstützte oder freistehende Membranen, die ein *l_d*-/*l_o*-Phasenverhalten zeigen, untersucht. Der Einfluss des Zytoskeletts auf die laterale Organisation der Membran bleibt in diesen aber unberücksichtigt.

Es stellte sich die Frage, wie sich die STxB-induzierten Reorganisationsprozesse nach der Bindung an Gb₃ auf ein Membransystem auswirken, das den Einfluss eines unterliegenden Netzwerks berücksichtigt. Dazu wurden mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die Bindung von STxB an porenüberspannende Membranen visualisiert und im weiteren Verlauf die proteininduzierten Lipidreorganisationsprozesse untersucht.

Bindung von Shiga Toxin an porenüberspannende Membranen

Zunächst wurden porenüberspannende Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) präpariert. Diese wurden anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit 60 nM STxB (bezogen auf das STxB-Pentamer) inkubiert, welches mit dem Fluorophor Cy3 markiert war (STxB-Cy3).

Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz zeigt eine Phasenseparation der porenüberspannenden Membranen in *l_d*- und *l_o*-Phase (Abb. 4-21 A). Dabei entsprechen die

dunklen Membrandomänen der l_o -Phase und die l_a -Phase wird den grünen Bereichen zugeordnet. In der roten Proteinfluoreszenz ist deutlich erkennbar, dass STxB-Cy3 in den Bereichen bindet, die in der Bodipy-PC-Fluoreszenz dunkel erscheinen (Abb. 4-21 B). Im Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 4-21 C) wird dies durch die Tatsache, dass die Farbe Gelb nicht erscheint, verdeutlicht. Somit konnte gezeigt werden, dass STxB ausschließlich an die l_o -Phase porenüberspannender Membranen bindet. Diese Beobachtung zeigt auch, dass sich das Glykosphingolipid Gb₃ nach der Bindung von STxB in der l_o -Phase der porenüberspannenden Membran befinden muss.

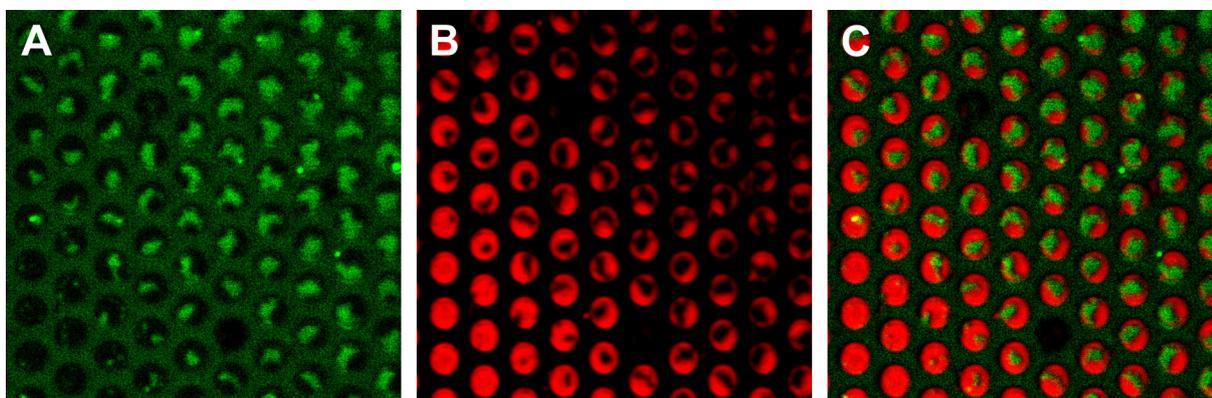


Abb. 4-21: (A) Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) zeigt eine Phasenseparation in l_o - (schwarze Domänen) und l_a -Phase (grüne Bereiche). (B) Nach Inkubation mit 60 nM Cy3-markiertem STxB für 1 h zeigt die Cy3-Fluoreszenz, dass das Protein an die l_o -Domänen gebunden hat. (C) Der Overlay verdeutlicht die Bindung von STxB-Cy3 an die l_o -Phase der porenüberspannenden Membranen. Porendurchmesser: 2,0 μm .

Lipidreorganisationsprozesse nach der Bindung von Shiga Toxin

In vorherigen Arbeiten wurde beobachtet, dass die Bindung von STxB an Gb₃ in festkörperunterstützten Membranen zu einer Reorganisation der Lipide führt. Es wurde gezeigt, dass das Protein in der Lage ist, Gb₃-Moleküle zu rekrutieren. Dies führte zur Induzierung von zusätzlicher l_o -Phase oder einer dichteren Packung der Lipide innerhalb der Membran.^[67] Römer *et al.* konnten in Untersuchungen an HeLa-Zellen zeigen, dass das zelluläre Zytoskelett ebenfalls die STxB-Bindung beeinflusst.^[100] Porenüberspannende Membranen können ein realistischeres Modellsystem für die

Plasmamembran darstellen, da diese den Einfluss eines unterliegenden Netzwerks berücksichtigen. Daher wurden die Lipidreorganisationsprozesse nach der STxB-Bindung im System der porenüberspannenden Membranen untersucht. Ein Vorteil dieses Systems ist, dass die hochgeordnete Struktur des porösen Substrats eine einfache Detektion jeder porenüberspannenden Membran ermöglicht. Dadurch können einzelne porenüberspannende Membranen vor und nach Proteinzugabe analysiert und einander zugeordnet werden.

Es wurden porenüberspannende Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), dotiert mit Bodipy-PC, präpariert und 1 h mit 60 nM STxB inkubiert. In den Aufnahmen der Bodipy-PC-Fluoreszenz vor (Abb. 4-22 A) und nach STxB-Zugabe (Abb. 4-22 B) wird deutlich, dass der Anteil der dunklen Domänen, die der *l_o*-Phase zugeordnet wurden, nach der Proteininkubation signifikant ansteigt. Zur quantitativen Analyse wurde dazu der Anteil der *l_o*-Phase einzelner porenüberspannender Membranen vor und nach Proteinzugabe mit Hilfe der Software *ImageJ* (Kap. 4.2.1) ermittelt.

Die Auftragung des Anteils der *l_o*-Phase vor STxB-Zugabe aus Abb. 4-22 A (schwarze Balken) und nach der Zugabe aus Abb. 4-22 B (rote Balken) verdeutlicht den beobachteten Anstieg der *l_o*-Phase nach Proteinbindung (Abb. 4-22 C). Dieser ist nur auf die Bindung von STxB zurückzuführen, da die Ergebnisse in Kap. 4.2.2 zeigten, dass der Anteil der *l_o*-Phase an der gesamten porenüberspannenden Membran über einen längeren Zeitraum konstant bleibt.

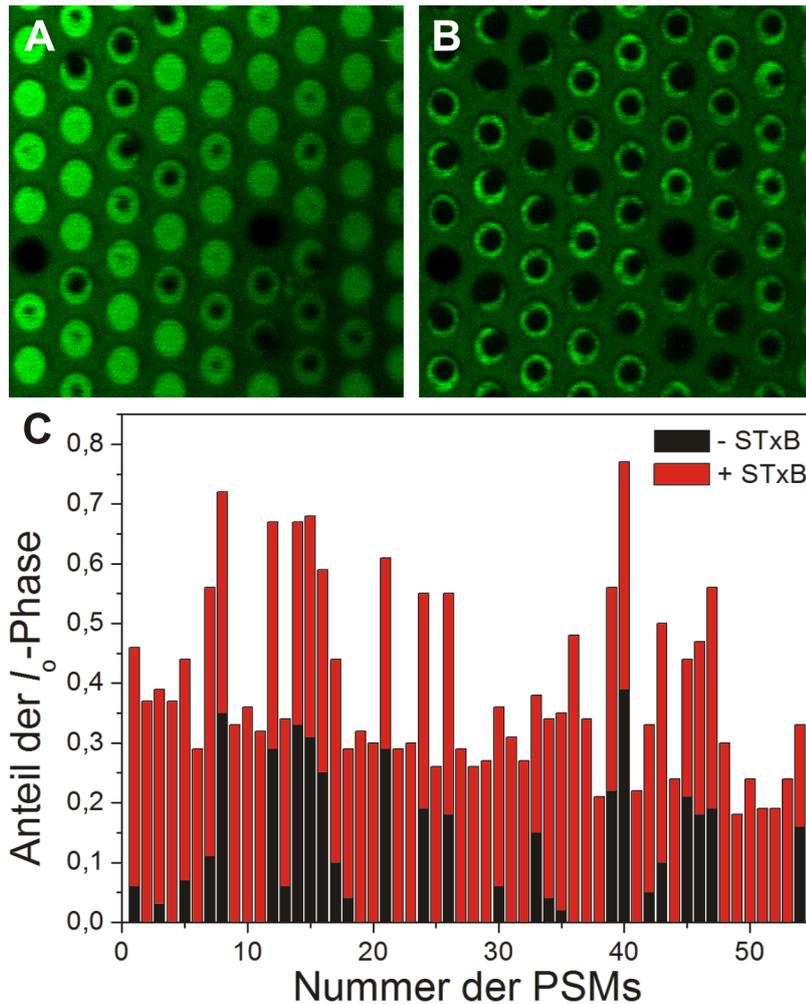


Abb. 4-22: (A) Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5) zeigt eine Phasenseparation in l_o - (schwarze Domänen) und l_a -Phase (grüne Bereiche in). (B) Nach Inkubation mit 60 nM STxB für 1 h zeigt die Bodipy-PC-Fluoreszenz, dass der Anteil der l_o -Phase steigt. Porendurchmesser: 2,0 μ m. (C) Die Auftragung des Anteils der l_o -Phase jeder porenüberspannenden Membran in A und B vor (schwarze Balken) und nach STxB-Zugabe (rote Balken) verdeutlicht den Anstieg der l_o -Phase nach STxB-Bindung.

Eine detaillierte Pixelanalyse, analog zu der in Kap. 4.2.1 beschriebenen Analyse von 305 porenüberspannenden Membranen, ergab, dass sich der Anteil der l_o -Phase nach der Bindung von STxB um $(30 \pm 15) \%$ erhöhte. Dieser Anstieg ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Protein Gb_3 -Moleküle unter sich anreichert und somit zu einer Reorganisation der Lipide in porenüberspannenden Membranen führt.

Nach der Anbindung von STxB wurden erneut FRAP-Experimente durchgeführt, um eine mögliche Änderung der lateralen Mobilität, induziert durch die STxB-Bindung,

zu untersuchen. Dazu wurde, analog zu den Experimenten vor STxB-Zugabe (Kap. 4.2.2), der Bodipy-PC-Fluorophor in einem Bereich von sieben porenüberspannenden Membranen gebleicht und der darauffolgende Anstieg der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet. Anschließend wurde eine Berechnung des Diffusionskoeffizienten und des immobilen Anteils, analog zu Kap. 3.3.4, vorgenommen. Im Vergleich zu den Ergebnissen der FRAP-Analyse vor der STxB-Bindung (Kap. 4.2.2) sinkt der Diffusionskoeffizient leicht auf $(0,8 \pm 0,2) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und der immobile Anteil bleibt bei $F_i = (13 \pm 5) \% (n = 7)$. Diese geringe Änderung des Diffusionskoeffizienten zeigt, dass sich die laterale Mobilität der Lipide nach der STxB-Bindung nur wenig ändert.

In festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) wurde eine Lipidverdichtung nach der Bindung von STxB beobachtet.^[67] In porenüberspannenden Membranen dagegen wurde eine Gb₃-Reorganisation vermutet, die zu einem Anstieg der *l_o*-Phase führt. Um zu untersuchen, ob in porenüberspannenden Membranen nicht nur ein Anstieg der *l_o*-Phase sondern auch eine dichtere Packung der Lipide auftritt, wurde der Einfluss der Cholesterin-Extraktion mittels *mβ*CD nach der STxB-Inkubation untersucht. Dessen Extraktion sollte bei einer dichteren Lipidpackung erschwert sein.

Porenüberspannende Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) wurden mit 60 nM STxB inkubiert und in der Bodipy-PC-Fluoreszenz wird deutlich, dass der Anteil der *l_o*-Phase nach STxB-Bindung ansteigt (Abb. 4-23 A, B). Wird nun der Cholesteringehalt der Membran durch die Zugabe von *mβ*CD reduziert, so resultiert dies in einem niedrigeren Anteil der *l_o*-Phase mit steigender *mβ*CD-Konzentration (Abb. 4-23 C, D). Im Gegensatz zu porenüberspannenden Membranen ohne angebundenes STxB (Kap. 4.2.3) bleiben auch bei einer Konzentration von 1,0 mM *mβ*CD dunkle *l_o*-Domänen erhalten (Abb. 4-23 D). Diese Beobachtung lässt auf eine Verdichtung der Lipide durch die Anbindung von STxB schließen oder eine Blockierung durch STxB, die dazu führt, dass Cholesterin durch *mβ*CD nicht komplett extrahiert werden kann.

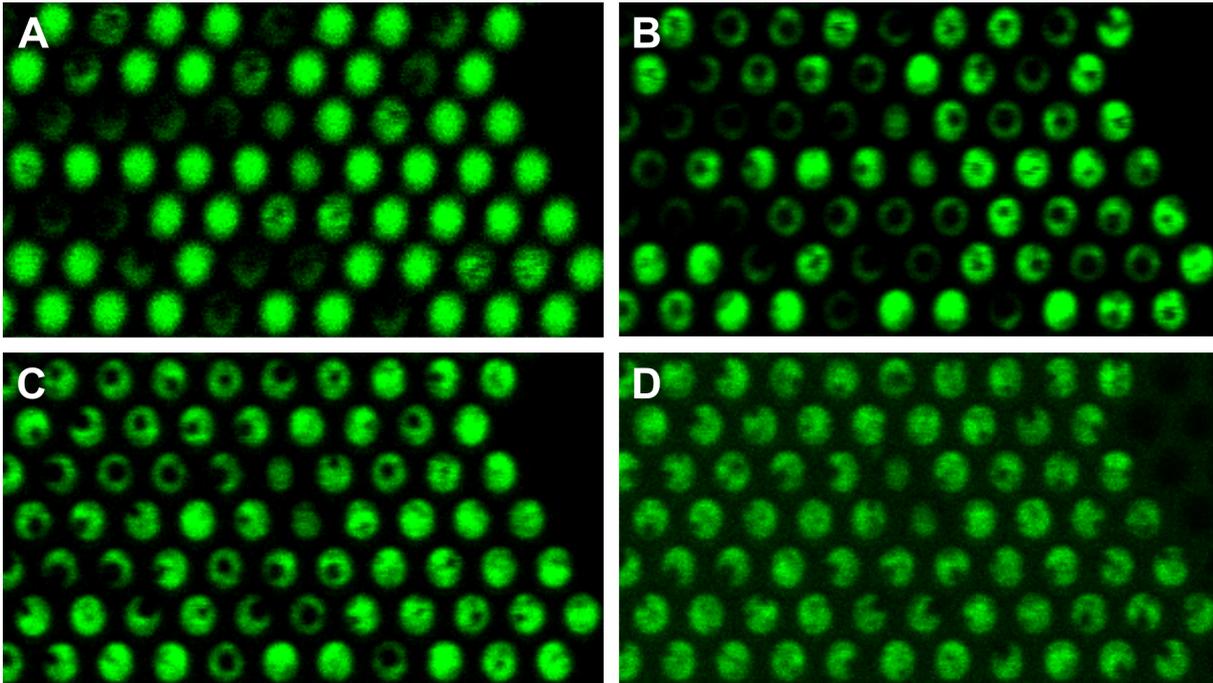


Abb. 4-23: (A) Die Aufnahme die Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) zeigt eine Phasenseparation in *l_o*-(schwarze Domänen) und *l_α*-Phase (grüne Bereiche). (B) Nach Inkubation mit 60 nM STxB für 1 h steigt der Anteil der *l_o*-Phase innerhalb der porenüberspannenden Membranen. Nach Inkubation mit 0,5 mM (C) und 1,0 mM mβCD (D) für jeweils 30 min sinkt der Anteil der *l_o*-Phase aufgrund der Cholesterinextraktion. (D) In der Bodipy-PC-Fluoreszenz sind nach Inkubation mit 1,0 mM mβCD weiterhin dunkle *l_o*-Domänen sichtbar. Porendurchmesser: 1,2 μm.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die STxB-Bindung durch die Cholesterin-Extraktion mittels mβCD gestört wird. Dazu wurden porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) mit 60 nM Cy3-markiertem STxB für 1 h inkubiert und anschließend 30 min mit 1,0 mM mβCD inkubiert. In der Bodipy-PC-Fluoreszenz sind weiterhin dunkle *l_o*-Domänen sichtbar (Abb. 4-24 A). Bei der Betrachtung der STxB-Cy3-Fluoreszenz wird deutlich, dass das Protein nach der Cholesterinextraktion weiterhin an porenüberspannende Membranen bindet (Abb. 4-24 B). Im Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen wird deutlich, dass STxB zwar weiterhin bevorzugt an die *l_o*-Phase bindet, aber dennoch teilweise an der *l_α*-Phase der Membranen lokalisiert ist (Abb. 4-24 C). Dies deutet darauf hin, dass in der Membran nach Cholesterinextraktion STxB-Gb₃-Komplexe vorhanden sind, die nicht in den geordneten *l_o*-Domänen angereichert sind.

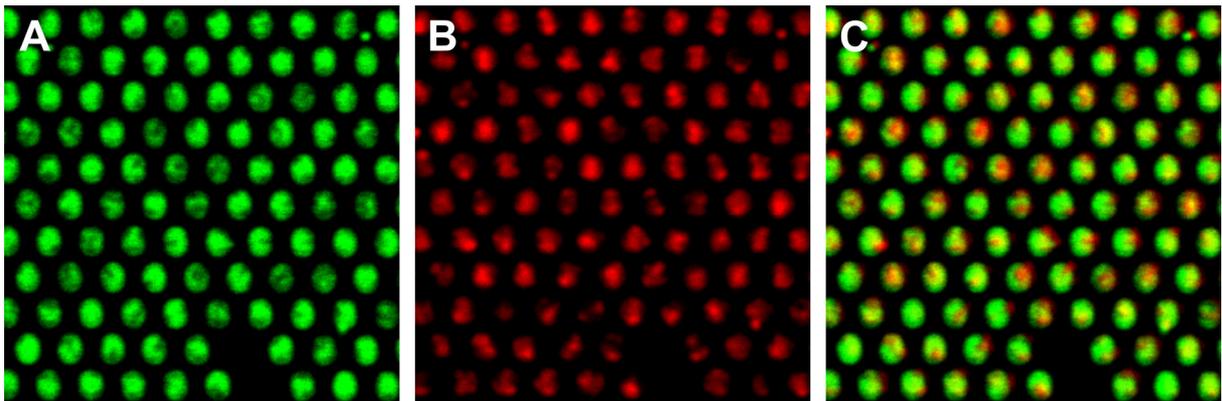


Abb. 4-24: (A) Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) nach Inkubation mit 60 nM Cy3-markiertem STxB für 1 h und anschließender Inkubation mit 1,0 mM m β CD für 30 min zeigt eine Phasenseparation in *l_o*- (schwarze Domänen) und *l_a*-Phase (grüne Bereiche). (B) In der Cy3-Fluoreszenz wird deutlich, dass das Protein weiterhin an die porenüberspannenden Membranen gebunden hat. (C) Der Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen zeigt, dass STxB-Cy3 bevorzugt an die *l_o*-Phase bindet, aber dennoch teilweise an der *l_a*-Phase der Membran lokalisiert ist. Porendurchmesser: 1,2 μ m.

Shiga Toxin-induzierte Phasenseparation nach Bindung an porenüberspannende Membranen

In Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche^[67] und in GUVs^[141] wurde bereits gezeigt, dass die Bindung von STxB an eine Membran, die vor Proteinzugabe nicht phasensepariert ist, eine Phasenseparation erzeugen kann. In diesen Untersuchungen wurden zwar Modellsysteme eingesetzt, die eine höhere Dynamik zeigen als festkörperunterstützte Membranen, aber der Einfluss eines unterliegenden Netzwerks, wie es an der zellulären Plasmamembran zu finden ist, wurde nicht berücksichtigt. Daher wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob STxB in der Lage ist, die Bildung von *l_o*-Phase in porenüberspannenden zu induzieren.

Zunächst wurden GUVs präpariert, die bei Raumtemperatur nicht phasensepariert sind. Dazu wurde die Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5) gewählt. Diese zeigte in Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche keine Phasenseparation in *l_o*- und *l_a*-Phase.^[67] Die Aufnahmen der Bodipy-PC (Abb. 4-25 A), der Perylen-Fluoreszenz (Abb. 4-25 B) und der Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 4-25 C) zeigen eine homogene Verteilung beider Flu-

orophore in der Lipiddoppelschicht der GUVs, wie aus dem ternären Phasendiagramm der eingesetzten Lipide zu erwarten war.^[30, 31]

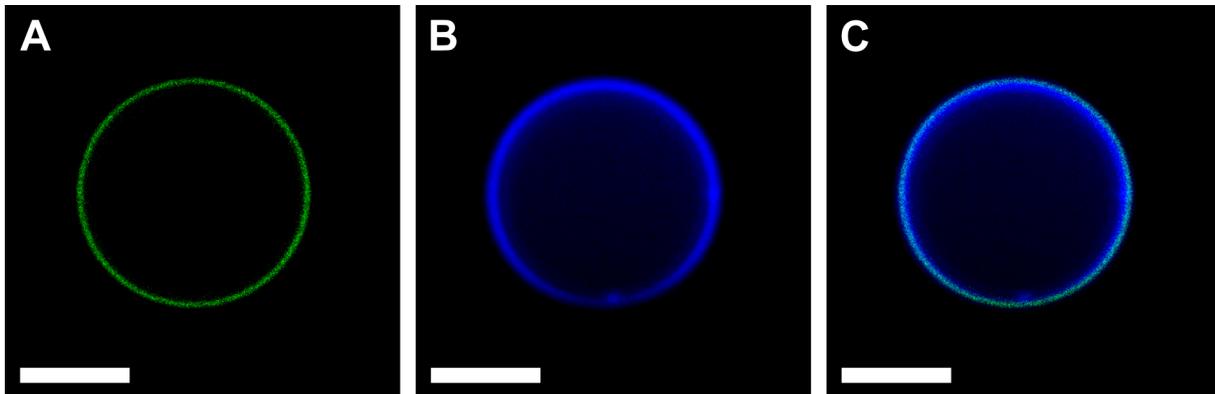


Abb. 4-25: (A) Der Äquatorialschnitt eines GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5) zeigt eine homogene Verteilung des Bodipy-PC in der Lipiddoppelschicht. (B) Die Perylen-Fluoreszenz zeigt ebenfalls eine homogene Verteilung des Fluorophors. (C) Der Overlay beider Fluorophore verdeutlicht deren Kolokalisation. Maßstabsbalken: 5 μm .

Nach dem Spreiten von GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5) auf porösen Substraten wurden porenüberspannende Membranen erhalten, die ebenfalls keine Phasenseparation zeigen, erkennbar in der Bodipy-PC-Fluoreszenz in Abb. 4-26 A. Nach der Inkubation mit 60 nM STxB für 1 h bei Raumtemperatur werden dunkle, unregelmäßig geformte *l_o*-Domänen sichtbar (Abb. 4-26 B).

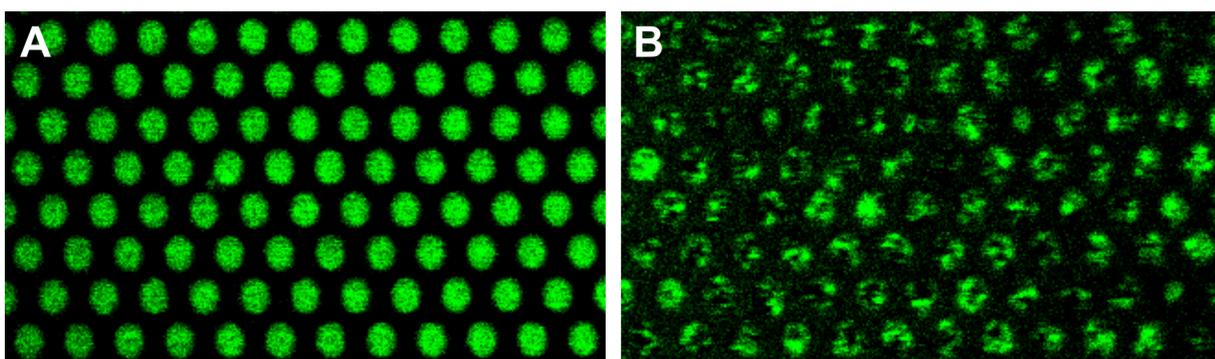


Abb. 4-26: (A) Die Aufnahme porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5) zeigt eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz. (B) Nach Inkubation mit 60 nM STxB für 1 h werden dunkle, unregelmäßig geformte *l_o*-Domänen sichtbar. Porendurchmesser: 1,2 μm .

Damit konnte gezeigt werden, dass STxB durch Bindung an Gb₃ in der Lage ist, eine Phasenseparation in porenüberspannenden Membranen zu induzieren. Diese induzierten *l_o*-Domänen sind viel kleiner und mobiler als die Domänen in der Lipidmischung, die vor STxB-Bindung bereits eine Phasenseparation zeigt (siehe Kap. 4.2.1). Dies ist auch erkennbar an der schlechteren Bildqualität der Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 4-26 B. So musste das Fluoreszenzsignal bereits während der Aufnahme verstärkt werden, was sich in einer schlechteren Auflösung und einer stärkeren Hintergrundfluoreszenz äußert.

4.2.5 Einfluss der Funktionalisierung poröser Substrate auf das Phasenverhalten porenüberspannender Membranen

Die bisherigen Experimente wurden auf porösen Substraten durchgeführt, die mit dem Thiolipid CPEO3 funktionalisiert wurden. Der Cholesterylanker des CPEO3 auf den Porenstegen wird dabei in die untere Lipidmonoschicht der porenüberspannenden Membranen integriert (Kap. 1.2.3). Die gewählte Lipidmischung ist phasensepariert und zeigt *l_o*-Domänen, die angereichert sind an Sphingomyelin und Cholesterin. Der Cholesterylanker des CPEO3, der zusätzlich in die Membran eingebracht wird, könnte die Phasenseparation der porenüberspannenden Membranen beeinflussen, indem Sphingomyelin und Cholesterin mit diesem interagieren. Daher wurden porenüberspannende Membranen untersucht, in denen keine Penetration der Membran durch die Substratfunktionalisierung erfolgt (Abb. 5-5). Es wurde das System der porenüberspannenden Membranen auf hydrophil-funktionalisierten porösen Substraten, die mit Mercaptoethanol funktionalisiert wurden, gewählt. Experimente mit dieser Art der Funktionalisierung haben gezeigt, dass Membranpatches auf porösen Substraten gebildet werden können, in denen die freistehenden Membranbereiche weniger vorgespannt sind als auf hydrophob-funktionalisierten Substraten. Außerdem sind die ausgebildeten porenüberspannenden Membranen weniger stark gekrümmt als im Falle der CPEO3-funktionalisierten Substrate, da die Membran auf

der Mercaptoethanol-Monoschicht aufliegt und keine Fixierung der unteren Lipidmonoschicht der Membran erfolgt.^[49]

Phasenseparation in porenüberspannenden Membranen auf hydrophil-funktionalisierten, porösen Substraten

Zur Herstellung porenüberspannender Membranen auf hydrophil-funktionalisierten, porösen Substraten, wurden diese mit Mercaptoethanol inkubiert (Kap. 3.2.3). Auf diese Substrate wurden GUVs der Lipidzusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) gespreitet, die mit den Fluorophoren Bodipy-PC und Perylen dotiert waren. Die porenüberspannenden Membranen zeigten ein analoges Verhalten zu den Membranen auf CPEO-funktionalisierten Substraten. In der Bodipy-PC-Fluoreszenz ist teilweise eine Phasenseparation in *l_o*- und *l_a*-Phase erkennbar (Abb. 4-27 A). Teilweise wurden auch Membranen beobachtet, die eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz zeigen und damit nicht-phasensepariert vorliegen (Abb. 4-27 B).

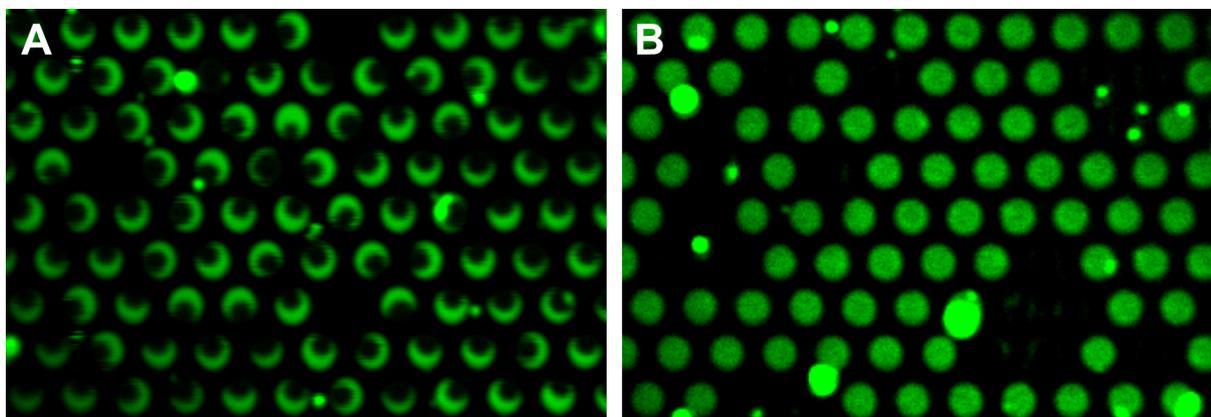


Abb. 4-27: (A) Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten zeigt teilweise eine Phasenseparation in *l_o*- (schwarze Domänen) und *l_a*-Phase (grüne Bereiche). (B) Außerdem wurden porenüberspannende Membranen mit homogener Bodipy-PC-Fluoreszenz beobachtet. Porendurchmesser: 1,2 μm .

Eine quantitative Analyse von 12 960 porenüberspannenden Membranen ergab, dass 33 % der erhaltenen Membranen nur die *l_a*-Phase zeigten, während 29 % nur aus *l_o*-Phase bestanden. Die verbleibenden 38 % der porenüberspannenden Membranen

enthielten sowohl l_d - als auch l_o -Phase. Von diesen phasenseparierten, porenüberspannenden Membranen waren 45 % der l_o -Domänen in der Mitte lokalisiert, während die restlichen 55 % am Rand lokalisiert waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht die Interaktion des CPEO3-Cholesterylankers mit den l_o -Domänen für die bevorzugte Lokalisierung der l_o -Domänen am Porenrand verantwortlich ist.

Die beobachteten l_o -Domänen zeigen eine laterale Mobilität. Im Unterschied zu den porenüberspannenden Membranen, die auf CPEO3-funktionalisierten Substraten generiert wurden, zeigen auch die l_o -Domänen, die am Rand lokalisiert sind, eine laterale Mobilität (Abb. 4-28).

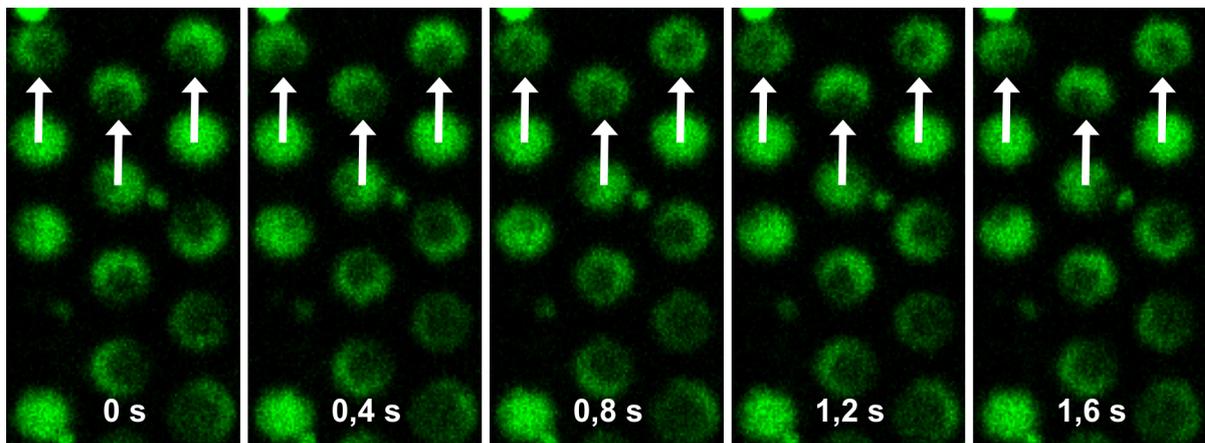


Abb. 4-28: Die Zeitserie der Bodipy-PC-Fluoreszenz von porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten zeigt die laterale Beweglichkeit der l_o -Domänen innerhalb der Membran. Auch l_o -Domänen, die am Porenrand lokalisiert sind, sind lateral mobil (weiße Pfeile). Porendurchmesser: 1,2 μm .

Die Analyse der Fluoreszenzaufnahmen von porenüberspannenden Membranen auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten gestaltete sich teilweise schwierig. Während des Spreitens von GUVs auf dem porösen Substrat wird viel Lipidmaterial an den Rändern der erhaltenen Membranpatches abgelagert (Abb. 4-29). Dies geschieht während des Reißens der GUVs und wurde bereits in früheren Arbeiten beobachtet.^[49] Das zusätzliche Lipidmaterial bildet teilweise auch kleinere Vesikel, die sich auf den Porenstegen ablagern und die Untersuchung der porenüberspannenden

Membranen stört (Abb. 4-29). Des Weiteren werden teilweise Bereiche auf den Porenstegen beobachtet, die vermutlich auf die Bildung von mehreren übereinandergestapelten Lipiddoppelschichten zurückzuführen sind. Auch dieses Phänomen wurde bereits in früheren Arbeiten beobachtet.^[49] In diesem Fall wird die Fluoreszenz des Bodipy-PC nicht mehr durch die unterliegende Goldschicht gelöscht und die Porenstege erscheinen hell.

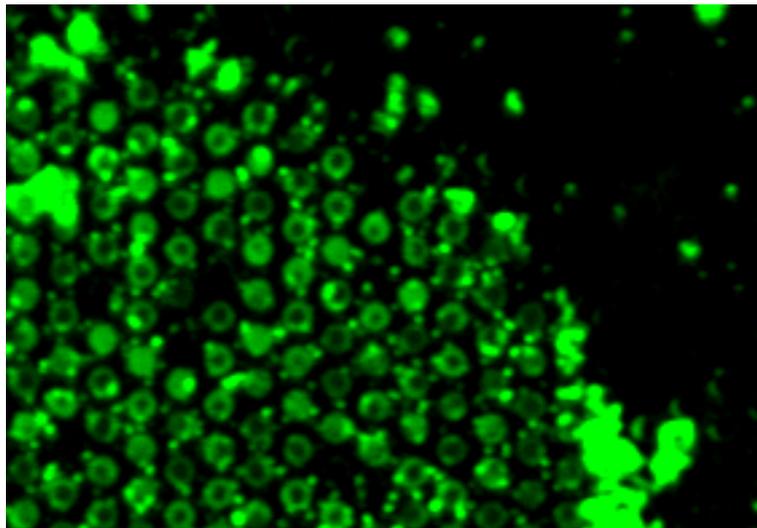


Abb. 4-29: Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten zeigt einen Membranpatch, der nach dem Spreiten eines GUV erhalten wurde. An den Rändern dieses Patches ist die Ablagerung von Lipidmaterial erkennbar, dessen Fluoreszenz nicht durch die Goldschicht gelöscht wurde. Auf den Porenstegen sind viele kleine Vesikel lokalisiert, die sich während des Reißens der GUVs bilden. Porendurchmesser: 1,2 μm .

An den Porenrändern wird außerdem oft eine verstärkte Fluoreszenzintensität des Bodipy-PC bei den Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten beobachtet, die in der Aufnahme als hellgrüne „Ringe“ um die jeweilige Pore sichtbar wird. Wenn während der Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz die Fokusebene der Membran falsch eingestellt ist, so entsteht der Eindruck, die Membran zeige eine Phasenseparation in l_o - und l_d -Phase oder nur l_o - bzw. nur l_d -Phase. In Abb. 4-30 ist dieser Fall dargestellt. Nahe der Substratebene zeigen alle porenüberspannenden Membranbereiche die beobachteten „Ringe“. Lediglich eine porenüberspannende Membran zeigt eine dunkle l_o -Domäne (weißer Pfeil in Abb. 4-30), die am Rand lokalisiert ist. Eine 0,8 μm höher aufgenommene Ebene verdeutlicht, dass mehrere porenüberspannende

Membranen eine dunklere Bodipy-PC-Intensität zeigen (blaue Pfeile in Abb. 4-30 B). Eine erneut 0,3 μm höher aufgenommene Ebene zeigt dieses Verhalten bei weiteren porenüberspannenden Membranen (blaue Pfeile in Abb. 4-30 C).

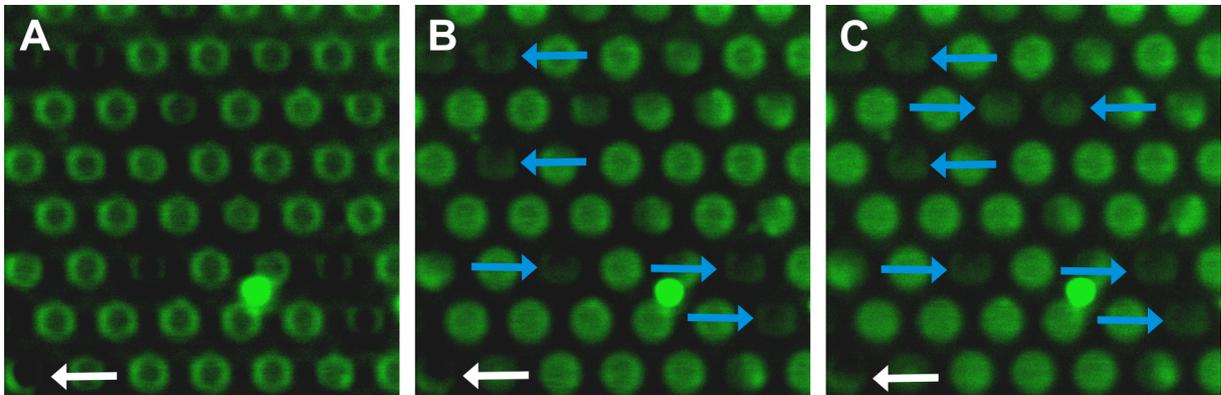


Abb. 4-30: (A) Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten zeigt nahe der Substratebene (erkennbar an der stärkeren Fluoreszenzintensität der Porenstege) eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenzintensität an den Porenrändern. Eine porenüberspannende Membran zeigt eine *l_o*-Domäne, lokalisiert an den Rand (weißer Pfeil). (B) Eine 0,8 μm höhere Ebene zeigt auch weiterhin diese „Ringbildung“ um den Porenrand und mehrere porenüberspannende Membranen weisen eine dunklere Bodipy-PC-Intensität auf (blaue Pfeile). (C) In der dritten Ebene, die wiederum 0,3 μm höher liegt, sind viele porenüberspannende Membranen mit homogener Bodipy-PC-Fluoreszenz erkennbar. Jedoch zeigen mehrere porenüberspannende Membranen eine dunklere Bodipy-PC-Intensität (blaue Pfeile). Porendurchmesser: 1,2 μm .

Anbindung von STxB an porenüberspannende Membranen auf hydrophil-funktionalisierten, porösen Substraten

Eine Bindung von STxB an porenüberspannende Membranen auf hydrophil-funktionalisierten Membranen konnte durch die Inkubation mit Cy3-markiertem Protein beobachtet werden (Abb. 4-31 B). Eine genaue Lokalisation des Proteins an der *l_o*- oder der *l_a*-Phase porenüberspannender Membranen, bestehend aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), gestaltete sich schwierig. Einerseits wurden Substrate mit schwacher Bodipy-PC-Fluoreszenz der porenüberspannenden Membranen nach STxB-Cy3-Inkubation erhalten (Abb. 4-31 A). Das fluoreszenzmarkierte Protein hat vollständig an diese Bereiche gebunden (Abb. 4-31 B), so dass davon ausgegangen wird, dass die freistehenden Membranbereiche komplett in

der l_o -Phase vorliegen. Andererseits wurden Substrate beobachtet, in denen die Cy3-Fluoreszenz eine inhomogene Verteilung des Proteins auf den porenüberspannenden Membranen zeigt (Abb. 4-31 E), die auf eine Phasenseparation der Membran hindeutet. Die Bodipy-PC-Fluoreszenz lässt aber die weiter oben geschilderten Probleme der verstärkten Fluoreszenzintensität an den Porenrändern erkennen (Abb. 4-31 D). Daher ist die Bestimmung des Phasenverhaltens der Membranen mittels der Bodipy-PC-Fluoreszenzaufnahmen nicht möglich.

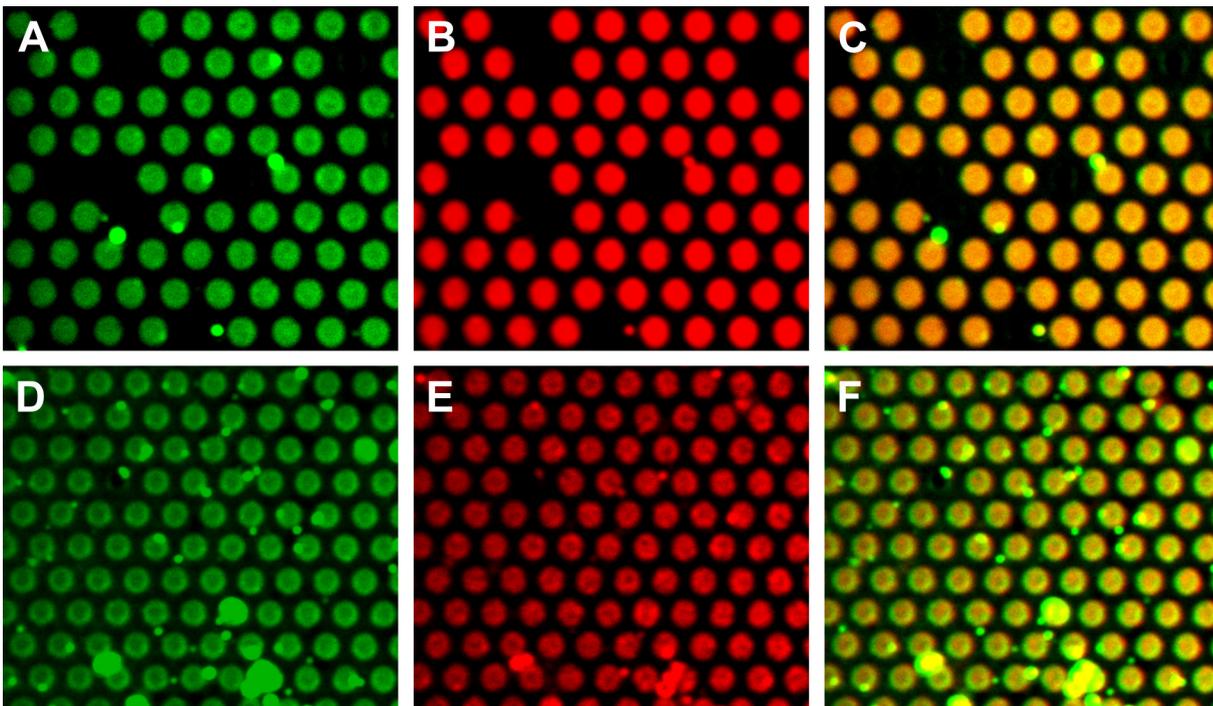


Abb. 4-31: (A) Die Aufnahme porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten zeigt eine schwache Bodipy-PC-Fluoreszenz. (B) Das fluoreszenzmarkierte STxB-Cy3 bindet vollständig an diese Membranen und der Overlay (C) bestätigt die Kollokalisierung beider Fluorophore. (E) In weiteren Experimenten wurde eine inhomogene STxB-Cy3-Fluoreszenz beobachtet. (D) Die zugehörige Bodipy-PC-Fluoreszenzaufnahme zeigt allerdings keine deutliche l_o / l_d -Phasenseparation, aber eine verstärkte Fluoreszenzintensität an den Porenrändern. (F) Der Overlay von D und E verdeutlicht beide Beobachtungen. Porendurchmesser: 1,2 μm .

4.2.6 Bindung von Cholera Toxin an G_{M1} in porenüberspannenden Membranen

Im folgenden Kapitel wurde der Einfluss eines weiteren bakteriellen Toxins auf das Phasenverhalten porenüberspannender Membranen untersucht. Das Cholera Toxin (CTx) ist dem Shiga Toxin strukturell sehr ähnlich.^[62] Dessen pentamere B-Untereinheit (CTxB) bindet an das Rezeptor-Gangliosid G_{M1} .^[83, 150] Im Unterschied zum System STxB-Gb₃ bindet jeweils nur ein CTxB-Monomer an ein Rezeptormolekül. Damit kann eine CTxB-Untereinheit an bis zu 5 G_{M1} -Moleküle binden, während eine STxB-Untereinheit an bis zu 15 Gb₃-Moleküle binden kann. Es stellte sich die Frage, ob die im System STxB-Gb₃ beobachtete Rekrutierung von Rezeptormolekülen, die zur Erhöhung der l_o -Phase porenüberspannender Membranen führte, ebenfalls im System CTxB- G_{M1} auftritt.

Einfluss des Gangliosids G_{M1} auf die Phasenseparation porenüberspannender Membranen

Zur Untersuchung der Bindung der Cholera Toxin B-Untereinheit (CTxB) an porenüberspannende Membranen wurde das Rezeptor-Gangliosid G_{M1} mit einem Anteil von 1 mol% in die Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) eingebracht. Die Konzentration des Rezeptorlipids G_{M1} wurde bewusst niedriger gewählt als in den Experimenten zur Bindung von STxB an Gb₃. Untersuchungen von Yuan *et al.* zur konzentrationsabhängigen Verteilung von G_{M1} in artifiziellen Membranen zeigten, dass die Inkorporation von mehr als 1 mol% G_{M1} dazu führt, dass G_{M1} -reiche Domänen innerhalb der l_d -Phase beobachtet werden.

Zunächst wurden GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1), dotiert mit den Fluorophoren Bodipy-PC und Perylen, präpariert. Die Inkorporation des G_{M1} führte zu einem starken Abweichen des Phasenverhaltens dieser Vesikel im Vergleich zu der Gb₃-enthaltenden Lipidmischung (vgl. Kap. 4.1.1). Letzteres beeinflusste das beobachtete l_o -/ l_d -Phasenverhalten der Lipidmischung nicht, wie bereits durch Safouane *et al.* bestätigt wurde.^[141]

Die Inkorporation von 1 mol% G_{M1} führte zur Bildung sehr heterogener GUV-Populationen. 31 % der Vesikel ($n = 289$) zeigten keine Phasenseparation in der

Bodipy-PC- und der Perylen-Fluoreszenz (Abb. 4-32 A, B) und im Overlay der beiden Aufnahmen ist eine Kolokalisation der Fluorophore sichtbar (Abb. 4-32 C). In 69 % der Vesikel ($n = 289$) markierte der Fluorophor Bodipy-PC die l_d -Phase (Abb. 4-32 D) und der Fluorophor Perylen war in der l_o -Phase angereichert (Abb. 4-32 E). Im Overlay der beiden Aufnahmen wird sichtbar, dass sich die beiden Fluorophore nicht in der gleichen Phase befinden (Abb. 4-32 F).

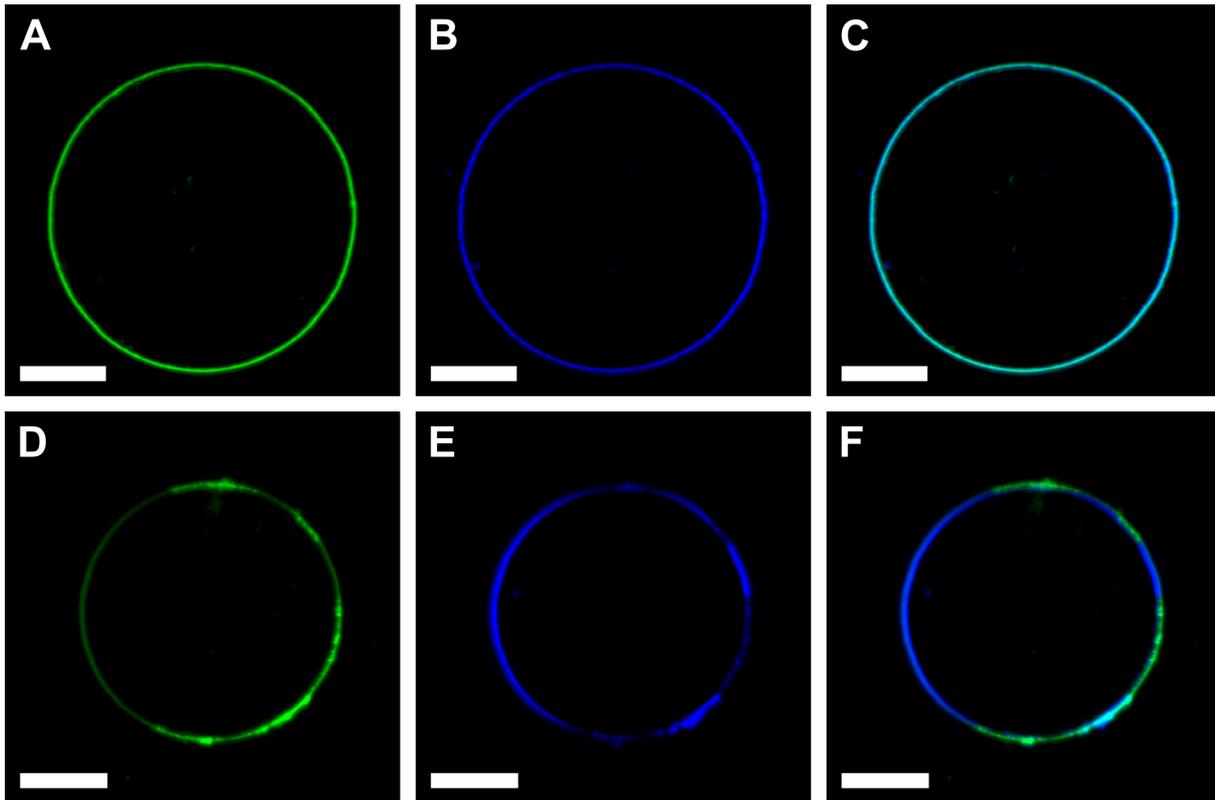


Abb. 4-32: Die Aufnahmen von GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1) zeigen teilweise eine homogene Bodipy-PC- (A) und Perylen-Fluoreszenz (B) im Äquatorialschnitt. (C) Der Overlay beider Fluorophore aus A und B verdeutlicht deren Kolokalisation. Teilweise wurde eine Phasenseparation in l_o - und l_d -Phase der GUVs beobachtet. Dabei reichert sich der Fluorophor Bodipy-PC in der l_d -Phase an (hellgrüne Phase im Äquatorialschnitt in D) und Perylen in der l_o -Phase (hellblaue Phase im Äquatorialschnitt in E). (F) Der Overlay verdeutlicht, dass beide Fluorophore in unterschiedlichen Phasen lokalisiert sind. Maßstabsbalken: 10 μm .

Zum Vergleich wurden festkörperunterstützte Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1) auf Silizium präpariert, die mit den Fluorophoren TexasRed DHPE und Perylen dotiert wurden. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass der Fluorophor TexasRed DHPE, analog zu Bodipy-PC, in der l_d -Phase angereichert ist (Abb. 4-33 A), während Perylen in der

l_o -Phase lokalisiert ist (Abb. 4-33 B). Der Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen zeigt, dass beide Fluorophore unterschiedliche Phasen markieren (Abb. 4-33 C).

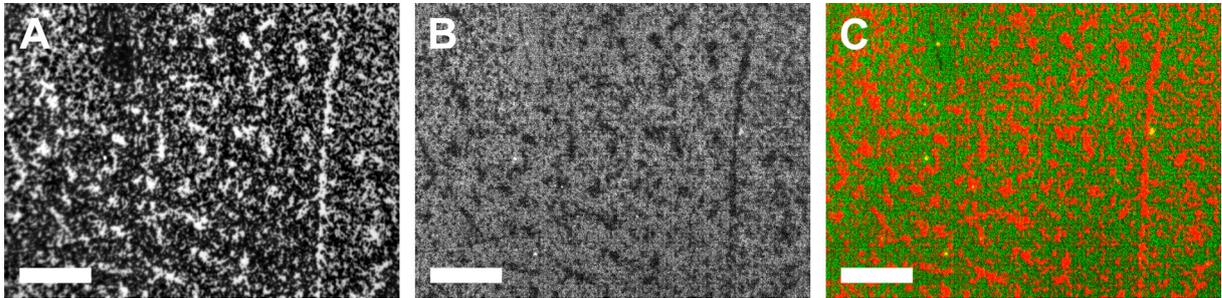


Abb. 4-33: (A) Die Aufnahme der TexasRed DHPE-Fluoreszenz festkörperunterstützter Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1) auf Silizium zeigt eine Phasenseparation in l_α - (helle Bereiche) und l_o -Phase (schwarze Bereiche). (B) Der Fluorophor Perylen ist in der l_o -Phase (helle Bereiche) angereichert. (C) Der Overlay der Falschfarbenbilder von A und B mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz verdeutlicht, dass beide Fluorophore nicht kolokalisiert sind. Maßstabsbalken: 20 μm .

Die Aufnahmen von festkörperunterstützten Membranen in Abb. 4-33 zeigen das erwartete Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1), analog zu der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{b3} (40:35:20:5) in Kap. 4.2.3.

Die Ergebnisse der Präparation von porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1) zeigten ebenfalls ein sehr heterogenes Verhalten. In der Bodipy-PC-Fluoreszenz wurden teilweise phasenseparierte, porenüberspannende Membranen analog zu Kap. 4.2.1 beobachtet (Abb. 4-34 A). Des Weiteren wurden porenüberspannende Membranen beobachtet, die auf dem kompletten Substrat eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz zeigten (Abb. 4-34 B).

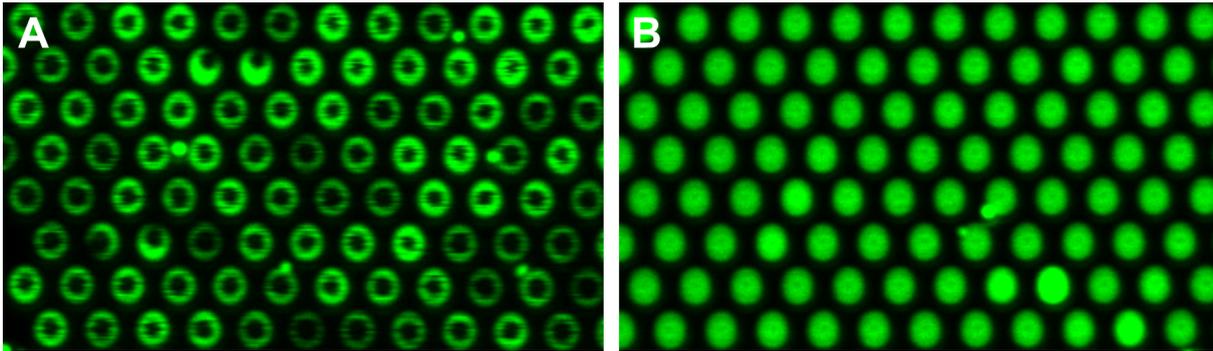


Abb. 4-34: (A) Die Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/G_{M1} (40:39:20:1) zeigt teilweise eine Phasenseparation in *l_o*- (schwarze Domänen) und *l_d*-Phase (grüne Bereiche). (B) Weiterhin wurden porenüberspannende Membranen mit homogener Bodipy-PC-Fluoreszenz beobachtet. Porendurchmesser: 1,2 μm .

Beim Abbilden der Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 4-34 wurde jede Linie 16-fach gemittelt. In porenüberspannenden Membranen, die eine Phasenseparation zeigen sind deutlich horizontale dunkle Streifen erkennbar. Diese deuten auf eine laterale Mobilität der *l_o*-Domänen hin.

Die quantitative Analyse von 39 806 porenüberspannenden Membranen ergab, dass 56 % der porenüberspannenden Bereiche der Membranen nur die *l_d*-Phase zeigten, während 6 % nur aus *l_o*-Phase bestanden. Die verbleibenden 38 % der porenüberspannenden Membranen enthielten sowohl *l_d*- als auch *l_o*-Phase. Von diesen phasenseparierten, porenüberspannenden Membranen waren 40 % der *l_o*-Domänen in der Mitte lokalisiert, während die restlichen 60 % am Rand lokalisiert waren. Somit ist ebenfalls in G_{M1}-dotierten porenüberspannenden Membranen eine bevorzugte Kondensation der *l_o*-Domänen an die Porenrandbereiche erkennbar, ähnlich wie es in Gb₃-enthaltenden Membranen auf CPEO3- (Kap. 4.2.2) und Mercaptoethanol-funktionalisierten Membranen beobachtet wurde (Kap. 4.2.5).

Im Vergleich zu porenüberspannenden Membranen, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) (Kap. 4.2.1), wird deutlich, dass im Falle der G_{M1}-enthaltenden Lipidmischung mehr porenüberspannende Membranbereiche beobachtet werden, die nur eine *l_d*-Phase zeigen, als im Falle der Gb₃-enthaltenden Lipidmischung. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass be-

reits während der Herstellung von GUVs viele Vesikel beobachtet wurden, die nur eine l_d -Phase zeigten.

Die Bindung von Cholera Toxin an porenüberspannende Membranen

Im nächsten Schritt wurde die Anbindung der Cholera Toxin B-Untereinheit (CTxB) an porenüberspannende Membranen der Lipidzusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1) untersucht. Dazu wurden diese 1 h mit 34,5 nM CTxB bei Raumtemperatur inkubiert, um eine ausreichende Proteinbelegung der Membran zu erreichen (Kap. 3.2.6). In Abb. 4-35 sind drei Fälle dargestellt, die nach der Inkubation mit CTxB auftraten: Ein Teil der porenüberspannenden Membranen, die vor der CTxB-Inkubation keine Phasenseparation zeigten (Abb. 4-35 A, C), wiesen auch nach der Proteinanbindung keine Phasenseparation auf (Abb. 4-35 B), während bei anderen Substraten eine Bildung der l_o -Phase durch CTxB induziert wurde (Abb. 4-35 D). Bei porenüberspannenden Membranen, die bereits vor der CTxB-Inkubation phasensepariert vorlagen (Abb. 4-35 E), stieg der Anteil der l_o -Phase nach der Proteinanbindung.

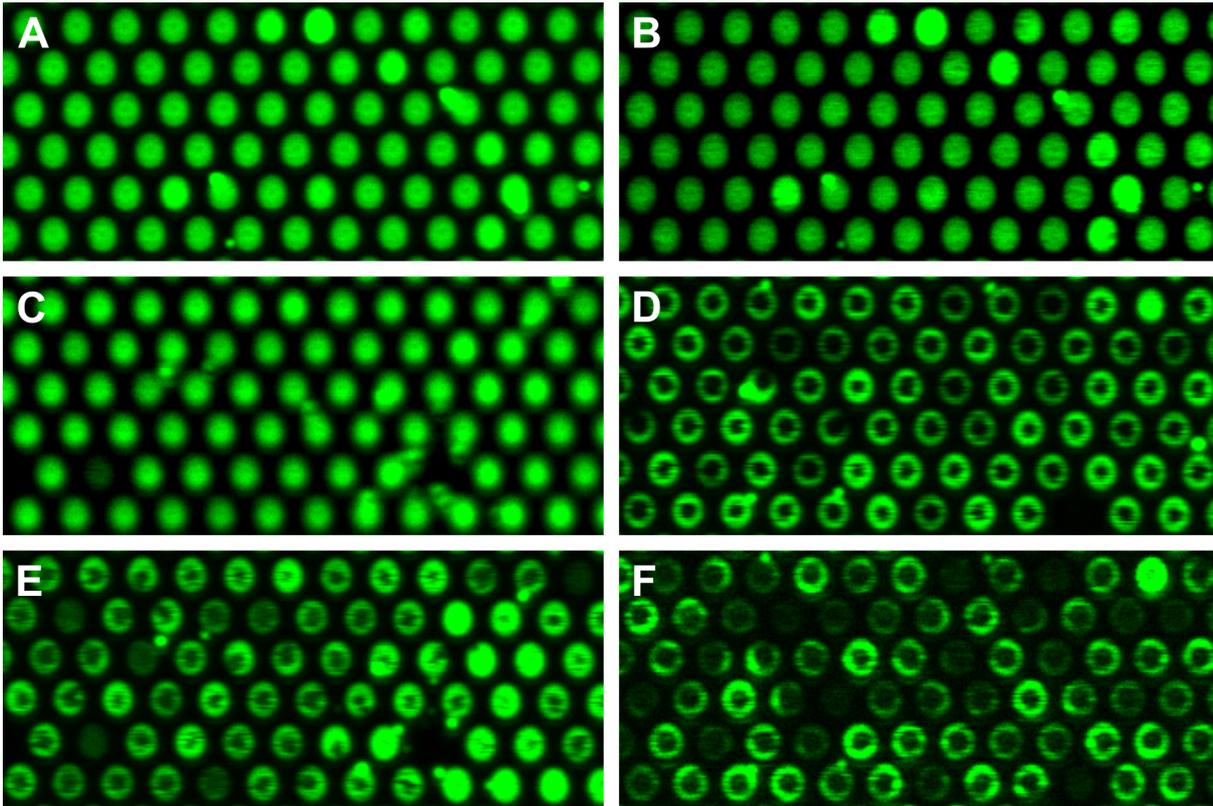


Abb. 4-35: (A, C) Die Aufnahmen der Bodipy-PC-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1) zeigen vor CTxB-Zugabe teilweise eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz und teilweise eine Phasenseparation in l_o - (schwarze Domänen in E) und l_d -Phase (grüne Bereiche in E). Nach der Inkubation mit 34,5 nM CTxB für 1 h zeigte sich entweder weiterhin eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz (B) oder die Bildung von dunklen l_o -Domänen wurde durch CTxB induziert (D). (E) Bei einer bestehenden Phasenseparation vor Proteinzugabe stieg der Anteil der l_o -Phase nach CTxB-Bindung (F). Porendurchmesser: 1,2 μm .

Aufgrund der drei beobachteten Fälle nach der Inkubation mit CTxB, dargestellt in Abb. 4-35, wurde auf eine detaillierte Auswertung des Anstiegs der l_o -Phase nach der Proteinanbindung verzichtet.

Die Bindung des CTxB an G_{M1} in porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1), dotiert mit dem Fluorophor TexasRed DHPE, der in der l_d -Phase angereichert ist, wurde als nächstes überprüft (Kap. 3.1.2). Dazu wurden diese 1 h mit 34,5 nM FITC-markiertem CTxB (CTxB-FITC) bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Proteinanbindung ist die Phasenseparation der Lipidmischung in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz erkennbar

(Abb. 4-36 A). Nach Inkubation mit CTxB-FITC wird ein Anstieg der l_o -Phase in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz der porenüberspannenden Membranen deutlich (Abb. 4-36 B). Das fluoreszenzmarkierte CTxB-FITC, dargestellt in Abb. 4-36 C, hat an die porenüberspannenden Membranen gebunden. Eine genauere Lokalisation des Proteins gestaltete sich in den durchgeführten Experimenten aufgrund der sehr geringen Fluoreszenzintensität des FITC-Fluorophors und des starken Bleichens der FITC-Fluoreszenz schwierig.

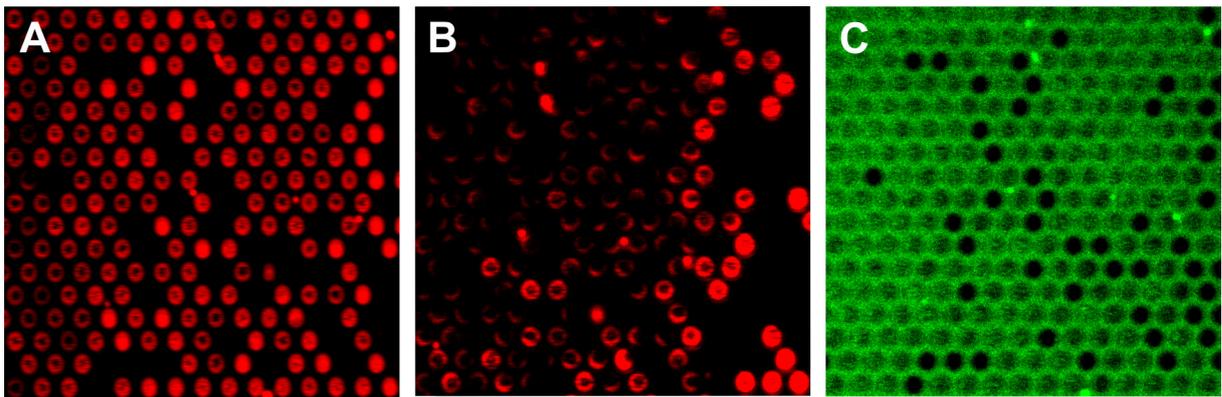


Abb. 4-36: (A) Die Aufnahme der TexasRed DHPE-Fluoreszenz porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ G_{M1} (40:39:20:1) zeigt eine Phasenseparation in l_o - (schwarze Domänen) und l_d -Phase (rote Bereiche). (B) Nach Inkubation mit 34,5 nM FITC-markiertem CTxB für 1 h steigt der Anteil der l_o -Phase, erkennbar in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz. (C) Die Aufnahme der CTxB-FITC-Fluoreszenz zeigt die Bindung an die porenüberspannenden Membranen. Porendurchmesser: 1,2 μm .

4.2.7 Vergleich des Phasenverhaltens der untersuchten porenüberspannenden Membranen

Abschließend wurde noch ein zusammenfassender Vergleich des Phasenverhaltens porenüberspannender Membranen, die entweder mit G_{b3} - oder mit G_{M1} dotiert und sowohl auf CPEO3- als auch auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten präpariert wurden, durchgeführt.

Im Falle der Membranen, bei denen das poröse Substrat hydrophil mit Mercaptoethanol funktionalisiert war (Kap. 4.2.5), ist der Anteil der porenüberspannenden Membranen, die nur eine l_o -Phase zeigen, signifikant höher als in den beiden Membransystemen auf CPEO3-funktionalisierten Substraten (Abb. 4-37 C).

Der höchste Anteil porenüberspannender Membranen, die nur die l_d -Phase zeigten, wurde im System der G_{M1} -enthaltenden Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Substraten beobachtet (56 %, Abb. 4-37 A), während im System der G_{b_3} -enthaltenden Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Substraten am häufigsten porenüberspannende Membranen, die sowohl die l_d - als auch die l_o -Phase zeigten (52 %, Abb. 4-37 B), gefunden wurden.

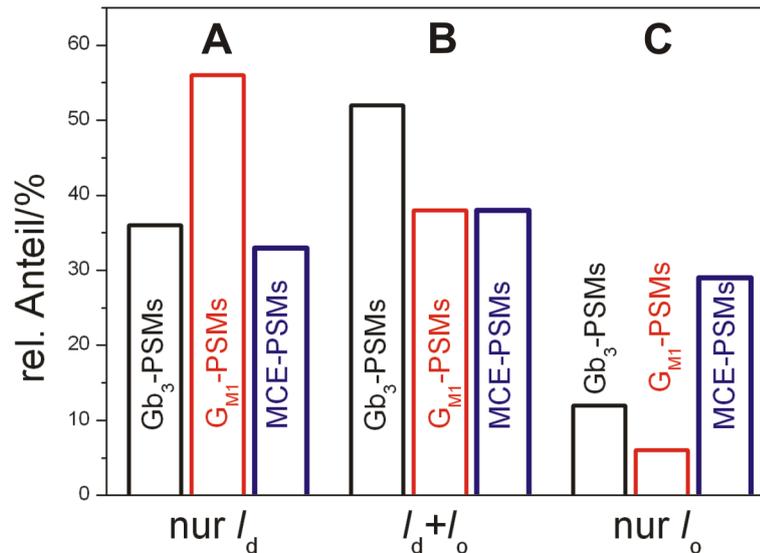


Abb. 4-37: Vergleich der drei untersuchten Systeme porenüberspannender Membranen bezüglich des Phasenverhaltens. (A) Porenüberspannende Membranen, die nur die l_d -Phase zeigten, wurden am häufigsten im System der G_{M1} -enthaltenden Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Substraten gefunden (G_{M1} -PSMs). (B) Im System der G_{b_3} -enthaltenden Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Substraten (G_{b_3} -PSMs) wurden am häufigsten porenüberspannende Membranen, die sowohl l_d - als auch die l_o -Phase zeigten, beobachtet (C) Die G_{b_3} -enthaltenden Membranen auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten gefunden (MCE -PSMs) zeigten in allen untersuchten Systemen den größten Anteil porenüberspannender Membranen, die nur die l_o -Phase aufwiesen.

Die Auswertung der l_o -Domänenlokalisierung in porenüberspannenden Membranen, die sowohl l_o - als auch l_d -Phase zeigen, ergab in allen drei untersuchten Membransystemen eine Präferenz für die Kondensation der l_o -Domänen an die Porenrandbereiche. Somit scheint nicht die Funktionalisierung des Substrates für die Kondensation an die Porenrandbereiche verantwortlich zu sein (Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Übersicht der Ergebnisse zur Auswertung der l_o -Domänenlokalisation in porenüberspannenden Membranen, die sowohl l_o - als auch l_d -Phase zeigen.

Substratfunktionalisierung	Protein & Rezeptorlipid	l_o -Domäne in Porenmitte	l_o -Domäne am Porenrand	n
CPEO3	STxB-Gb ₃	25 %	75 %	8 663
CPEO3	CTxB-G _{M1}	40 %	60 %	39 806
Mercaptoethanol	STxB-Gb ₃	45 %	55 %	12 960

4.3 Einfluss der molekularen Struktur des Rezeptorlipids Gb₃ auf das Phasenverhalten festkörperunterstützter Membranen

Die molekulare Zusammensetzung des Shiga Toxin Rezeptorlipids Gb₃ ist abhängig von der Quelle, aus der das Glykosphingolipid gewonnen wurde (Kap. 3.1.1) und weiteren Bedingungen, wie z. B. den Ernährungs- und Wachstumsbedingungen des Organismus. Im ersten Teil dieser Arbeit und in früheren Arbeiten wurde natives Gb₃, isoliert aus Schweine-Erythrozyten, eingesetzt.^[67] Die Bindung von STxB an dieses, inkorporiert in GUVs, führte zur Bildung tubulärer Membraninvaginationen.^[65] Wurde das Rezeptorlipid durch aus HeLa-Zellen isoliertem Gb₃ substituiert, wurden ebenfalls Membraninvaginationen gebildet, die sich jedoch in Abhängigkeit von Cholesterin abschnüren konnten.^[100] Es ist bekannt, dass in Tumorzellen, wie z. B. HeLa-Zellen, der Anteil an Gb₃ mit α -hydroxylierten Fettsäuren deutlich höher ist.^[100, 151]

Daher stellte sich die Frage, welche Auswirkungen die molekulare Struktur des Gb₃ auf die laterale Organisation einer Membran in Abhängigkeit der Bindung von STxB hat. Zunächst wurde Gb₃ aus HeLa-Zellen (HeLa-Gb₃) in festkörperunterstützte Membranen eingebracht. Um die darin beobachteten Effekte eindeutig auf den Einfluss der verschieden-funktionalisierten Fettsäuren zurückführen zu können, wurde anschließend anhand von reinen, synthetisierten Gb₃-Verbindungen bestimmt, wie sich der Einfluss einer α -Hydroxylierung bzw. einer ungesättigten Fettsäure in Gb₃

auf das Phasenverhalten der verwendeten Lipidmischung in Abhängigkeit von der Shiga Toxin-Bindung auswirkt.

4.3.1 Einfluss von Gb₃ aus HeLa-Zellen auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium

Zunächst wurde der Einfluss von Gb₃, isoliert aus HeLa-Zellen, auf das Phasenverhalten von festkörperunterstützten Membranen der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) in Abhängigkeit der Bindung der Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB) untersucht. Dazu wurden 5 mol% des Sphingomyelins mit Gb₃ aus HeLa-Zellen substituiert. Die Fluorophore TexasRed DHPE und Perylen wurden zu jeweils 0,1 und 0,5 mol% zu der Lipidmischung hinzugegeben, um diese Membranen fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzaufnahmen von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/HeLa-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium zeigen vor STxB-Bindung eine Phasenseparation in *l_o*- und *l_d*-Phase. Der Fluorophor TexasRed DHPE markiert die *l_d*-Phase (Abb. 4-38 A) und Perylen ist in der *l_o*-Phase angereichert (Abb. 4-38 B). Der Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen verdeutlicht, dass jeder der Fluorophore nur in einer der beiden Domänen angereichert ist (Abb. 4-38 C). Weiße Punkte, die in beiden Fluoreszenzkanälen sichtbar sind, wurden Vesikeln zugeordnet, die an die Membran adsorbierten.

Nach 1 h Inkubation mit 60 nM STxB und der Entfernung des ungebundenen Proteins durch Spülen mit PBS-Puffer wird TexasRed DHPE weiterhin in der *l_d*-Phase gefunden (Abb. 4-38 D). Perylen ist in der *l_o*-Phase angereichert (Abb. 4-38 E). Wiederrum verdeutlicht der Overlay, dass beide Fluorophore in verschiedenen Domänen angereichert sind (Abb. 4-38 F).

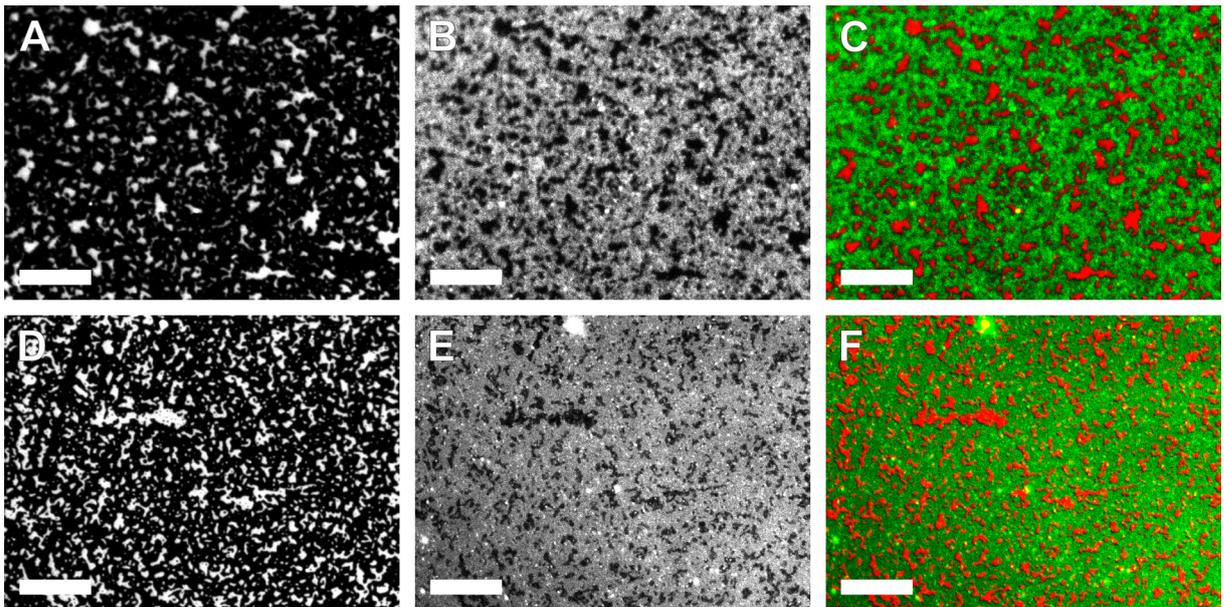


Abb. 4-38: (A) Die TexasRed DHPE-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/HeLa-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium vor STxB-Bindung zeigt eine Phasenseparation in *l_a*- (helle Bereiche) und *l_o*-Phase (schwarze Bereiche). (B) Der Fluorophor Perylen ist in der *l_o*-Phase angereichert (helle Bereiche). (C) Der Overlay der Falschfarbenbilder von A und B mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz verdeutlicht, dass beide Fluorophore in unterschiedlichen Phasen lokalisiert sind. Nach Proteinbindung markiert TexasRed DHPE (D) weiterhin die *l_a*-Phase und Perylen (E) ist in der *l_o*-Phase angereichert. (F) Der Overlay der Falschfarbenbilder von D und E mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz verdeutlicht dies. Maßstabsbalken: 20 μm.

Eine quantitative Pixelanalyse mit Hilfe des Programms *ImageJ* ergab, dass der Anteil der *l_o*-Phase von $(70 \pm 7) \%$ ($n = 47$) vor der Bindung von STxB und $(74 \pm 5) \%$ ($n = 43$) nach Bindung innerhalb der Fehlergrenzen gleich blieb.

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen bestätigen die Phasenseparation der Lipidmischung vor STxB-Inkubation (Abb. 4-39 A). Die tieferliegenden Bereiche sind anhand einer dunkleren Farbe erkennbar und werden der *l_a*-Phase zugeordnet, die hauptsächlich mit DOPC angereichert ist. Die *l_o*-Phase ist mit Sphingomyelin und Cholesterin angereichert ist. Eine dichtere Packung der Lipide in dieser Phase führt zu einer höheren Membrandicke.^[148, 149] Diese Bereiche werden heller dargestellt. Eine

quantitative Höhenbestimmung mittels einer Histogrammanalyse (Abb. 4-39 B) ergibt eine Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von $(0,6 \pm 0,1)$ nm ($n = 18$), die mit der Literatur übereinstimmt.^[67]

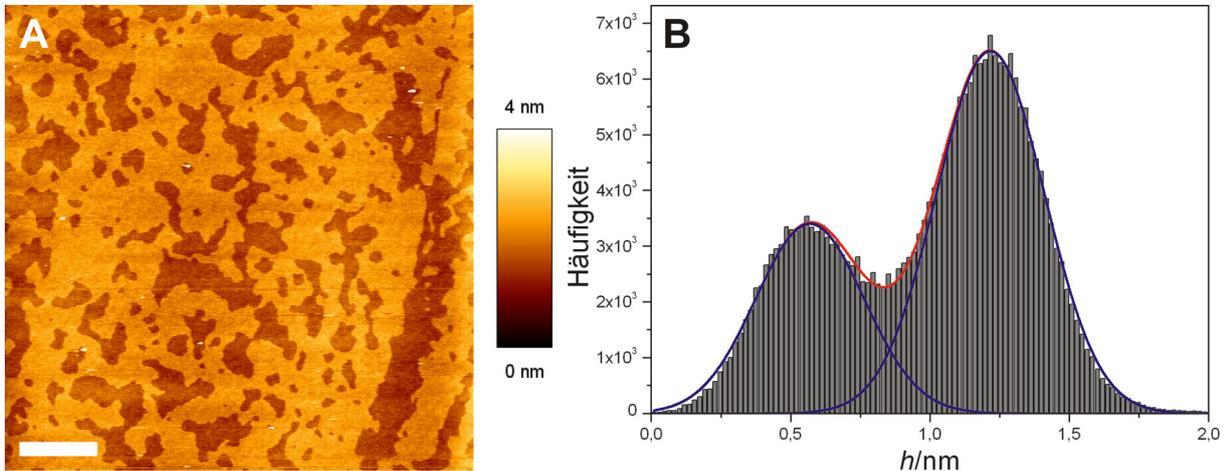


Abb. 4-39: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/HeLa-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium vor Bindung von STxB zeigt eine Phasenseparation in l_d - (dunkle Bereiche) und l_o -Phase (helle Bereiche). Maßstab: 5 μ m. (B) Ein exemplarisches Histogramm zeigt die ermittelte Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von $(0,7 \pm 0,1)$ nm.

Nach der STxB-Bindung wurde in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen eine Höhendifferenz zwischen l_d -Phase und proteinbedeckter l_o -Phase von $(1,6 \pm 0,2)$ nm ($n = 17$) beobachtet (Abb. 4-40). In allen rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen konnte nur die Höhendifferenz zwischen l_d -Phase und proteinbedeckter l_o -Phase ermittelt werden.

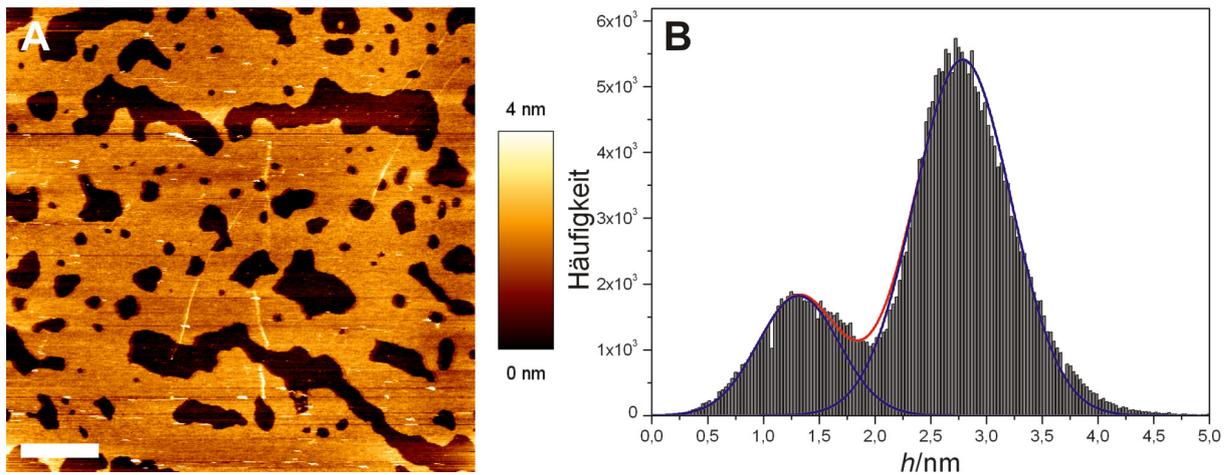


Abb. 4-40: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/HeLa-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium nach Bindung von STxB zeigt die Höhendifferenz zwischen l_d -Phase und proteinbedeckter l_o -Phase. Maßstabsbalken: 5 μm . (B) Ein exemplarisches Histogramm verdeutlicht die ermittelte Höhendifferenz von $(1,6 \pm 0,2)$ nm.

4.3.2 Einfluss der α -Hydroxylierung in Gb₃ auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium

Im vorigen Kapitel wurde der Einfluss der Bindung von STxB an Gb₃, isoliert aus HeLa-Zellen (HeLa-Gb₃), auf die laterale Organisation festkörperunterstützter Membranen untersucht. Diese Gb₃-Mischung enthält einen hohen Anteil α -hydroxylierter Fettsäuren (Kap. 3.1.1).^[100, 151]

Um den Einfluss einer α -Hydroxylierung in Gb₃ auf das Phasenverhalten festkörperunterstützter Membranen in Abhängigkeit von der STxB-Bindung zu untersuchen, wurden in der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) 5 mol% des Sphingomyelins mit synthetischem C₂₄- α -OH-Gb₃ substituiert. Die Fettsäurekette dieses Glykosphingolipids weist eine Länge von 24 C-Atomen auf und besitzt in α -Position eine OH-Gruppe (Kap. 3.1.1). Die Fluorophore TexasRed DHPE und Perylen wurden zu jeweils 0,1 und 0,5 mol% der Lipidmischung hinzugegeben, um diese Membranen fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzaufnahmen von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄- α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium zeigen vor Bindung der Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB) eine Phasenseparation in *l_d*- und *l_o*-Phase. Es werden viele feinverteilte *l_o*-Domänen innerhalb der *l_d*-Phase gefunden, die durch den Kontrast zum Fluorophor TexasRed DHPE (Abb. 4-41 A), der die *l_d*-Phase markiert, angezeigt werden. Der Fluorophor Perylen ist in der *l_o*-Phase angereichert (Abb. 4-41 B), zeigt aber einen geringeren Kontrast.

Nach 1 h Inkubation mit 60 nM STxB und der Entfernung des ungebundenen Proteins durch Spülen mit PBS-Puffer werden in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz weiterhin feinverteilte *l_o*-Domänen innerhalb der *l_d*-Phase beobachtet (Abb. 4-41 D). Der Fluorophor Perylen ist etwas stärker in der *l_o*-Phase angereichert (Abb. 4-41 B und Overlay in C).

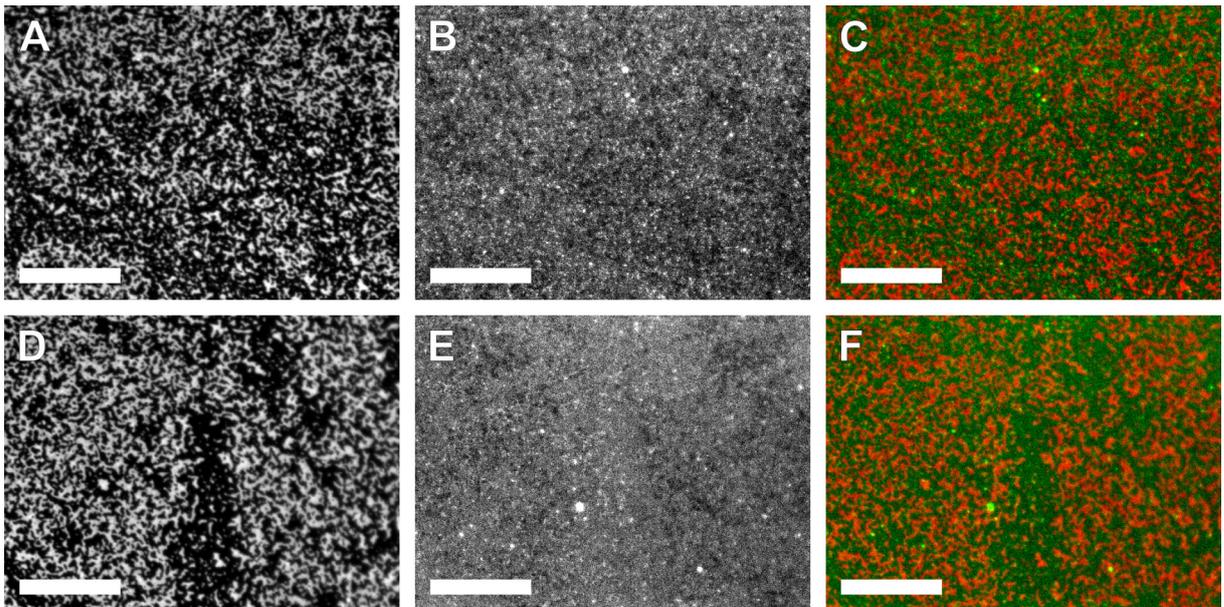


Abb. 4-41: (A) Die TexasRed DHPE-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium vor STxB-Bindung zeigt eine Phasenseparation in l_d - (helle Bereiche) und l_o -Phase (schwarze Bereiche). (B) Der Fluorophor Perylen ist in der l_o -Phase (helle Bereiche) angereichert. (C) Der Overlay der Falschfarbenbilder von A und B mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz verdeutlicht, dass beide Fluorophore in verschiedenen Phasen angereichert sind. Nach Proteinbindung markiert TexasRed DHPE (D) die l_d -Phase und Perylen (E) ist weiterhin in der l_o -Phase angereichert. (F) Der Overlay der Falschfarbenbilder von D und E mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz verdeutlicht dies. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Eine quantitative Pixelanalyse mit Hilfe des Programms *ImageJ* ergab, dass der Anteil der l_o -Phase nach der STxB-Bindung gleich bleibt. Vor STxB-Bindung wurde der Anteil der l_o -Phase zu $(62 \pm 5) \%$ ($n = 66$) bestimmt. Nach der Proteinbindung konnte ein Anteil der l_o -Phase von $(61 \pm 8) \%$ ($n = 79$) ermittelt werden.

Mit fluoreszenzmarkiertem STxB wurde überprüft, ob das Protein an die l_d - oder an die l_o -Phase der festkörperunterstützten Membranen bindet. Da das Cy3-markierte STxB in den gleichen Spektralbereichen wie TexasRed DHPE absorbiert und emittiert, musste der Fluorophor TexasRed DHPE in der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) durch Oregon Green DHPE substituiert werden. Oregon Green DHPE zeigt eine ähnliche Verteilung zwischen l_d - und l_o -Phase wie TexasRed DHPE (Kap. 3.1.2). Die Aufnahme der Cy3-Fluoreszenz

(Abb. 4-42 B) zeigt, dass das fluoreszenzmarkierte STxB nur an das in der l_o -Phase befindliche Gb₃ bindet, die in der Oregon Green DHPE-Fluoreszenz dunkel erscheint (Abb. 4-42 A). Der Overlay verdeutlicht, dass beide Fluorophore nach der Inkubation mit STxB-Cy3 nicht kolokalisiert sind (Abb. 4-42 C).

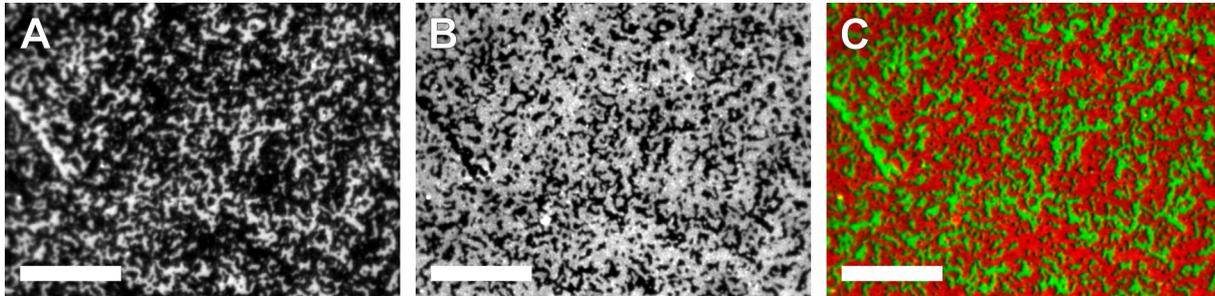


Abb. 4-42: (A) Die Oregon Green DHPE-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄- α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium nach Bindung von Cy3-markiertem STxB zeigt eine Phasenseparation in l_d - (helle Bereiche) und l_o -Phase (schwarze Bereiche). (B) STxB-Cy3 bindet an die l_o -Phase. (C) Der Overlay von A und B mit grüner Oregon Green DHPE- und roter STxB-Cy3-Fluoreszenz verdeutlicht dies. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Die Untersuchung des fluoreszenzmarkierten STxB bestätigt somit, dass dieses an C₂₄- α -OH-Gb₃ in festkörperunterstützten Membranen auf Silizium bindet und sich das α -hydroxylierte Gb₃ nach der Proteinnanbindung in der l_o -Phase befinden muss.

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen bestätigen die Phasenseparation der Lipidmischung vor STxB-Inkubation (Abb. 4-43 A). Dunkle Bereiche visualisieren die l_d -Phase, während die höhere l_o -Phase als hellere Bereiche dargestellt wird. Eine quantitative Höhenbestimmung mittels einer Histogrammanalyse (Abb. 4-43 B) ergab eine Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von $(0,7 \pm 0,4)$ nm ($n = 167$), die dem Literaturwert entspricht.^[67]

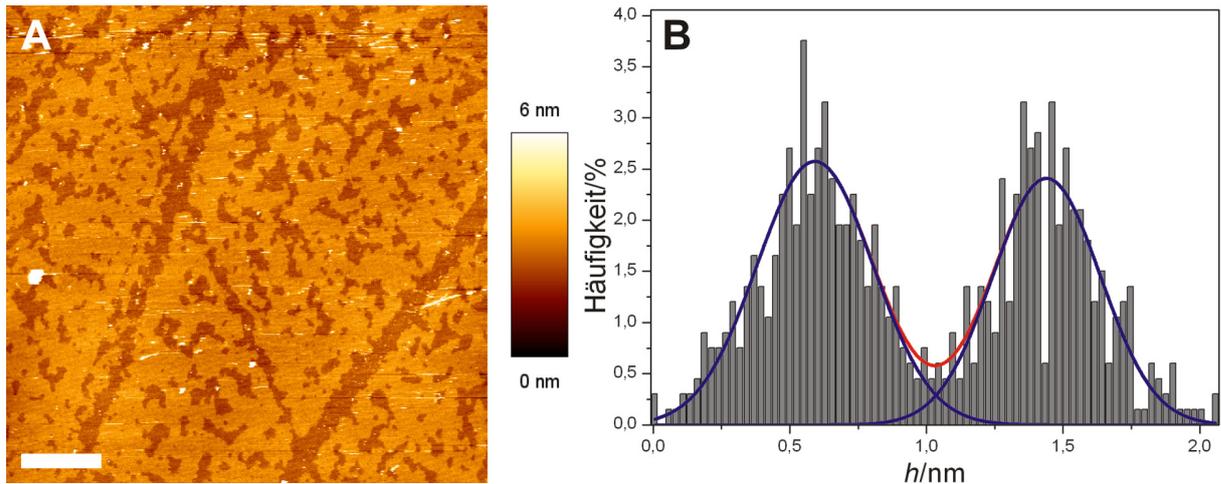


Abb. 4-43: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}\text{-}\alpha\text{-OH-Gb}_3$ (40:35:20:5) auf Silizium vor Bindung von STxB zeigt eine Phasenseparation in l_d - (dunkle Bereiche) und l_o -Phase (helle Bereiche). Maßstabsbalken: 5 μm . (B) Ein exemplarisches Histogramm zeigt die Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von $(0,9 \pm 0,4)$ nm.

Nach der STxB-Bindung konnte in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen keine wesentliche Änderung festgestellt werden (Abb. 4-44 A). Außerdem konnte nur die Höhendifferenz der Phasenseparation in l_o - und l_d -Phase zu $(0,8 \pm 0,4)$ nm ($n = 137$) ermittelt werden. Diese wurde mittels einer Histogrammanalyse bestimmt (Abb. 4-44 B). Die STxB-Anbindung konnte nicht mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie visualisiert werden, obwohl durch die Experimente mit dem fluoreszenzmarkierten STxB gezeigt wurde, dass dieses an $C_{24}\text{-}\alpha\text{-OH-Gb}_3$ in der festkörperunterstützten Membran bindet (Abb. 4-42).

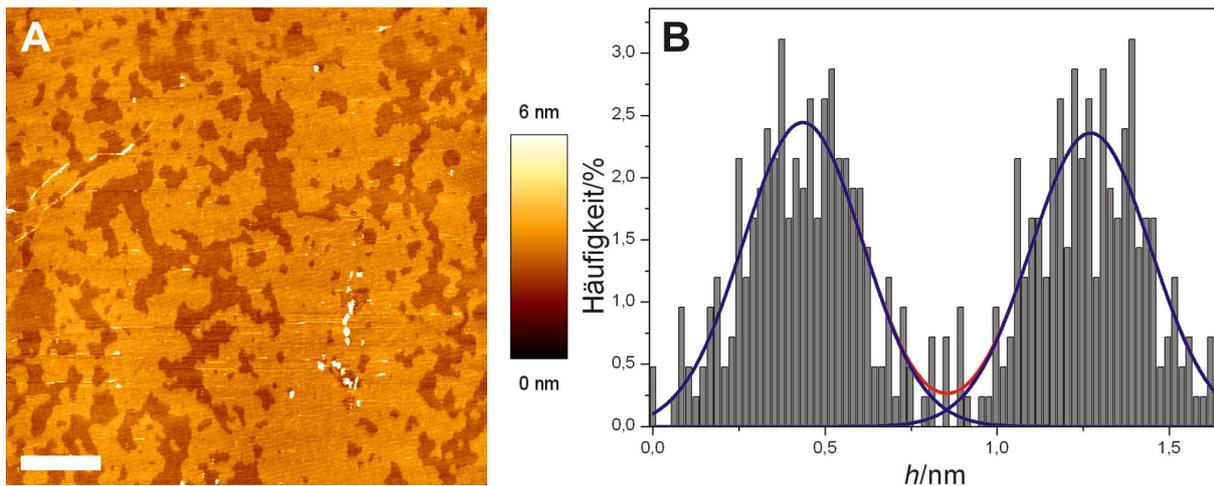


Abb. 4-44: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium nach Bindung von STxB zeigt nur die Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase. Maßstabsbalken: 5 μ m. (B) Ein exemplarisches Histogramm verdeutlicht die ermittelte Höhendifferenz von $(0,8 \pm 0,3)$ nm.

4.3.3 Einfluss der α -Hydroxylierung in Gb₃ auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica

Die STxB-Bindung an C_{24} - α -OH-Gb₃ in festkörperunterstützten Membranen auf Silizium konnte nicht mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie bestätigt werden. Lipide in Membranen auf Silizium weisen eine höhere Mobilität auf als in Membranen auf Mica (Glimmer).^[147] Diese erhöhte laterale Mobilität kann dazu führen, dass das gebundene STxB während rasterkraftmikroskopischer Aufnahmen durch den *Cantilever* verschoben wird und somit nicht abgebildet werden kann.

In weiteren Experimenten zur Untersuchung des Einflusses einer α -Hydroxylierung in Gb₃ auf das Phasenverhalten festkörperunterstützter Membranen in Abhängigkeit von der STxB-Bindung wurde daher mit festkörperunterstützten Membranen, präpariert auf dem Substrat Mica, gearbeitet. Dazu wurden 5 mol% des Sphingomyelins in der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) mit C_{24} - α -OH-Gb₃ substituiert und die Fluorophore TexasRed DHPE und Perylen zu jeweils 0,1 und 0,5 mol% zugegeben, um diese fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzaufnahmen von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄- α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica zeigen vor Bindung des STxB eine Phasenseparation in l_d - und l_o -Phase. Es werden viele feinverteilte l_o -Domänen innerhalb der l_d -Phase gefunden, die durch den Fluorophor TexasRed DHPE (Abb. 4-45 A, D) angezeigt werden. Die Lokalisation des Perylens war nicht immer eindeutig zuzuordnen. Teilweise zeigte dieses eine Anreicherung in der l_o -Phase (Abb. 4-45 B) und teilweise in der l_d -Phase (Abb. 4-45 E), während in vielen Experimenten kein Kontrast zwischen den beiden Phasen in der Perylen-Fluoreszenz beobachtet wurde. Weiße Punkte, die in beiden Fluoreszenzkanälen sichtbar sind und in den Overlays als gelbe Punkte erscheinen, wurden adsorbierten Vesikeln zugeordnet.

In den Membranpräparationen auf Mica wurden öfter Membrandefekte beobachtet (Abb. 4-45 D-F) als in festkörperunterstützten Membranen auf Silizium. In der Mitte dieser Defekte kann in beiden Fluoreszenzkanälen ein mittleres Grau detektiert werden. In der direkten Umgebung der Membrandefekte wird in beiden Fluoreszenzkanälen ein „dunkler Bereich“ beobachtet. Dieser erscheint im Overlay leicht grün gefärbt, da die Helligkeit des Perylen-Kanals zur Erstellung des Overlays erhöht wurde (Abb. 4-45 F).

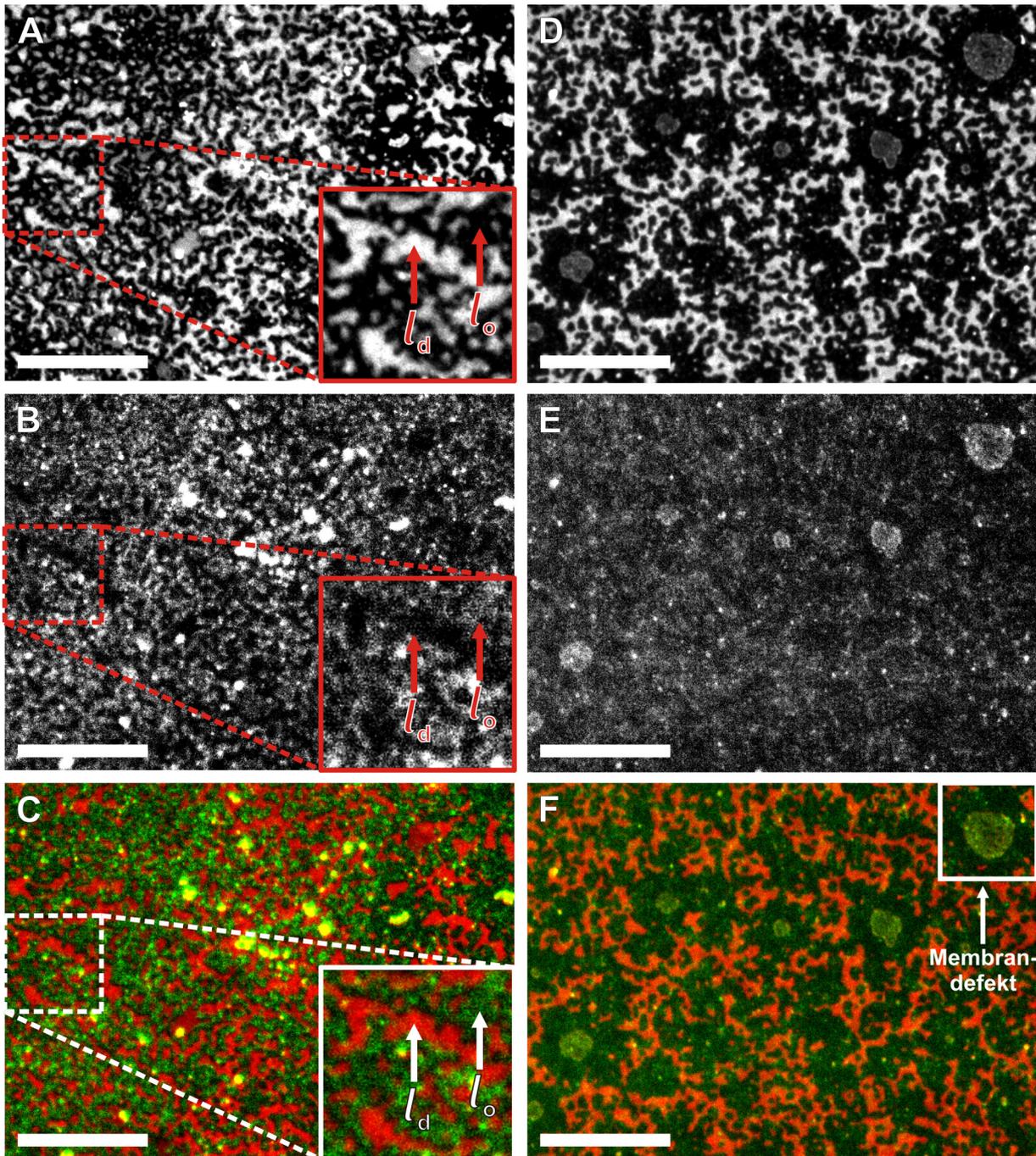


Abb. 4-45: Festkörperunterstützte Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica vor STxB-Bindung (**A, D**) Die TexasRed DHPE-Fluoreszenzaufnahme zeigt eine Phasenseparation in l_a - (helle Bereiche) und l_o -Phase (dunkle Bereiche). (**B**) Der Fluorophor Perylen ist in der l_o -Phase (helle Bereiche) angereichert. (**C**) Der Overlay der Falschfarbenbilder von **A** und **B** mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz zeigt, dass beide Fluorophore nicht kolokalisiert sind. (**E**) Der Fluorophor Perylen zeigt in einigen Bereichen der Probe eine Anreicherung in der l_a -Phase (helle Bereiche). (**F**) Der Overlay der Falschfarbenbilder von **D** und **E** mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz zeigt anhand der Gelb-Orange-Färbung, dass beide Fluorophore kolokalisiert sind. Auf vielen Substraten wurden gehäuft Membrandefekte beobachtet. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Nach 1 h Inkubation mit 60 nM STxB und der Entfernung des überschüssigen Proteins durch Spülen mit PBS-Puffer wird in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz ein deutlicher Anstieg des Anteils der l_o -Phase beobachtet (dunkle Bereiche in Abb. 4-46 A). Die Feinverteilung der beobachteten l_d -Domänen bleibt auch nach der STxB-Inkubation erhalten. Der Fluorophor Perylen ist nach der STxB-Bindung in der l_d -Phase angereichert (Abb. 4-46 B). Der Overlay verdeutlicht die Kollokalisierung beider Fluorophore (Abb. 4-46 C) Die Grünfärbung der Bereiche des Overlays, die der l_o -Phase zugeordnet wurden, entsteht durch die Erhöhung der Helligkeit im Perylen-Fluoreszenzkanal. Weiße Punkte, die in beiden Fluoreszenzkanälen sichtbar sind, wurden adsorbierten Vesikeln zugeordnet.

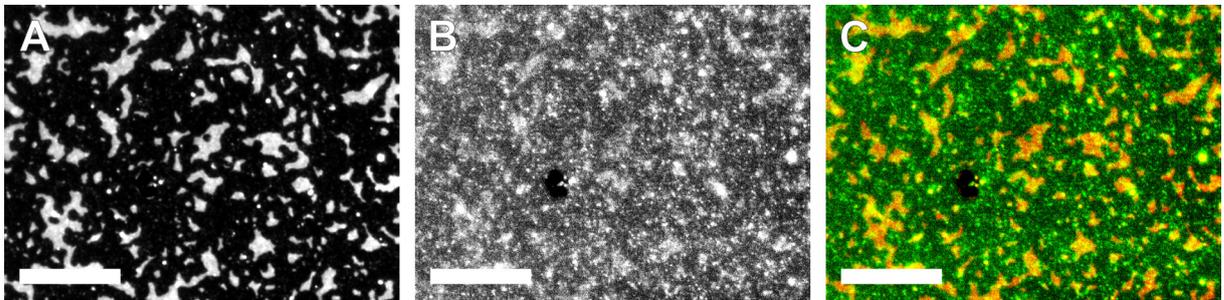


Abb. 4-46: (A) Die TexasRed DHPE-Fluoreszenzaufnahme von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica nach STxB-Bindung zeigt eine Phasenseparation in l_d - (helle Bereiche) und l_o -Phase (dunkle Bereiche). (B) Der Fluorophor Perylen ist in der l_d -Phase (helle Bereiche) angereichert. (C) Der Overlay der Falschfarbenbilder von A und B mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz zeigt, dass beide Fluorophore kollokalisiert sind. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Eine quantitative Pixelanalyse mit Hilfe des Programms *ImageJ* ergab, dass der Anteil der l_o -Phase von $(55 \pm 5) \%$ ($n = 36$) auf $(77 \pm 5) \%$ ($n = 42$) nach der Bindung von STxB gestiegen ist.

Mit fluoreszenzmarkiertem STxB wurde überprüft, an welche Phase der festkörperunterstützten Membranen das Protein bindet. Dazu wurde der Fluorophor TexasRed DHPE in der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) durch Bodipy-PC substituiert. Bodipy-PC zeigt eine ähnliche Verteilung zwischen l_d - und l_o -Phase wie TexasRed DHPE (Kap. 3.1.2). Die festkörperunterstützt-

ten Membranen auf Mica wurden mit Cy3-markiertem STxB inkubiert und ungebundenes Protein durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt.

In der Bodipy-PC-Fluoreszenz ist die Phasenseparation der festkörperunterstützten Membranen erkennbar (Abb. 4-47 A). Hellgrüne Bereiche werden der l_d -Phase zugeordnet und dunkelgrüne Bereiche der l_o -Phase. Die schwarzen Bereiche können Membrandefekten zugeordnet werden (weißer Pfeil in Abb. 4-47 A). Die Aufnahme der Cy3-Fluoreszenz zeigt, dass das fluoreszenzmarkierte STxB nur an die l_o -Phase der Membran bindet (Abb. 4-47 B). Im Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen wird deutlich, dass STxB-Cy3 an die dunkelgrünen Bereiche bindet, die mittels der Bodipy-PC-Fluoreszenz der l_o -Phase zugeordnet wurden (Abb. 4-47 C). Die schwarzen Membrandefekte können auch in der Cy3-Fluoreszenz beobachtet werden. An den Rändern dieser Defekte findet außerdem eine unspezifische Bindung des STxB statt, erkennbar an den hellen, roten „Linien“ in der STxB-Cy3-Fluoreszenz (Abb. 4-47 B) und im Overlay (Abb. 4-47 C).

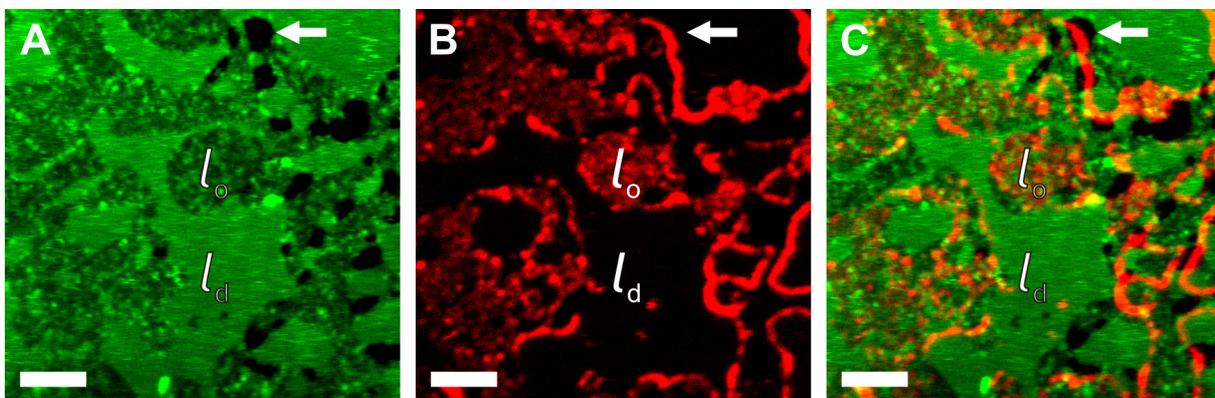


Abb. 4-47: (A) Die Bodipy-PC-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica nach Bindung von Cy3-markiertem STxB zeigt eine Phasenseparation in l_d - (hellgrüne Bereiche) und l_o -Phase (dunkelgrüne Bereiche). (B) STxB-Cy3 bindet an die l_o -Phase. (C) Der Overlay von A und B verdeutlicht dies. Das Protein bindet außerdem unspezifisch an den Rändern von Membrandefekten (rote „Linien“ in B und C). Maßstabsbalken: 5 μ m.

Die Untersuchung des fluoreszenzmarkierten STxB bestätigt somit, dass sich das α -hydroxylierte Gb₃ nach der Proteinanbindung in der l_o -Phase befinden muss.

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Die Phasenseparation der festkörperunterstützten Membranen vor der STxB-Inkubation konnte mittels rasterkraftmikroskopischer Aufnahmen bestätigt werden (Abb. 4-48 A). In der Aufnahme ist die l_d -Phase anhand einer dunkleren Farbe erkennbar und die höhere l_o -Phase anhand einer helleren Farbe. Helle weiße Punkte in den Aufnahmen wurden adsorbierten Vesikeln zugeordnet. Eine quantitative Höhenbestimmung mittels einer Histogrammanalyse (Abb. 4-48 B) ergab eine Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von $(0,8 \pm 0,5)$ nm ($n = 80$), die dem Literaturwert entspricht.^[67]

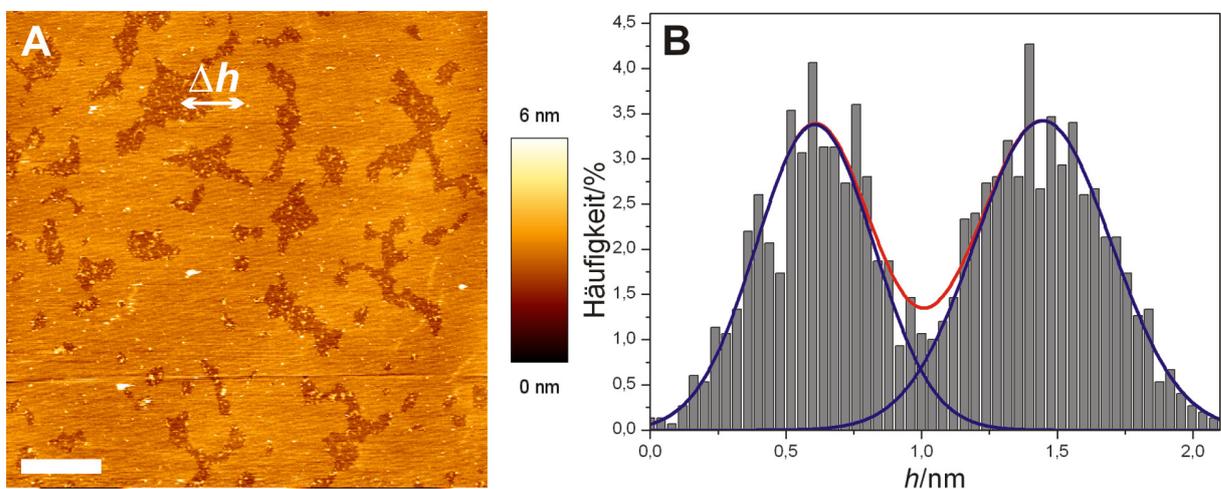


Abb. 4-48: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica vor Bindung von STxB zeigt eine Phasenseparation in l_d - (dunkle Bereiche) und l_o -Phase (helle Bereiche). Maßstabswalken: 5 μ m. (B) Ein exemplarisches Histogramm zeigt die Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von $(0,8 \pm 0,5)$ nm.

Nach der STxB-Bindung wurde in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen eine Höhendifferenz zwischen l_d -Phase und proteinbedeckter l_o -Phase von $(1,0 \pm 0,6)$ nm ($n = 67$) beobachtet (Δh_1 in Abb. 4-49). Dieser Wert liegt niedriger als der Literaturwert.^[67] In der l_o -Phase wird weiterhin eine Unterstruktur gefunden, für die eine Höhendifferenz von $(0,7 \pm 0,6)$ nm ($n = 21$) mittels Histogrammanalyse bestimmt werden konnte (Δh_2 in Abb. 4-49). Es wird eine sehr dichte Packung des Toxins auf der l_o -Phase vermutet, die es nicht ermöglicht, dass die Spitze des *Cantilevers* die komplette Höhendifferenz zwischen gebundenem STxB und der l_o -Phase abbildet.

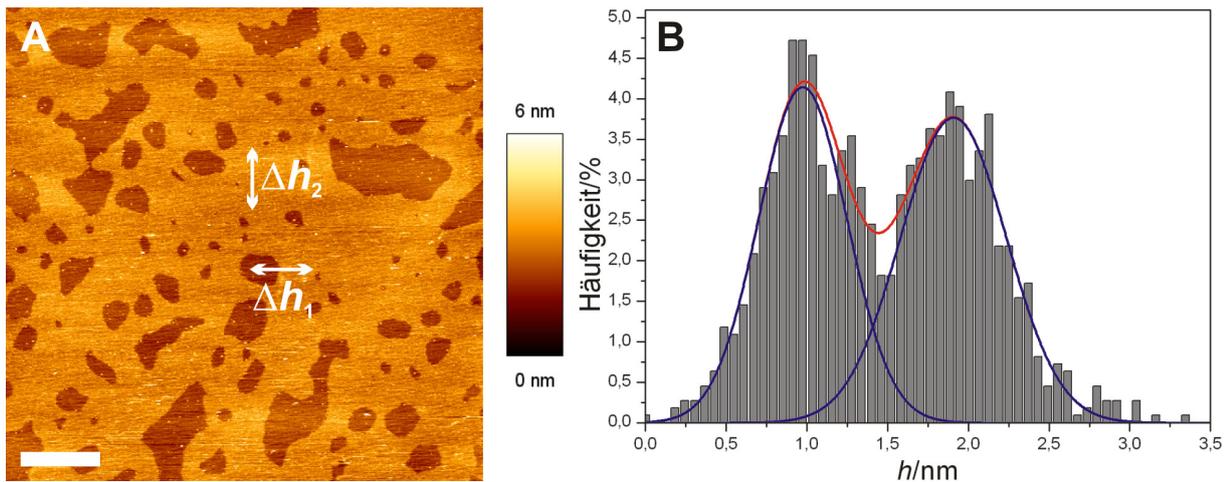


Abb. 4-49: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica nach Bindung von STxB zeigt zwei verschiedene Höhendifferenzen: Δh_1 zwischen l_d -Phase und proteinbedeckter l_o -Phase, sowie Δh_2 zwischen l_o -Phase und proteinbedeckter l_o -Phase. Maßstabsbalken: 5 μ m. (B) Ein exemplarisches Histogramm zeigt die Höhendifferenz Δh_1 zwischen l_d -Phase und proteinbedeckter l_o -Phase von $(0,9 \pm 0,6)$ nm.

4.3.4 Einfluss von Gb₃ mit einer ungesättigten Fettsäure auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium

Die Gb₃-Mischungen, isoliert aus HeLa-Zellen oder Schweine-Erythrozyten, enthalten neben α -hydroxylierten auch gesättigte bzw. ungesättigte Fettsäuren (Kap. 3.1.1). Letztere sind zwar zu geringen Anteilen in beiden Gb₃-Mischungen enthalten (5 % in Gb₃ aus Schweine-Erythrozyten, 1 % in Gb₃ aus HeLa-Zellen), dienen aber als Vergleich für das doppelt-funktionalisierte C_{24} - α -OH- Δ^{15} -Gb₃, das den Hauptanteil in HeLa-Gb₃ bildet.^[100] Zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeit stand diese Verbindung noch nicht zur Verfügung. Daher wurde zunächst der Einfluss einer ungesättigten Fettsäure in Gb₃ untersucht, bei dem die (Z)-Doppelbindung an Position 15 lokalisiert ist (C_{24} - Δ^{15} -Gb₃, Kap. 3.1.1).

In festkörperunterstützten Membranen der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) wurden dazu 5 mol% des Sphingomyelins mit C_{24} - Δ^{15} -Gb₃ substituiert. Die Fluorophore TexasRed DHPE und Perylen wurden zu

jeweils 0,1 und 0,5 mol% zu der Lipidmischung gegeben, um diese fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzaufnahmen von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium zeigen vor Anbindung des STxB eine Phasenseparation in *l_d*- und *l_o*-Phase. Der Fluorophor TexasRed DHPE ist in der *l_d*-Phase angereichert (Abb. 4-50 A) und viele feinverteilte *l_o*-Domänen sind sichtbar, in denen der Fluorophor Perylen angereichert ist (Abb. 4-50 B). Der Overlay beider Fluoreszenzaufnahmen verdeutlicht, dass beide Fluorophore nicht kolokalisiert sind (Abb. 4-50 C).

Nach 1 h Inkubation mit 60 nM STxB und der Entfernung des ungebundenen Proteins durch Spülen mit PBS-Puffer ist keine große Änderung in den Fluoreszenzaufnahmen zu beobachten. Die *l_d*-Phase wird weiterhin durch TexasRed DHPE markiert (Abb. 4-50 D) und Perylen ist in der *l_o*-Phase angereichert (Abb. 4-50 E). Im Overlay zeigt sich, dass beide Fluorophore in unterschiedlichen Domänen angereichert sind (Abb. 4-50 F). Auch die feinverteilten *l_o*-Domänen, die bereits vor STxB-Inkubation beobachtet wurden, sind nach der Proteinbindung erkennbar.

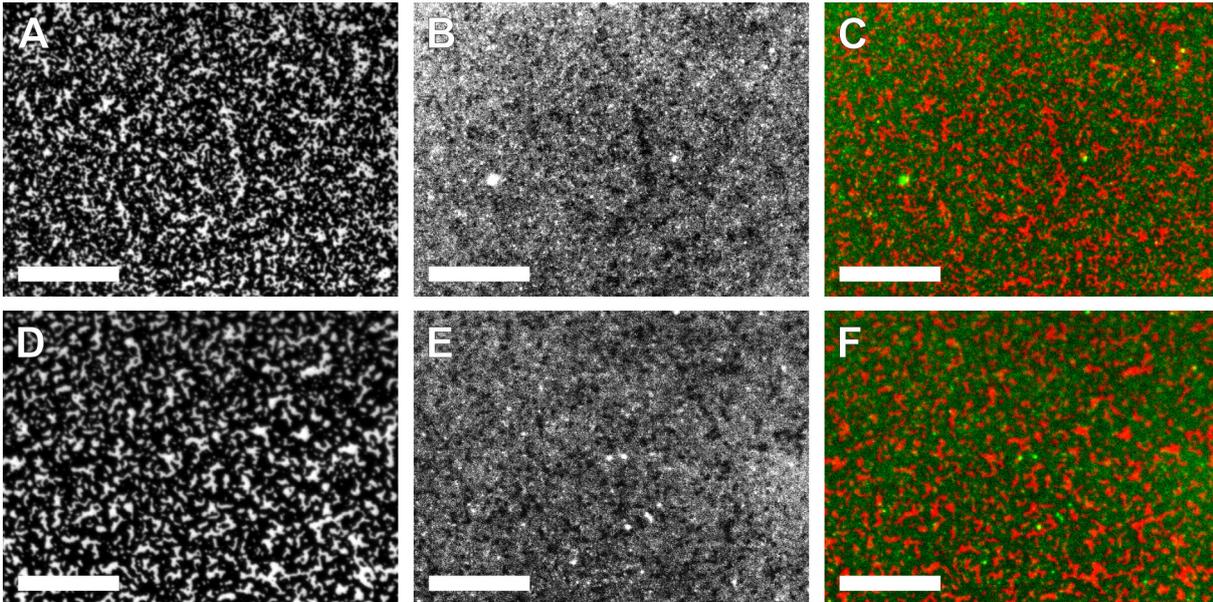


Abb. 4-50: (A) Die TexasRed DHPE-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}-\Delta^{15}-Gb_3$ (40:35:20:5) auf Silizium vor STxB-Bindung zeigt eine Phasenseparation in l_α - (helle Bereiche) und l_β -Phase (schwarze Bereiche). (B) Der Fluorophor Perylen ist in der l_β -Phase (helle Bereiche) angereichert. (C) Der Overlay der Falschfarbenbilder von A und B mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz verdeutlicht, dass beide Fluorophore in verschiedenen Phasen angereichert sind. Nach Proteinbindung markiert (D) TexasRed DHPE die l_α -Phase und (E) Perylen ist weiterhin in der l_β -Phase angereichert. (F) Der Overlay der Falschfarbenbilder von D und E mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz verdeutlicht dies. Maßstabsbalken: 20 μm .

Mit Hilfe des Programms *ImageJ* wurde eine quantitative Pixelanalyse des Anteils der l_β -Phase vor und nach Proteinbindung durchgeführt. Dieser konnte auf einen Wert von $(56 \pm 7) \%$ ($n = 61$) vor STxB-Inkubation bestimmt werden. Der Anteil der l_β -Phase änderte sich nach der Bindung von STxB auf $(60 \pm 7) \%$ ($n = 60$) und blieb damit innerhalb der Fehlergrenzen gleich.

In den Fluoreszenzaufnahmen nach STxB-Bindung war kein direkter Einfluss auf die laterale Organisation der festkörperunterstützten Membranen erkennbar. Daher wurde die Proteinbindung mit fluoreszenzmarkiertem STxB überprüft. Dazu wurden festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}-\Delta^{15}-Gb_3$ (40:35:20:5), dotiert mit 0,1 mol% Oregon

Green DHPE, auf Silizium präpariert und mit Cy3-markiertem STxB inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt.

Die Aufnahme der Oregon Green DHPE-Fluoreszenz zeigt die Phasenseparation der Membran in l_d - (helle Bereiche) und l_o -Phase (dunkle Bereiche in Abb. 4-51 A). Bei der Betrachtung der Cy3-Fluoreszenz wird deutlich, dass das fluoreszenzmarkierte STxB an die l_o -Phase bindet (Abb. 4-51 B). Im Overlay der beiden Fluoreszenzaufnahmen ist erkennbar, dass Oregon Green DHPE und STxB-Cy3 nicht kolokalisiert sind (Abb. 4-51 C).

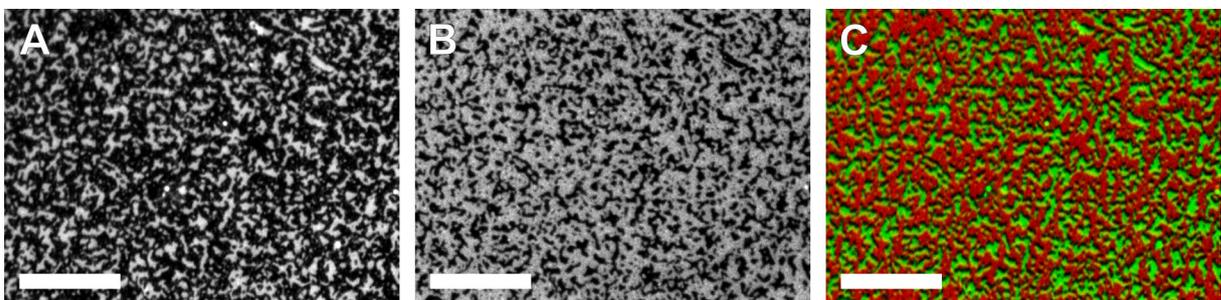


Abb. 4-51: (A) Die Oregon Green DHPE-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ (40:35:20:5) auf Silizium nach Bindung von Cy3-markiertem STxB zeigt eine Phasenseparation in l_d - (helle Bereiche) und l_o -Phase (schwarze Bereiche). (B) STxB-Cy3 bindet an die l_o -Phase. (C) Der Overlay von A und B mit grüner Oregon Green DHPE- und roter STxB-Cy3-Fluoreszenz verdeutlicht dies. Maßstabsbalken: 20 μm .

Die Fluoreszenzaufnahmen bestätigen somit die erfolgreiche Bindung des STxB an $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ in den festkörperunterstützten Membranen auf Silizium. Das Glykosphingolipid $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ muss nach der Proteinbindung in der l_o -Phase lokalisiert sein, da eine ausschließliche Bindung an die l_o -Phase beobachtet wurde.

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen bestätigen die Phasenseparation der Lipidmischung vor der STxB-Inkubation (Abb. 4-52 A). In einer statistischen Höhenbestimmung konnte mittels einer Histogrammanalyse (Abb. 4-52 B) eine Höhendifferenz von $(0,7 \pm 0,5)$ nm ($n = 28$) zwischen der tieferen l_d -Phase (dunkle Bereiche in

Abb. 4-52 A) und der höheren l_o -Phase bestimmt werden (helle Bereiche in Abb. 4-52 A).

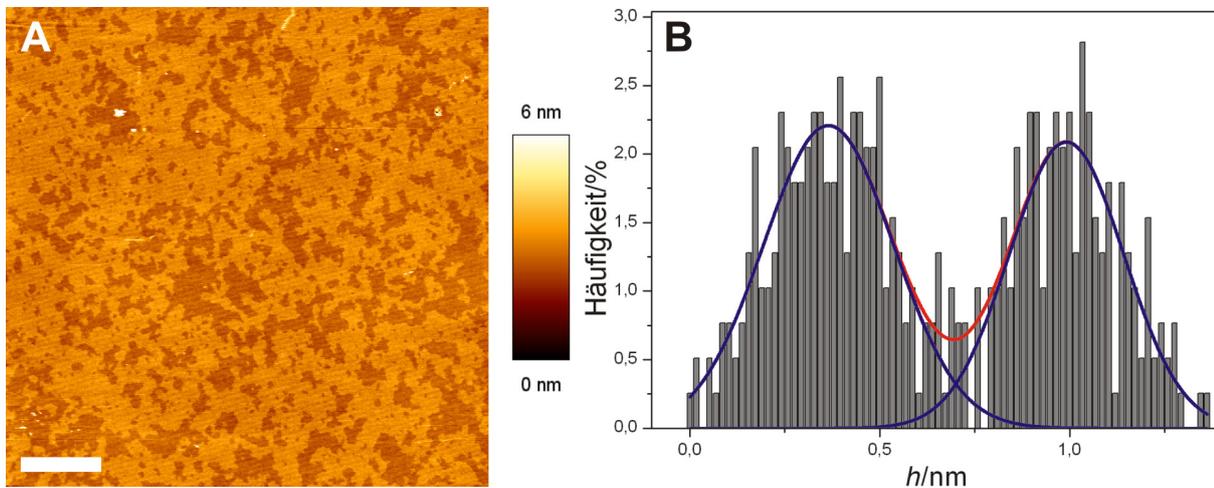


Abb. 4-52: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ (40:35:20:5) auf Silizium vor Bindung von STxB zeigt eine Phasenseparation in l_d - (dunkle Bereiche) und l_o -Phase (helle Bereiche). Maßstab: 5 μm . (B) Ein exemplarisches Histogramm zeigt die Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von $(0,6 \pm 0,3)$ nm.

In den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der festkörperunterstützten Membranen konnte keine Änderung durch die Inkubation mit STxB festgestellt werden (Abb. 4-53 A), analog zu den Ergebnissen der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}\text{-}\alpha\text{-OH-Gb}_3$ (40:35:20:5) auf Silizium in Kap. 4.3.2. Es konnte nur die Höhendifferenz der Phasenseparation zwischen l_d - und l_o -Phase zu $(0,8 \pm 0,5)$ nm ($n = 149$) ermittelt werden (Abb. 4-53 B). Die Bindung des Proteins wurde zwar über das fluoreszenzmarkierte STxB-Cy3 bestätigt, aber in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen konnte keine weitere Höhe gefunden werden.

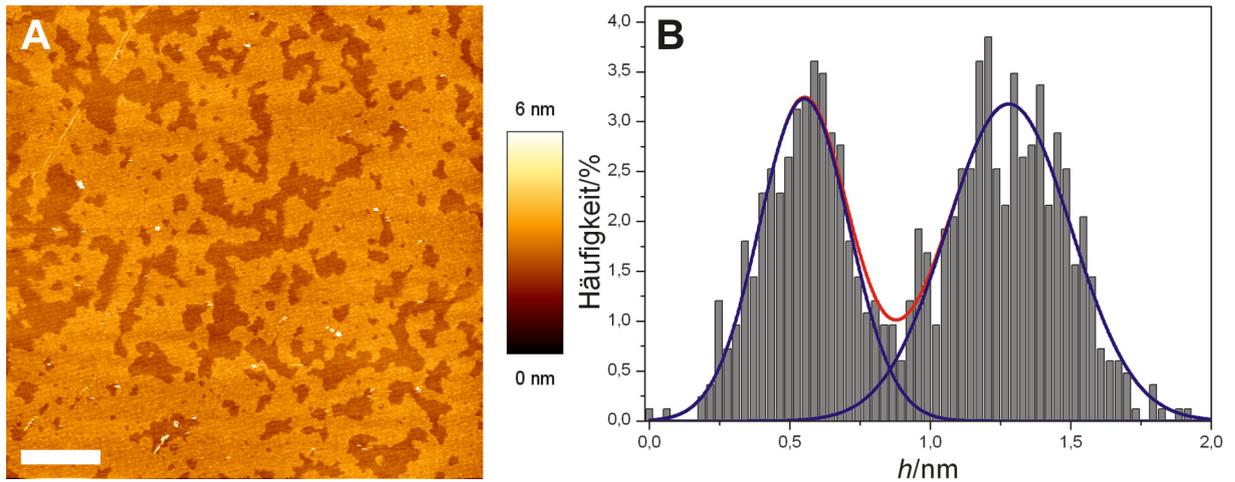


Abb. 4-53: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}-\Delta^{15}$ -Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium nach Bindung von STxB zeigt eine Phasenseparation in l_a - (dunkle Bereiche) und l_o -Phase (helle Bereiche). Maßstab: 5 μ m. (B) Ein exemplarisches Histogramm zeigt die bestimmte Höhendifferenz von $(0,7 \pm 0,4)$ nm.

4.3.5 Einfluss von Gb₃ mit einer ungesättigten Fettsäure auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica

In den Experimenten zur STxB-Bindung an C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃ in festkörperunterstützten Membranen auf Silizium konnte die Proteinbindung nicht mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie bestätigt werden. Daher wurde auch im Falle des ungesättigten C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃ in weiteren Experimenten mit festkörperunterstützten Membranen, präpariert auf dem Substrat Mica (Glimmer), gearbeitet. Zunächst wurden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) hergestellt, in denen 5 mol% des Sphingomyelins mit C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃ substituiert wurden. Diese wurden zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit 0,1 mol% TexasRed DHPE und 0,5 mol% Perylen dotiert.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzaufnahmen von festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica zeigen vor Bindung der Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB) eine Phasenseparation in *l_d*- und *l_o*-Phase. Im Gegensatz zu der α-hydroxylierten Spezies wurden jedoch drei Intensitätsstufen in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz beobachtet: dunkle Bereiche, graue Bereiche und helle Bereiche (Abb. 4-54 A). Die Perylen-Fluoreszenz zeigt ebenfalls drei verschiedene Fluoreszenzintensitäten (Abb. 4-54 B). Bei der Betrachtung des Overlays in Abb. 4-54 C ist erkennbar, dass die Bereiche heller Perylen-Fluoreszenz mit den Bereichen mittlerer TexasRed DHPE-Fluoreszenz überlagern. Umgekehrt sind auch die Bereiche mittlerer Perylen-Fluoreszenz kolokalisiert mit den Bereichen der hellen TexasRed DHPE-Fluoreszenz. Die dunklen Bereiche fallen in beiden Fluoreszenzaufnahmen aufeinander. Diese Beobachtung spricht dafür, dass diese eine sehr geordnete Phase anzeigen, aus der beide Fluorophore ausgeschlossen werden (*l_{o,2}* in Abb. 4-54 A, B). Die beiden helleren Phasen scheinen unterschiedlich dicht gepackt zu sein. Die hellste Phase in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz ist am wenigsten

dicht gepackt, da hier auch nur die mittlere Graustufe in der Perylen-Fluoreszenz auftritt. Sie wird daher der l_d -Phase zugeordnet. Die dritte Phase (mittlere Graustufe in TexasRed DHPE-Fluoreszenz und hellste Phase in Perylen-Fluoreszenz) befindet sich vom Ordnungsgrad der Lipide wahrscheinlich zwischen den bereits erwähnten beiden Phasen ($l_{o,1}$ in Abb. 4-54 A, B). Die hellen weißen Punkte, die in den Overlays gelb erscheinen, werden adsorbiertem Material, wie Vesikeln oder Membranpatches, zugeordnet.

Vor der Bindung von STxB an die festkörperunterstützten Membranen sind deutlich viele feinverteilte Domänen aller drei Phasen sichtbar. Dies ändert sich nach der Inkubation mit 60 nM STxB für 1 h. Die Fluoreszenzaufnahmen beider Fluorophore verdeutlichen eine Kondensation der drei beobachteten Phasen zu jeweils größeren Domänen (Abb. 4-54 D, E). Das Phasenverhalten der eingesetzten Fluorophore hat sich nach der Proteinbindung nicht geändert. Beide Fluorophore zeigen drei unterschiedliche Phasen, deren Zuordnung analog zu der vor Inkubation mit STxB ist (Abb. 4-54 F). Membrandefekte erscheinen in beiden Fluoreszenzaufnahmen und im Overlay als schwarze Strukturen.

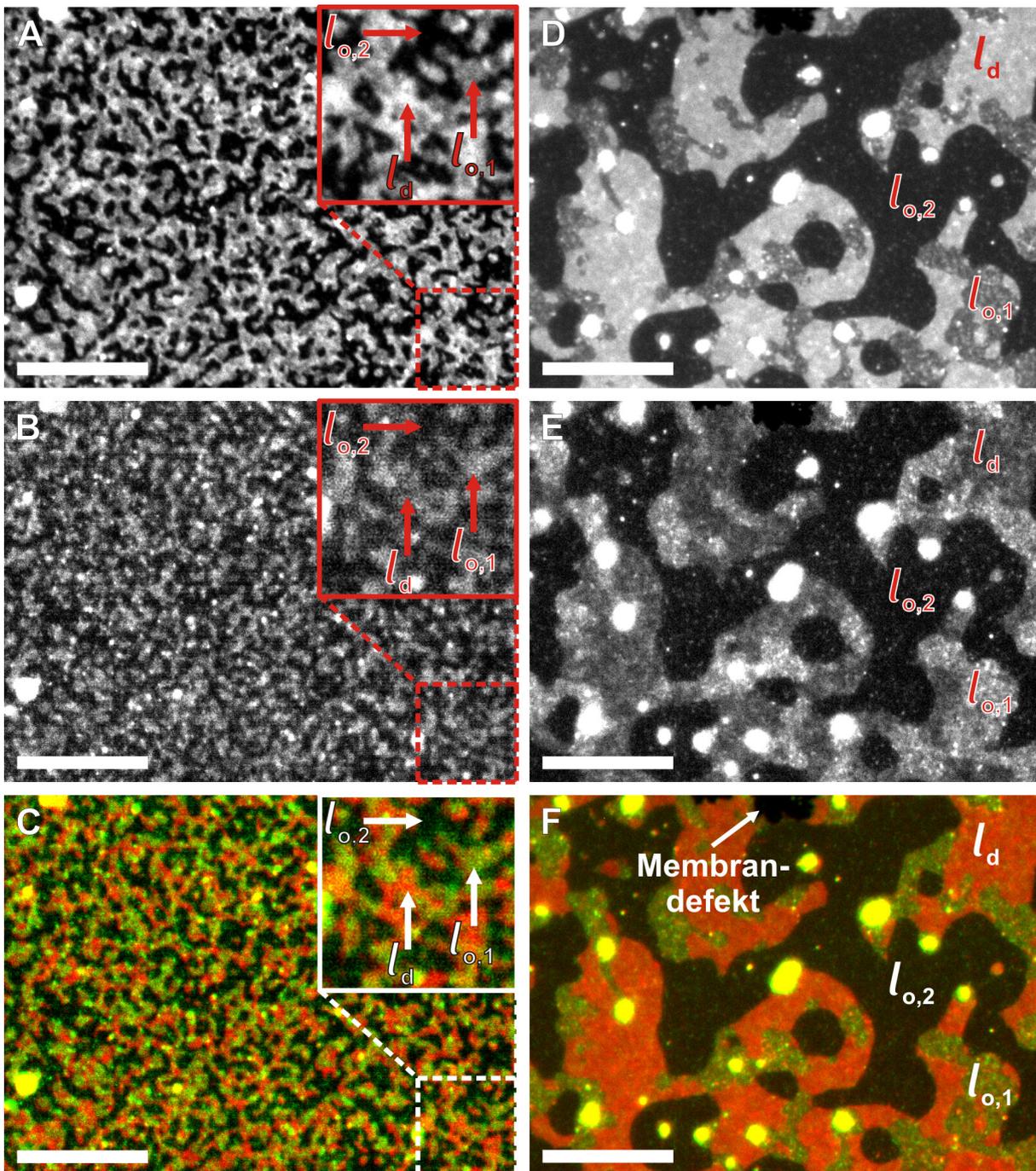


Abb. 4-54: (A) Die TexasRed DHPE-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ (40:35:20:5) auf Mica vor STxB-Bindung zeigt eine Phasenseparation in l_d - (helle Bereiche) und zwei geordnete Phasen (graue und dunkle Bereiche). (B) Der Fluorophor Perylen ist in der geordneten Phase angereichert (helle Bereiche, $l_{o,1}$), die in A grau erscheint. In der l_d -Phase zeigt Perylen eine mittelgraue Intensität und erscheint dunkel in den Bereichen, die in A dunkel erscheinen ($l_{o,2}$). (C) Overlay der Falschfarbenbilder von A und B mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz. Nach STxB-Bindung ändert sich die Verteilung von TexasRed DHPE (D) und Perylen (E) nicht. Eine Kondensation zu größeren Domänen ist erkennbar. (F) Overlay der Falschfarbenbilder von D und E mit roter TexasRed DHPE-Fluoreszenz und grüner Perylen-Fluoreszenz. Maßstabsbalken: 20 μm .

Mit Hilfe des Programms *ImageJ* wurde eine quantitative Pixelanalyse der TexasRed DHPE-Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt und die Anteile der drei Fluoreszenzintensitäten an den festkörperunterstützten Membranen bestimmt (Tab. 4-3).

Tab. 4-3: Übersicht der ermittelten Anteile der jeweiligen TexasRed DHPE-Fluoreszenzintensitäten festkörperunterstützter Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica vor und nach Bindung von STxB.

	dunkle Bereiche/% (<i>l</i>_{0,2})	graue Bereiche/% (<i>l</i>_{0,1})	helle Bereiche/% (<i>l</i>_d)	<i>n</i>
-STxB	41 ± 6	36 ± 8	23 ± 5	43
+STxB	44 ± 8	30 ± 8	27 ± 3	40

Die Ergebnisse der Pixelanalyse zeigen, dass sich die jeweiligen Anteile der drei Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation mit STxB trotz der beobachteten Kondensation zu größeren Domänen (Abb. 4-54 D-F) innerhalb der Fehlergrenzen nicht verändern.

In weiteren Experimenten wurde überprüft, an welche der drei beobachteten Domänen STxB gebunden hat. Dazu wurden festkörperunterstützte Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃ (40:35:20:5) präpariert, die mit 0,1 mol% Bodipy-PC dotiert wurden. Diese wurden anschließend 1 h mit 60 nM Cy3-markiertem STxB inkubiert und ungebundenes Protein durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt.

In der Aufnahme der Bodipy-PC-Fluoreszenz nach Bindung von STxB-Cy3 wird die Ausbildung von drei unterschiedlichen Domänen beobachtet. Die Zuordnung dieser Domänen wurde analog zu den Fluoreszenzaufnahmen der TexasRed DHPE-enthaltenden Membranen (Abb. 4-54) vorgenommen. Bodipy-PC ist in der *l*_d-Phase angereichert (hellgrüne Bereiche) und zwei dunkelgrüne Phasen können beobachtet werden. Die mittelgrünen Bereiche werden der *l*_{0,1}-Phase zugeordnet und die dunkelgrünen Bereiche der vermutlich stärker geordneten *l*_{0,2}-Phase. Die Perylen-Fluoreszenz zeigt die Anreicherung des Fluorophors in der Phase, die in der Bodipy-

PC-Fluoreszenz mittelgrün erscheint und der $l_{o,1}$ -Phase zugeordnet wurde. In den anderen beiden Phasen (l_d und $l_{o,2}$) kann ein dunkles Blau beobachtet werden. Die Aufnahme der Cy3-Fluoreszenz zeigt, dass das fluoreszenzmarkierte STxB nur an eine der beiden l_o -Phasen bindet (Abb. 4-55 C). Im Overlay wird deutlich, dass STxB an die $l_{o,2}$ -Phase bindet (Abb. 4-55 D). Die hellen Punkte, die in allen drei Fluoreszenzkanälen erscheinen und im Overlay weiß dargestellt sind, können adsorbierten Vesikeln oder Membranpatches zugeordnet werden.

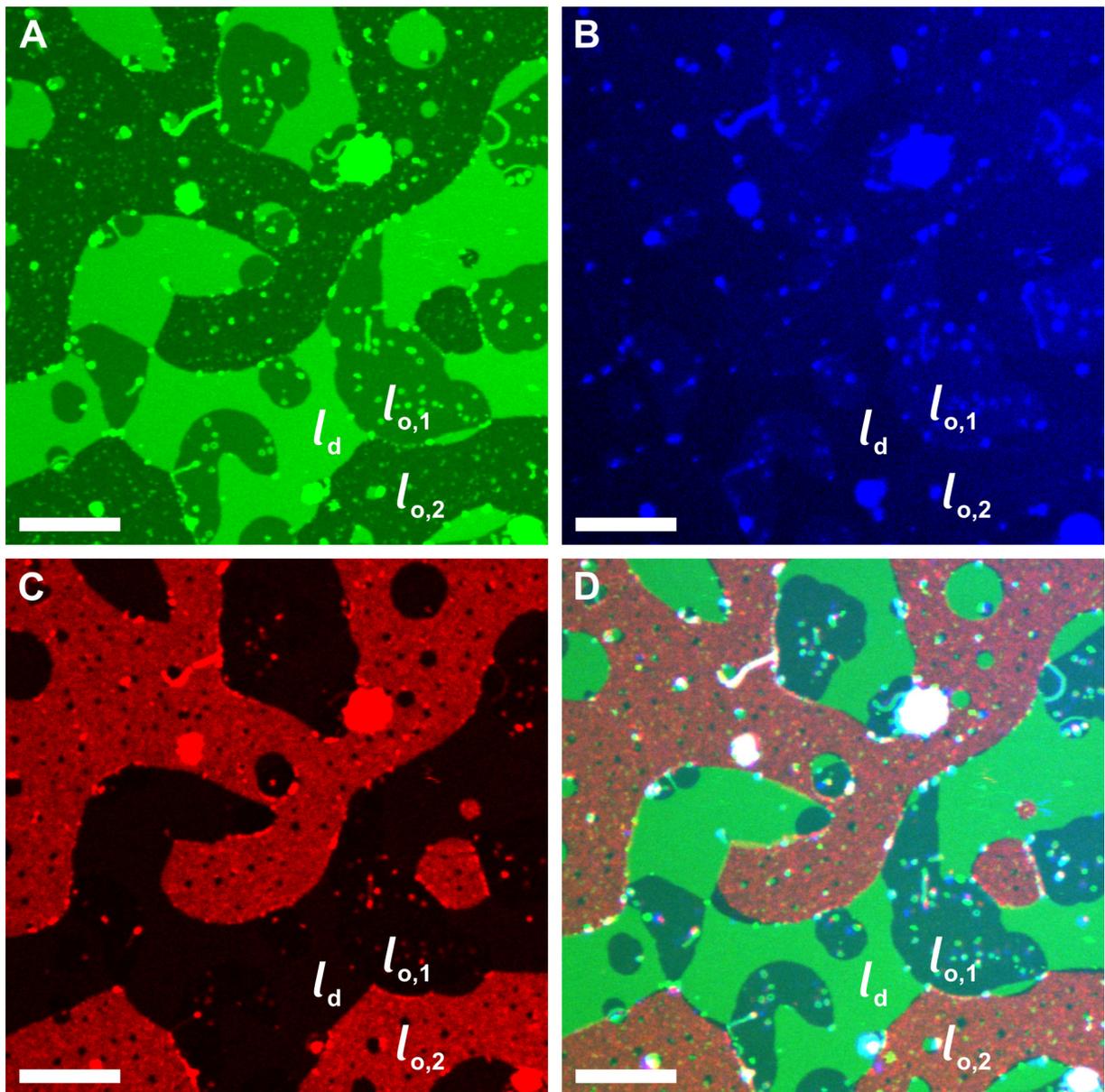


Abb. 4-55: (A) Die Bodipy-PC-Fluoreszenzaufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ (40:35:20:5) auf Mica nach Bindung von Cy3-markiertem STxB zeigt eine Phasenseparation in l_d - (hellgrüne Bereiche) und zwei geordnete Phasen (dunkelgrüne Bereiche, $l_{o,1}$ und $l_{o,2}$). (B) Perylen ist in der $l_{o,1}$ -Phase angereichert und erscheint dunkelblau in den beiden anderen Phasen (l_d und $l_{o,2}$). (C) STxB-Cy3 bindet nur an die $l_{o,2}$ -Phase. (D) Overlay der Fluoreszenzaufnahmen aus A, B und C. Maßstabsbalken: 10 μm .

Die Fluoreszenzaufnahmen nach Inkubation mit Cy3-markiertem STxB verdeutlichen, dass in der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ (40:35:20:5) zwei geordnete Phasen auftreten, von denen eine mit $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ angereichert zu sein scheint. Bei der Betrachtung der STxB-Cy3-Fluoreszenz wird deutlich,

dass die $l_{0,2}$ -Phase mit $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ angereichert sein muss, da das Protein nur an diese bindet.

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe von rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen wurde das Phasenverhalten der $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ -enthaltenden Membranen vor der STxB-Inkubation genauer analysiert. Es konnten drei verschiedene Höhen ermittelt werden (markiert in Abb. 4-56 A). Eine genaue Herausarbeitung der Höhendifferenzen gestaltete sich schwierig aufgrund der schlechten Abbildbarkeit der Proben. So konnte in einer statistischen Höhenbestimmung mittels einer Histogrammanalyse (Abb. 4-56 B) nur eine Höhendifferenz von $(1,2 \pm 0,7)$ nm ($n = 65$) zwischen der tieferen ungeordneten Phase (Bereich 1 in Abb. 4-56 A) und einer der höheren geordneten Phase bestimmt werden (Bereich 2 bzw. 3 in Abb. 4-56 A). Diese etwas größere Höhendifferenz, im Vergleich zu der erwarteten Differenz von 0,8 bis 1,0 nm, lässt sich vermutlich auf den Höhenunterschied zwischen der l_d -Phase und den beiden geordneten Phasen zurückführen, die in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachtet wurden (Abb. 4-54). Eine genaue Höhendifferenz zwischen den beiden geordneten Phasen konnte nicht ermittelt werden.

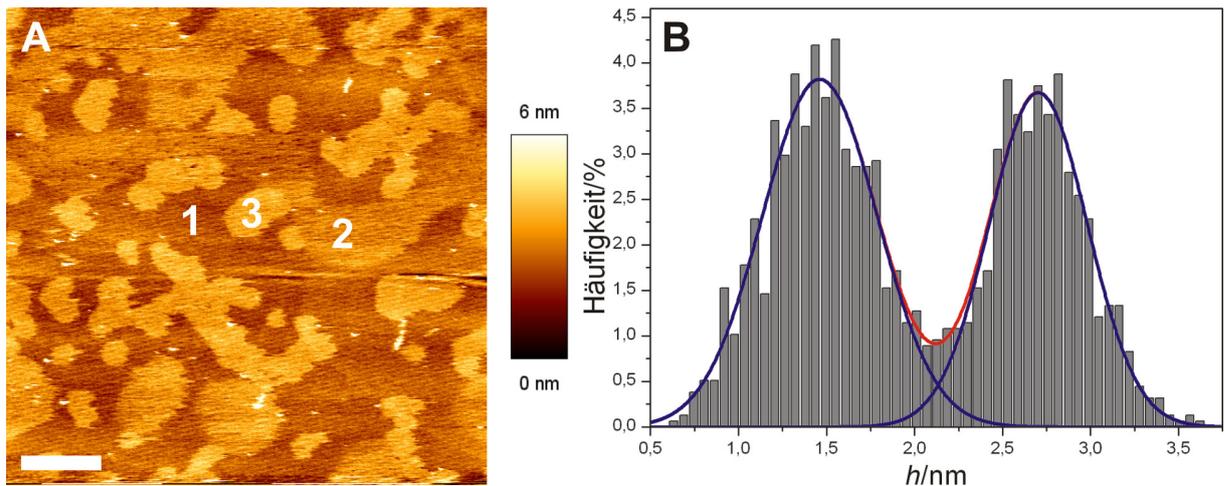


Abb. 4-56: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ (40:35:20:5) auf Mica vor STxB-Bindung zeigt eine Phasenseparation in l_d - (dunkle Bereiche, gekennzeichnet mit 1) und zwei geordnete Phasen (hellere Bereiche, gekennzeichnet mit 2 und 3). Maßstabsbalken: 5 μm . (B) Ein exemplarisches Histogramm zeigt die Höhendifferenz zwischen der l_d -Phase und den zwei geordneten Phasen von $(1,2 \pm 0,6)$ nm.

Nach der STxB-Bindung wurde in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen eine Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von $(1,3 \pm 0,9)$ nm ($n = 10$) beobachtet (Δh_1 in Abb. 4-57). Dieser Wert liegt im selben Fehlerbereich wie der ermittelte Wert aus den Aufnahmen vor der Inkubation mit STxB. Mit Hilfe der Histogrammanalyse konnte der Höhenunterschied zwischen der proteinbedeckten l_o -Phase und der zweiten geordneten Phase zu $(1,9 \pm 1,8)$ nm ($n = 11$) ermittelt werden (Δh_2 in Abb. 4-53). Die Höhendifferenz von proteinbedeckter l_o -Phase zur l_d -Phase konnte auf einen Wert von $(2,5 \pm 1,8)$ nm ($n = 21$) bestimmt werden (Δh_3 in Abb. 4-53).

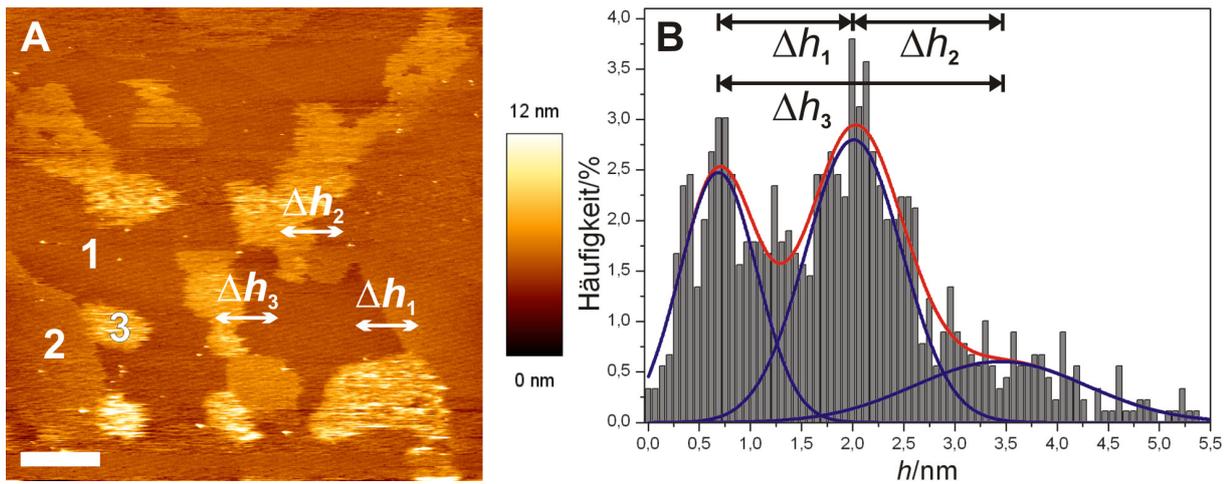


Abb. 4-57: (A) Die topographische AFM-Aufnahme einer festkörperunterstützten Membran der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄-Δ¹⁵-Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica nach STxB-Bindung zeigt eine Phasenseparation in *l_a*-(dunkle Bereiche, gekennzeichnet mit 1) und eine proteinunbedeckte *l_o*-Phase (mittlere Bereiche, gekennzeichnet mit 2), sowie eine proteinbedeckte *l_o*-Phase (helle Bereiche, gekennzeichnet mit 3). Maßstabsbalken: 5 μm. (B) Ein exemplarisches Histogramm zeigt die drei bestimmten Höhendifferenzen von $\Delta h_1 = (1,3 \pm 0,8)$ nm, $\Delta h_2 = (1,4 \pm 1,3)$ nm und $\Delta h_3 = (2,8 \pm 1,2)$ nm.

5 Diskussion

5.1 Porenüberspannende Membranen als Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran

In der zellulären Plasmamembran eukaryotischer, tierischer Zellen wird die Existenz von Nanodomänen, sogenannten *Lipid Rafts*, postuliert, die an vielfältigen Prozessen wie Signaltransduktion, intrazellulärem Transport und Proteinsortierung beteiligt sind. Es wird vermutet, dass diese mit Sphingolipiden und Cholesterin angereichert sind und Größen im Bereich von 20 bis 200 nm aufweisen. Bisher wurde versucht, über indirekte Methoden, wie z. B. Extraktionsexperimente mit kalten Detergenzien, die genaue Zusammensetzung dieser Membranfraktionen zu bestimmen, jedoch konnten keine Membrannanodomänen innerhalb von zellulären Membranen direkt visualisiert werden. Somit steht ein direkter Beweis für die Existenz der *Lipid Rafts* noch aus.

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der lateralen Organisation von zellulären Membranen ist die Verwendung von artifiziellen Modellmembranen. Dazu wurden Lipidsysteme entwickelt, deren Verhalten in Membranen die Eigenschaften der zellulären Plasmamembran simulieren sollen. Eine oft verwendete Lipidmischung in diesem Zusammenhang ist das ternäre System DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20). Bei Raumtemperatur zeigen artifizielle Membranen dieser Zusammensetzung eine Phasenseparation in eine DOPC-angereicherte *liquid-disordered* (l_a)-Phase und eine Sphingomyelin- und Cholesterin-angereicherte *liquid-ordered* (l_o)-Phase. Der l_o -Phase werden ähnliche Eigenschaften wie den postulierten *Lipid Rafts* zugeschrieben.^[12, 95, 152]

5.1.1 Das Phasenverhalten von Membranen der untersuchten Lipidmischung

Zunächst wurden Riesenvesikel (engl. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUVs) der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) präpariert. Das Globotriaosylceramid Gb₃ wurde inkorporiert, da es der zelluläre Rezeptor für die Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB) ist. Die Bindung von STxB an Gb₃ wird in Kap. 5.1.6 diskutiert. Das Glykosphingolipid Gb₃ (Kap. 3.1.1) besitzt, wie Sphingomyelin, ein Sphingosin-Grundgerüst, durch das es in der Lage ist, Wasserstoffbrücken mit Cholesterin auszubilden. Aufgrund dieser Eigenschaft wird vermutet, dass auch Glykosphingolipide in *Lipid Rafts* angereichert sind.^[4, 96, 137, 138] Wurden 5 mol% des Sphingomyelins durch Gb₃ substituiert, so konnte keine Änderung des Phasenverhaltens der Membranen, auf das im Folgenden eingegangen werden soll, beobachtet werden, wie Safouane *et al.*^[141] in GUVs ebenfalls zeigten.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der GUVs zeigten mikrometergroße *l_o*-Domänen (Kap. 4.1.1), wie sie auch in den Untersuchungen von Veatch *et al.*^[29-31, 153] und Safouane *et al.*^[141] beobachtet wurden. In der zellulären Plasmamembran werden hingegen geordnete Domänen im Nanometerbereich vermutet.^[5, 9, 11, 12] In GUVs kann die Kondensation zu größeren Domänen durch die auftretende Linienenergie an den Domänenrändern erklärt werden. Diese tritt aufgrund des *Hydrophobic Mismatch* an Bereichen unterschiedlicher Zusammensetzung auf (Abb. 5-1 A). Die langgestreckten Fettsäureketten in den geordneten *l_o*-Domänen führen zu einer dichteren Packung der Lipide, die eine Erhöhung der Membrandicke in diesen Bereichen zur Folge hat. Dadurch kommen die hydrophoben Fettsäureketten an den Rändern der *l_o*-Domänen mit Wassermolekülen in Kontakt, was energetisch ungünstig ist. Als Folge dessen wird die Lipidmonoschicht deformiert und es baut sich eine Linienspannung am Domänenrand auf (Abb. 5-1 B).^[37-40]

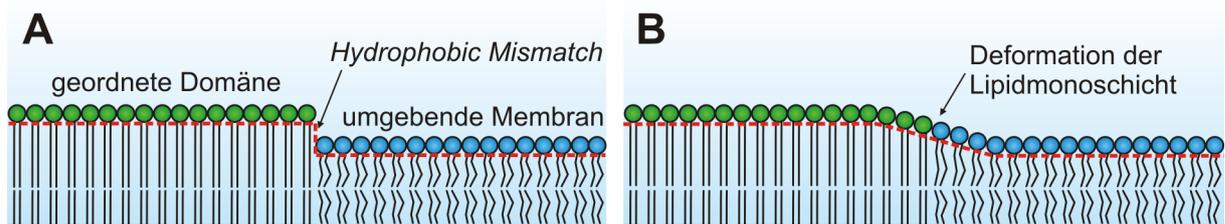


Abb. 5-1: Schematische Darstellung der Grenze zwischen einer geordneten Domäne und der umgebenden Membran. (A) Die Lipide sind in geordneten Domänen dichter gepackt und die Membrandicke ist erhöht. Dadurch kommen die hydrophoben Fettsäureketten am Domänenrand mit Wassermolekülen in Kontakt, was energetisch ungünstig ist. (B) Die Lipidmonoschicht wird am Domänenrand deformiert und es tritt eine Linienspannung am Randbereich auf. Abbildung nach Kuzmin *et al.*^[37]

Zur Erniedrigung dieser Linienergie nehmen koexistierende Domänen eine Kreisform an, da ein Kreis bei konstanter Fläche die geringste Grenzlinie aufweist. Eine Kondensation zu größeren Domänen lässt sich dadurch ebenfalls erklären. Zur Minimierung der Linienergie aller beobachteten Domänen eines GUVs bilden diese eine größere Domäne, die insgesamt eine geringere Grenzlinie besitzt als viele kleine Domänen. Dies kann zur Bildung von GUVs mit genau einer l_o - und einer l_d -Domäne führen, wie sie von Veatch *et al.* in Vesikeln der Zusammensetzung POPC/Sphingomyelin/Cholesterin (27:53:20) beobachtet wurden.^[31] Auch Kahya *et al.* präparierten GUVs ähnlicher Zusammensetzung und erhielten l_o -Domänen mit Durchmessern zwischen 1 und 10 μm bis hin zu Domänen, die die Hälfte von 20 μm großen GUVs bedeckten.^[90]

Zur Visualisierung der Membranen wurden die Fluorophore Bodipy-PC und Perylen eingesetzt. Bodipy-PC zeigt eine bevorzugte Anreicherung in der l_d -Phase, wie sie in GUVs der Zusammensetzung DLPC/DPPC/Cholesterin von Korlach *et al.*^[154] und DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin von Baumgart *et al.*^[33] beobachtet wurde. Auf Grundlage dieses bekannten Verteilungsverhaltens konnte in allen weiteren Experimenten die l_d -Phase anhand der Bodipy-PC-Fluoreszenz zugeordnet werden. In GUVs und porenüberspannenden Membranen wurde eine Gleichverteilung des Fluorophors Perylen in der l_d - und der l_o -Phase beobachtet (Kap. 4.1.1 bzw. Kap. 4.2.1). Ein analoges Verhalten für Perylen zeigten Baumgart *et al.* in GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin.^[33] Sowohl in der vorliegenden Arbeit als

auch in den Experimenten von Baumgart *et al.* wurde Sphingomyelin, isoliert aus Rinderhirn (*brain*-Sphingomyelin, *brain*-SM) verwendet. Bei Verwendung von aus Eiern isoliertem Sphingomyelin (*egg*-Sphingomyelin, *egg*-SM) anstatt *brain*-Sphingomyelin zeigte Perylen eine selektive Anreicherung in der l_o -Phase von GUVs, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin.^[102] In festkörperunterstützten Membranen (engl. *Solid Supported Membranes*, SSMs) wurde in dieser Arbeit, im Vergleich zu GUVs, ein abweichendes Verhalten beobachtet. Membranen der Zusammensetzung DOPC/*brain*-Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) (Kap. 4.2.3) und DOPC/*brain*-Sphingomyelin/Cholesterin/G_{M1} (40:39:20:1) (Kap. 4.2.6) auf Silizium zeigten die selektive Anreicherung von Perylen in der l_o -Phase. Ein ähnliches Verhalten konnten Windschiegl *et al.* in SSMs der Gb₃-enthaltenden Lipidmischung auf Mica beobachten.^[67] Dies lässt auf einen Einfluss des Substrats auf die Verteilung der Fluorophore in festkörperunterstützten Membranen schließen. Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass die Verteilung der eingesetzten Fluorophore Bodipy-PC und Perylen in GUVs und porenüberspannenden Membranen ähnlich ist, obwohl deren Geometrie sehr unterschiedlich ist.

5.1.2 Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) in porenüberspannenden Membranen

Nach der Analyse der Verteilung der eingesetzten Fluorophore wurde bestätigt, dass im Falle der porenüberspannenden Membranen eine Phasenseparation in l_a - und l_o -Phase vorliegt. Einen ersten Hinweis, dass die in der Bodipy-PC-Fluoreszenz beobachteten dunklen Domänen der l_o -Phase zugeordnet werden können und nicht der Gelphase (S_o -Phase, Kap. 1.2.1), zeigt die kreisrunde Domänenform an. Fluide Domänen besitzen aufgrund der Minimierung der Linienenergie, die an den Domänenrändern auftritt, bevorzugt eine runde Form, wenn sich die Lipidmischung nicht an einem kritischen Punkt, wie z. B. in der Nähe des Phasenübergangs, befindet.^[31] Im Gegensatz dazu zeigen Gelphasen-Domänen in GUVs je nach Größe des auftretenden

den *Hydrophobic Mismatch* zwischen den beiden Phasen irreguläre Formen, beispielsweise eine dendritische Form.^[155]

Bei Erhöhung der Temperatur über die Phasenumwandlungstemperatur der Lipidmischung T_m von 37 °C^[29], zeigt die homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz, dass die porenüberspannenden Membranen in der l_a -Phase vorliegen. Nach Abkühlen unterhalb der Umwandlungstemperatur T_m wurde wiederum eine Phasenseparation in l_d - und l_o -Phase beobachtet (Kap. 4.2.3). Ein ähnliches Verhalten konnte auch von Veatch *et al.* an GUVs, zusammengesetzt aus ähnlichen Lipidmischungen^[29-31], und von Samsonov *et al.* in planaren, freitragenden Membranen (engl. *Black Lipid Membranes*, BLMs) beobachtet werden.^[7] Das temperaturabhängige Verhalten bestätigt somit, dass eine Phasenseparation in l_a/l_o -Phase in den porenüberspannenden Membranen vorliegt.

Ein weiterer Beweis wurde durch die Modulation des Cholesteringehaltes mittels Methyl- β -Cyclodextrin ($m\beta$ CD) in porenüberspannenden Membranen erbracht. Zunächst wurde die optimale Konzentration zur selektiven Cholesterin-Extraktion in festkörperunterstützten Membranen und an GUVs bestimmt (Kap. 4.2.3). In Übereinstimmung mit der Literatur^[117] konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit niedrigen $m\beta$ CD-Konzentrationen (bis max. 1 mM) bei kurzen Inkubationszeiten (30 min) zur Reduzierung des Cholesteringehaltes sowohl in SSMs und GUVs als auch in porenüberspannenden Membranen führte. Nach der selektiven Entfernung des Cholesterins wurden eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz und keine dunklen l_o -Domänen mehr beobachtet (Abb. 5-2). Dies lässt darauf schließen, dass die Membran nur noch in der l_a -Phase vorliegt.

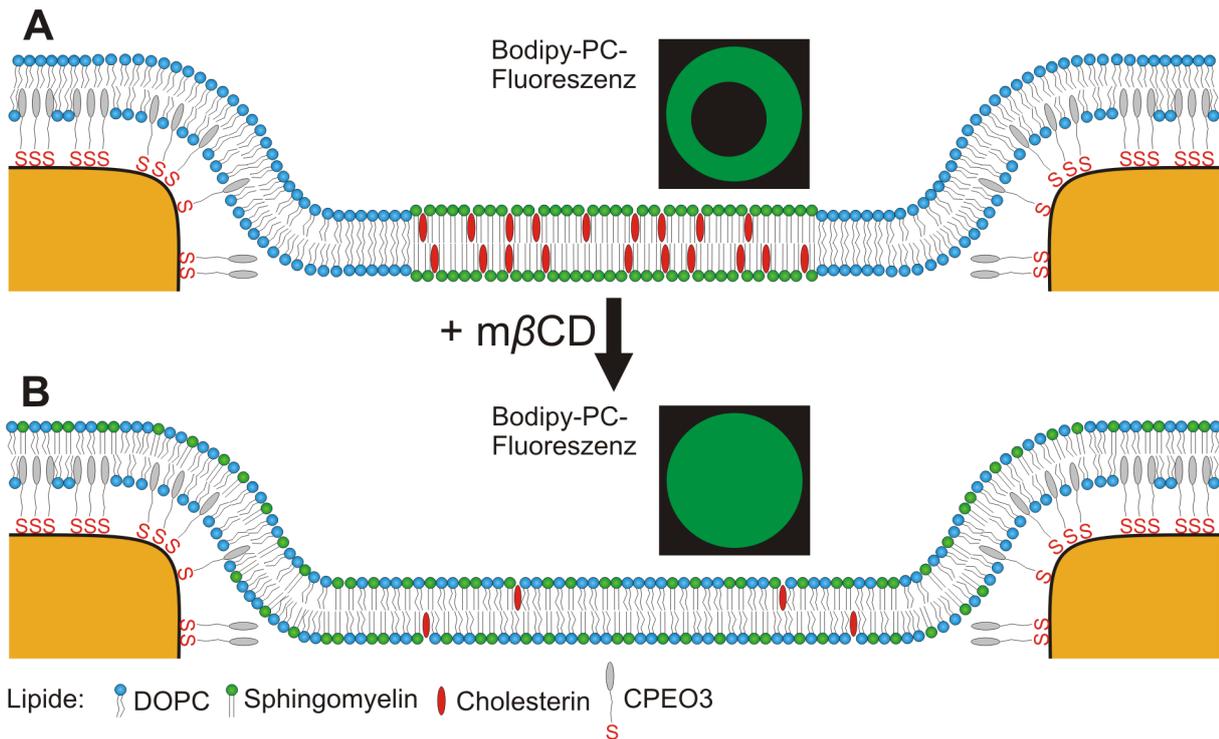


Abb. 5-2: Schematische Darstellung der Cholesterinextraktion mittels Methyl- β -Cyclodextrin ($m\beta$ CD) in porenüberspannenden Membranen. (A) Nach dem Spreiten von GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) werden porenüberspannende Membranen erhalten, die Sphingomyelin- und Cholesterin-angereicherte $l\beta$ -Domänen ausbilden, sichtbar als dunkle Bereiche in der Bodipy-PC-Fluoreszenz. (B) Nach der selektiven Cholesterinextraktion mittels $m\beta$ CD sind die verbleibenden Membranbestandteile vollständig mischbar und bilden nur noch eine $l\alpha$ -Phase aus. Die Bodipy-PC-Fluoreszenz erscheint homogen.

Der genaue Anteil des extrahierten Cholesterins konnte in den Experimenten nicht ermittelt werden. In Experimenten an Zellen konnte, je nach untersuchtem Zelltyp, eine Reduzierung des Cholesteringehaltes zwischen 30 und 100 % beobachtet werden. Eine Übersicht dazu ist in dem zusammenfassenden Artikel von Zidovetzki *et al.* zu finden.^[117] In großen, unilamellaren Vesikeln (engl. *Large Unilamellar Vesicles*, LUVs), zusammengesetzt aus unterschiedlichen Anteilen DOPC, Sphingomyelin und Cholesterin, konnten Beseničar *et al.* mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Experimenten (engl. *Surface Plasmon Resonance*, SPR) zeigen, dass die Cholesterinextraktion von der Sphingomyelin-Konzentration abhängig ist und bei Raumtemperatur in einem Bereich von 0 bis 80 % liegt.^[156] Hohe Sphingomyelin-Konzentrationen führten zu einer langsameren Cholesterinextraktion, die auf eine höhere Affinität von Cholesterin zu Sphingomyelin im Vergleich zu Phosphatidylcholinen zurückge-

führt wurde.^[156, 157] Die SPR-Experimente von Beseničar *et al.* an LUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) zeigten nach 30-minütiger Inkubation mit 0,5 mM m β CD die Reduzierung des Cholesteringehaltes um ca. 10 %.^[156] Daraus ergibt sich eine Veränderung der molekularen Zusammensetzung der Lipidmischung auf das Verhältnis DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (41:41:18). Bei der Betrachtung des ternären Phasendiagramms (Kap. 1.2.1) wird deutlich, dass bei dieser Zusammensetzung weiterhin eine l_d - und eine l_o -Phase bei Raumtemperatur koexistieren. In den Experimenten an porenüberspannenden Membranen wurden auch nach 30-minütiger Inkubation mit 0,5 mM m β CD weiterhin l_o -Domänen beobachtet (Kap. 4.2.3). Aber bereits die Erhöhung der m β CD-Konzentration auf 1,0 mM reichte aus, so viel Cholesterin zu extrahieren, dass die verbleibenden Membranbestandteile keine l_o -Phase mehr ausbilden konnten.

Eine erhöhte m β CD-Konzentration wurde in den Experimenten an porenüberspannenden Membranen nicht eingesetzt, da bereits bei Inkubation mit 1,0 mM m β CD ein Reißen einzelner porenüberspannender Membranen beobachtet wurde (Kap. 4.2.3). Dies ist vermutlich auf die Vorspannung der lösungsmittelfreien, porenüberspannenden Membranen, wie sie auf CPEO3-funktionalisierten Substraten^[48] beobachtet wird, zurückzuführen. Sie resultiert aus einer starken Adhäsion der Membran an die Porenstege. Durch das selektive Entfernen des Cholesterins wird die Dichte der Lipide geringer, sodass die Spannung in der Membran weiter ansteigt. Somit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass porenüberspannende Membranen reißen können. In festkörperunterstützten Membranen dagegen entstehen stabile Membrandefekte nach m β CD-Inkubation, was auf eine reduzierte Mobilität der Lipide in SSMs zurückgeführt werden kann.^[35]

Mit Hilfe der Cholesterinextraktion durch m β CD konnte somit ein weiterer Beweis für die Phasenseparation in l_d -/ l_o -Phase porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) erbracht werden. Eine weitere Methode zur Untersuchung der Cholesterin-Sphingomyelin-Interaktion und damit der Bestätigung einer Phasenseparation in artifiziellen Membranen ist die Oxidation des Cholesterins mittels des Enzyms Cholesterin-Oxidase (COase). Als

Produkt dieser Reaktion entsteht Cholest-4-en-3-on, welches nicht mehr in der Lage ist, Wasserstoffbrücken zu Sphingomyelin auszubilden. In artifiziellen Membranen führte dies zum Verschwinden einer Phasenseparation.^[7] Auch in Zellen konnte eine cholesterinabhängige gehinderte Sphingomyelin-Diffusion beobachtet werden, die nach der Cholesterinoxidation nicht mehr auftrat.^[13, 27]

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt die Phasenseparation der untersuchten Lipidmischung in eine l_d - und eine l_o -Phase mittels der Domänenform, der Temperaturvariation und der Cholesterinextraktion bestätigt werden. Die angewandten Methoden zeigen, dass das Phasenverhalten der freistehenden Bereiche porenüberspannender Membranen identisch zu dem Verhalten in GUVs ist. Über das Phasenverhalten der Membranbereiche auf den Porenstegen kann aufgrund der fluoreszenzlöschenden Eigenschaften der aufgetragenen Goldschicht keine Aussage getroffen werden. Dass diese aber einen Einfluss auf die l_o -Domänen und deren laterale Beweglichkeit hat, soll in Kap. 5.1.4 diskutiert werden.

5.1.3 l_o -Domänengröße in porenüberspannenden Membranen

Die beobachteten Größen der l_o -Domänen porenüberspannender Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) sind signifikant kleiner als die Domänengrößen, die in den zur Präparation genutzten GUVs vorlagen. Der relative Anteil der l_o -Domänen an den porenüberspannenden Membranbereichen wurde in den drei untersuchten Substraten mit Porengrößen von 0,8 bis 2,0 μm auf Werte zwischen $(20 \pm 11) \%$ und $(29 \pm 22) \%$ bestimmt. Aus den absoluten Werten der l_o -Domänenflächen kann unter der Annahme, dass die Domänen eine Kreisform annehmen, deren Durchmesser berechnet werden. Im Falle der Substrate mit 2,0 μm Porendurchmesser wurde ein durchschnittlicher Domänendurchmesser von 1,1 μm erhalten. Substrate mit 1,2 μm Porendurchmesser ergaben durchschnittliche l_o -Domänendurchmesser von 0,6 μm , und in Substraten mit 0,8 μm Porendurchmesser wurden l_o -Domänen mit durchschnittlich 0,4 μm Durchmesser erhalten. Bei der Betrachtung dieser Werte wird deutlich, dass die Porengröße des un-

terliegenden Substrats einen Einfluss auf die absolute Größe der *l_o*-Domänen hat. Ein ähnlicher Effekt wurde ebenfalls von Ehrig *et al.* in Monte Carlo-Simulationen gezeigt.^[158] Sie simulierten das Phasenverhalten einer DMPC/DSPC-Lipidmischung, die bei 37 °C phasensepariert in Gel- und fluider Phase vorliegt. Ohne einen externen Einfluss bildeten sich runde Domänen, deren Wachstum durch die Minimierung der Linienenergie induziert wird. Simulierten sie die Phasenseparation der Lipidmischung in Anwesenheit eines unterliegenden Zytoskeletts mit einer Maschenweite von 53 nm, so führte diese Interaktion zur Bildung vieler Nanodomänen. Das unterliegende Netzwerk verhinderte eine Kondensation zu größeren Domänen, die andernfalls energetisch bevorzugt wäre. Weiterhin wurde die Stärke der Zytoskelett-Membran-Wechselwirkung variiert, indem die Zahl der Anknüpfungspunkte zwischen Zytoskelett und Membran verändert wurde. Eine Abschwächung der Zytoskelett-Membran-Interaktion führte wieder zur Bildung von größeren Domänen.^[158] Daraus wird ersichtlich, dass das zelluläre Zytoskelett die laterale Organisation der Plasmamembran stark beeinflussen kann. Somit zeigen die Monte Carlo-Simulationen einen ersten Ansatz, wie Nanodomänen in der zellulären Plasmamembran entstehen können. Die Betrachtung der Phasenseparation in porenüberspannenden Membranen verdeutlicht, dass es in artifiziellen Membranen möglich ist, die Domänengröße selektiv zu beeinflussen, indem die Porengröße des unterliegenden Substrats verändert wird. Die eingesetzten Substrate wiesen Porengrößen zwischen 0,45 und 2,0 µm auf. Die durchschnittliche Maschenweite eines aus Aktinfilamenten gebildeten Netzwerks liegt im Bereich von 100 nm bis 1 µm^[26], sodass die gewählten porösen Substrate ein geeignetes Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran darstellen. Die Anknüpfungspunkte sind hierbei die Cholesteryleinheiten der CPEO3-Moleküle, die eine ähnliche Verankerung simulieren, wie die Bindung des Zytoskeletts an Lipide in der zellulären Plasmamembran (Abb. 1-3 A) oder die Verknüpfung über membranassoziierte Proteine (Abb. 1-3 D). Die Oberflächenbelegung des CPEO3 auf den goldbeschichteten Porenstegen beträgt ca. 65 %, wie Yang *et al.* mittels Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) zeigten^[159] und von Williams *et al.* mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. *X-ray Photo-*

electron Spectroscopy, XPS) bestätigt wurde.^[160] Hier wäre es für zukünftige Studien interessant, den Einfluss der Anzahl der Anknüpfungspunkte im System der porenüberspannenden Membranen zu untersuchen und das Phasenverhalten mit den Simulationen von Ehrig *et al.*^[158] zu korrelieren. Eine Möglichkeit wäre die Inkubation der goldbeschichteten porösen Substrate mit CPEO3/Mercaptohexanol-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung. Eine schrittweise Reduzierung des CPEO3-Anteils führt somit zu weniger Anknüpfungspunkten zwischen porenüberspannenden Membranen und Substrat.

Die Größe der *l*_o-Domänen in porenüberspannenden Membranen, gespannt über Substrate mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm, konnte nicht ermittelt werden. Betrachtet man den erwarteten Anteil der *l*_o-Domäne an der porenüberspannenden Membran im Bereich von 20 bis 30 %, so ergibt eine Umrechnung auf eine kreisförmige *l*_o-Domäne einen Durchmesser zwischen 0,20 und 0,24 µm. Dieser Domänen-durchmesser liegt an der Auflösungsgrenze des Fluoreszenzmikroskops (Kap. 3.3.2) und evtl. auftretende kleinere *l*_o-Domänen können somit nicht aufgelöst werden. Hier wäre es interessant, weitere Einblicke in das Phasenverhalten von porenüberspannenden Membranen, präpariert auf Substraten mit kleineren Porendurchmessern, mittels *Stimulated Emission Depletion (STED)*-Mikroskopie zu erhalten. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, die Auflösungsgrenze zu umgehen und bis auf 20 nm zu senken.^[13, 131, 132] Somit könnte auch das Phasenverhalten von Membranen, gespannt über Substrate mit Porengrößen im Nanometerbereich, wie sie z. B. in porösen Aluminaten erhalten werden, beobachtet werden.

5.1.4 Mobilität von *l*_o-Domänen in porenüberspannenden Membranen

Die beobachteten *l*_o-Domänen in porenüberspannenden Membranen sind innerhalb der freistehenden Membranbereiche lateral mobil. Die Betrachtung über kurze (wenige Sekunden) und längere Zeiträume (bis zu 55 min) ergab, dass auch der relative Anteil der *l*_o-Domänen an den freistehenden Membranbereichen während dieser Zeit schwankte, aber in einem Bereich von 20 bis 29 % konstant blieb (Kap. 4.2.2). Somit

konnte eine photoinduzierte Bildung von l_o -Domänen ausgeschlossen werden. Staneva *et al.* zeigten, dass die Photooxidation von Fluorophoren, die in Fluoreszenzexperimenten auftritt, zur Bildung von freien Radikalen führt, die umgebende Lipide chemisch modifizieren können. Die entstehenden Produkte können die Bildung von l_o -Domänen fördern.^[161] In diesem Fall hätte ein Anstieg des Anteils der l_o -Domänen während des kontinuierlichen Scannens detektiert werden müssen.

Während der lateralen Bewegung schwankte außerdem die Zirkularität der l_o -Domänen in einem Bereich von 0,8 bis 1,0 und zeigte somit eine Tendenz zu kreisförmigen l_o -Domänen. Dieses Verhalten wurde erwartet, da ein Kreis bei konstanter Fläche die geringste Grenzlinie aufweist. Da die Linienenergie proportional zum Domänenumfang ist (Gl. 1-1), resultiert daraus eine Minimierung der Linienenergie.

Die Fluktuationen der l_o -Domänengröße und der Zirkularität können durch die Diffusion einzelner Lipide über die Porenstege erklärt werden (Abb. 5-3). Diffundieren z. B. Lipide wie Sphingomyelin und Cholesterin über die Porenstege, so können diese über Wasserstoffbrücken mit weiteren Lipiden in der l_o -Phase interagieren und die l_o -Domäne temporär vergrößern bzw. verkleinern. Dabei kann außerdem die Domänenzirkularität abgesenkt werden, die aufgrund der Minimierung der Linienenergie wieder eine Verformung hin zu einer Kreisform zur Folge hat.

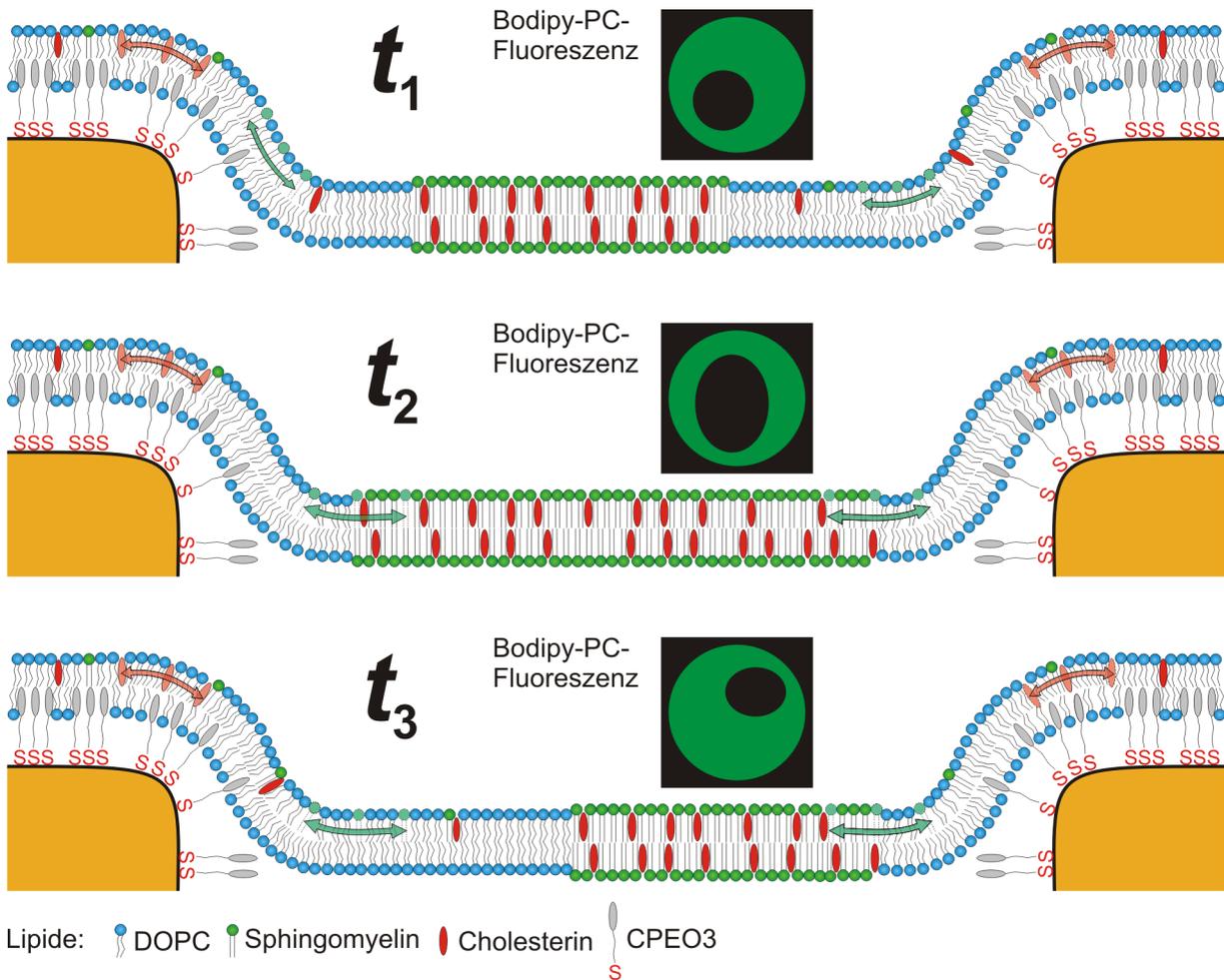


Abb. 5-3: Schematische Darstellung von porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Spingomyelin/Cholesterin (40:40:20) zu drei verschiedenen Zeitpunkten t_1 , t_2 und t_3 . Lipide können lateral diffundieren und somit die Größe der l_o -Domänen temporär vergrößern bzw. verkleinern. Dabei treten außerdem Schwankungen der Domänenzirkularität auf. Zur besseren Übersicht wurde die laterale Diffusion von Lipiden in der unteren Lipidmonoschicht nicht dargestellt.

Im Falle der CPEO3-funktionalisierten porösen Substrate wurde eine laterale Domänenbewegung nur im Falle der l_o -Domänen beobachtet, die sich in der Mitte der membranüberspannten Poren befanden. Eine Erklärung dafür liefert der Aufbau der porenüberspannenden Membranen, der in Abb. 5-4 schematisch dargestellt ist.

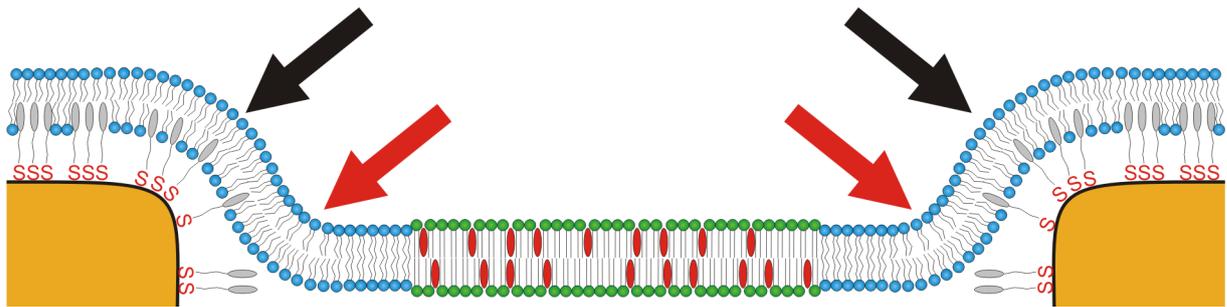


Abb. 5-4: Schematische Darstellung von porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) auf CPEO3-funktionalisierten Substraten. Rote Pfeile zeigen Bereiche mit negativer Membrankrümmung, während schwarze Pfeile Bereiche positiver Membrankrümmung verdeutlichen.

Es wird angenommen, dass porenüberspannende Membranen im Bereich der Porenstege gekrümmt sind.^[47] Groves *et al.* konnten auf gekrümmten Substraten zeigen, dass sich l_o -Domänen in phasenseparierten Lipidmischungen bevorzugt in Bereichen niedriger Krümmung aufhalten.^[162] Sie korrelierten die Fluoreszenzintensität des TexasRed DHPE-Fluorophors, der selektiv in der l_α -Phase angereichert ist^[67], mit der Krümmung des Substrats und konnten zeigen, dass oberhalb einer Krümmung von $\sim 0,8 \mu\text{m}^{-1}$ die Wahrscheinlichkeit, dort eine l_o -Domäne zu beobachten, stark abnahm. Ein ähnliches Verhalten wurde von Yoon *et al.* auf nanostrukturierten Substraten beobachtet.^[163] Sie zeigten in FRAP-Studien eine laterale Diffusion von Lipiden und Nanodomänen über die nanostrukturierten Bereiche. Jedoch konnten sie makroskopische Domänen nur in Bereichen niedriger Krümmung beobachten.

Aus den Erkenntnissen von Groves *et al.* und Yoon *et al.* wird deutlich, dass sich l_o -Domänen in porenüberspannenden Membranen bevorzugt in der Mitte aufhalten würden, da dort die Membrankrümmung am geringsten ist. Die Analyse der Domänenlokalisierung zeigte jedoch im Falle der CPEO3-funktionalisierten porösen Substrate, dass in Gb_3 -enthaltenden Membranen 75 % und in GM_1 -enthaltenden Membranen 60 % der l_o -Domänen am Porenrand lokalisiert waren. Diese l_o -Domänen zeigten auch keine laterale Beweglichkeit innerhalb der porenüberspannenden Membran. Eine Erklärung dafür könnte eine mögliche Interaktion zwischen den Cholesterylresten der CPEO3-Moleküle auf den Porenstegen und einer l_o -Domäne in der unteren Lipidmonoschicht sein, die zu einer Lokalisation an den Porenrand führen würde.

5.1.5 Einfluss der Substratfunktionalisierung auf das Phasenverhalten porenüberspannender Membranen

Um den Einfluss der Substratfunktionalisierung zu untersuchen, wurden zusätzlich porenüberspannende Membranen auf Mercaptoethanol-funktionalisierten porösen Substraten präpariert. Kocun *et al.* konnten in rasterkraftmikroskopischen Indentationsexperimenten zeigen, dass diese Membranen weniger vorgespannt sind, als Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Substraten.^[49] Sie ermittelten in porenüberspannenden Membranen, zusammengesetzt aus POPC, DOPC oder DOPC/Cholesterin-Mischungen, Membranspannungen im Bereich von 3,5 mN/m. Im Gegensatz dazu erhielten Mey *et al.* signifikant höhere Membranspannungen im Bereich von 26 mN/m für DPhPC-Membranen auf CPEO3-funktionalisierten Substraten.^[48] Diese hohe Membranspannung resultiert aus einer starken Adhäsion der Membran an die Porenstege. Porenüberspannende Membranen auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten hingegen adhäreren weniger stark an die Porenstege, da diese hydrophil funktionalisiert sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass porenüberspannende Membranen durch die hydrophile Stegfunktionalisierung und die fehlende Penetration der unteren Lipidmonoschicht durch die Cholesterylanker des CPEO3 weniger stark gekrümmt sind (Abb. 5-5).

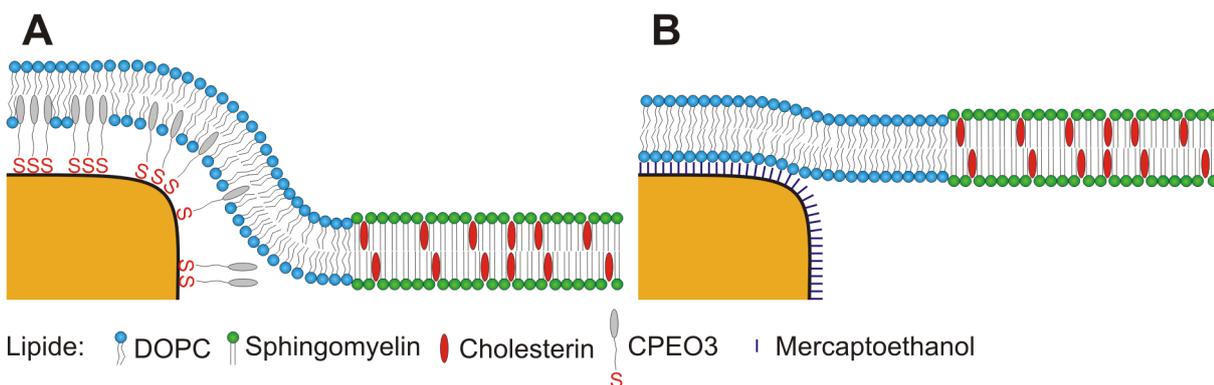


Abb. 5-5: Schematische Darstellung von porenüberspannenden Membranen auf (A) CPEO3- und (B) Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten. Abbildung nach Böcker *et al.*^[47] und Kocun *et al.*^[49]

In porenüberspannenden Membranen auf Mercaptoethanol-funktionalisierten Substraten zeigten sowohl die *l_o*-Domänen, die in der Mitte lokalisiert waren, als auch am Porenrand lokalisierte Domänen eine laterale Mobilität. Auch in diesem System

konnte gezeigt werden, dass 55 % der l_o -Domänen am Porenrand lokalisiert sind (Kap. 4.2.5). Diese bevorzugte Lokalisation am Porenrand wird scheinbar nicht durch den Einfluss der Funktionalisierung der porösen Substrate (in diesem Falle der Cholesterylanker des CPEO3) oder die Membranspannung hervorgerufen. Eine mögliche Erklärung für die Lokalisation der l_o -Domänen am Porenrand wäre eine Interaktion mit weiteren l_o -Domänen auf den Porenstegen. Das Löschen der Membranfluoreszenz durch die auf den Porenstegen aufgebraute Goldschicht verhindert eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Phasenseparation in diesem Bereich. Auch mittels rasterkraftmikroskopischer Experimente kann keine weitere Information über die Phasenseparation der Membran erhalten werden, da die Goldschicht eine Rauigkeit von $\pm 1 \text{ nm}$ ^[164] besitzt und die erwartete Höhendifferenz von 0,6 bis 1,0 nm (Kap. 5.3) zwischen l_d - und l_o -Phase genau in diesen Bereich fällt.

Daher wäre es für zukünftige Studien interessant, das Phasenverhalten porenüberspannender Membranen zu untersuchen, deren Oberflächenfunktionalisierung nicht auf der Gold-Thiol-Anbindung basiert. Denkbar wären Silan-basierte Funktionalisierungen, wie sie bereits erfolgreich auf porösen Aluminaten eingesetzt werden.^[165]

5.1.6 Lipidreorganisation nach der Bindung von bakteriellen Toxinen an porenüberspannende Membranen

Bakterielle AB₅-Proteine, wie Shiga Toxin (STx) und Cholera Toxin (CTx), binden über deren B-Untereinheiten (STxB bzw. CTxB) an ihre Glykosphingolipid-Rezeptoren Gb₃ und G_{M1} in der zellulären Plasmamembran. Nach der Endozytose der Proteine können sie retrograd zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert werden, wo die Freisetzung der katalytisch wirksamen A-Untereinheiten (STxA bzw. CTxA) erfolgt. Die Bindung der B-Untereinheiten an Membranen und die Effekte auf deren laterale Organisation wurden bisher sowohl im zellulären System als auch in artifiziellen Membransystemen, wie z. B. festkörperunterstützte Membranen und GUVs, untersucht. Wie in Kap. 5.1.4 gezeigt wurde, sind porenüberspannende Membranen als Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran geeignet, da sie

nicht nur die Heterogenität der Membran berücksichtigen, sondern auch den Einfluss des unterliegenden Zytoskeletts. Im folgenden Kapitel soll zunächst die beobachtete Lipidreorganisation nach der Bindung der Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB) an porenüberspannende Membranen diskutiert werden. Dem wird der Einfluss der Bindung der Cholera Toxin B-Untereinheit (CTxB) an porenüberspannende Membranen gegenübergestellt und verglichen mit dem System STxB-Gb₃.

Lipidreorganisation nach der STxB-Bindung an porenüberspannende Membranen

In porenüberspannenden Membranen, zusammengesetzt aus der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), konnte eine selektive Bindung des fluoreszenzmarkierten STxB an die *l_o*-Phase der Membran beobachtet werden (Kap. 4.2.4). Dies impliziert, dass der Glykosphingolipid-Rezeptor Gb₃ nach der STxB-Bindung in der *l_o*-Phase angereichert sein muss. Die genaue Lokalisation des Gb₃ vor Inkubation mit STxB ist bisher noch nicht bekannt. Es wird aber vermutet, dass dieses ebenso wie weitere Glykosphingolipide in der *l_o*-Phase artifizierlicher Membranen und in *Lipid Rafts* der zellulären Plasmamembran angereichert ist.^[166–168] Einen ersten Ansatz zur Bestimmung des Phasenverhaltens von Glykosphingolipiden in artifizierten Membranen zeigte das untersuchte fluoreszenzmarkierte Galactocerebrosid C₂₅*-Ph-GalCer, dessen Eigenschaften in Kap. 5.2 diskutiert werden.

Die selektive Bindung von STxB an die *l_o*-Phase von Membranen konnte sowohl in dieser Arbeit als auch in früheren Arbeiten bestätigt werden. Windschiegl *et al.* zeigten an festkörperunterstützten Membranen und indirekt an Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche, dass fluoreszenzmarkiertes STxB an Gb₃ in der *l_o*-Phase bindet.^[67] In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass STxB an die *l_o*-Phase von phasenseparierten GUVs bindet, aber keine tubulären Membraninvaginationen induziert, die zur Endozytose des Proteins führen. Die gewählte Lipidmischung weist eine höhere Membranspannung als die Lipidmischung DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) auf.^[65] Nach der Absenkung der Membranspannung in GUVs dieser Mischung konnten tubuläre Membraninvaginationen beobachtet werden. Diese traten

nicht nur in artifiziellen Membranen nach STxB-Inkubation auf, sondern auch in HeLa-Zellen.^[65] In HeLa-Zellen wurde beobachtet, dass die Aktivität des Zytoskeletts zur Abschnürung dieser Invaginationen führt.^[100] Die porenüberspannenden Membranen sind zwar geeignet, die Plasmamembran dieser Zellen zu simulieren, jedoch können aufgrund der hohen Spannung von Membranen, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5), keine Membraninvaginationen beobachtet werden. Es wurde ebenfalls nicht erwartet, eine Abschnürung dieser Invaginationen zu beobachten, da in diesem Modellsystem die dynamischen Komponenten, wie z. B. das Motorprotein Dynamin, fehlen.

In festkörperunterstützten Membranen (SSMs) konnte gezeigt werden, dass eine Lipidreorganisation nach der Bindung von STxB an Gb₃ erfolgt. Diese äußerte sich in einer Relokalisation des Perylen-Fluorophors aus der *l_o*-Phase vor STxB-Bindung in die *l_a*-Phase nach der Proteinbindung.^[67] Da in artifiziellen Membransystemen wie GUVs und SSMs keine Zellmaschinerie vorhanden ist, lässt sich aus diesen Erkenntnissen schließen, dass STxB vermutlich in der Lage ist, Gb₃-Moleküle zu rekrutieren und unter sich zu clustern, ohne dass weitere Proteine wie Clathrin oder Dynamin nötig sind. Dadurch entsteht eine negative Krümmung der Membran (Abb. 1-11), die zur Bildung der Membraninvaginationen führt und somit die Endozytose des Toxins einleiten kann.

In porenüberspannenden Membranen konnte ebenfalls eine Lipidreorganisation nach der Bindung von STxB beobachtet werden (Kap. 4.2.4) Diese äußerte sich in einem Anstieg des Anteils der *l_o*-Phase um 30 % in den membranüberspannten Porenbereichen (Abb. 5-6).

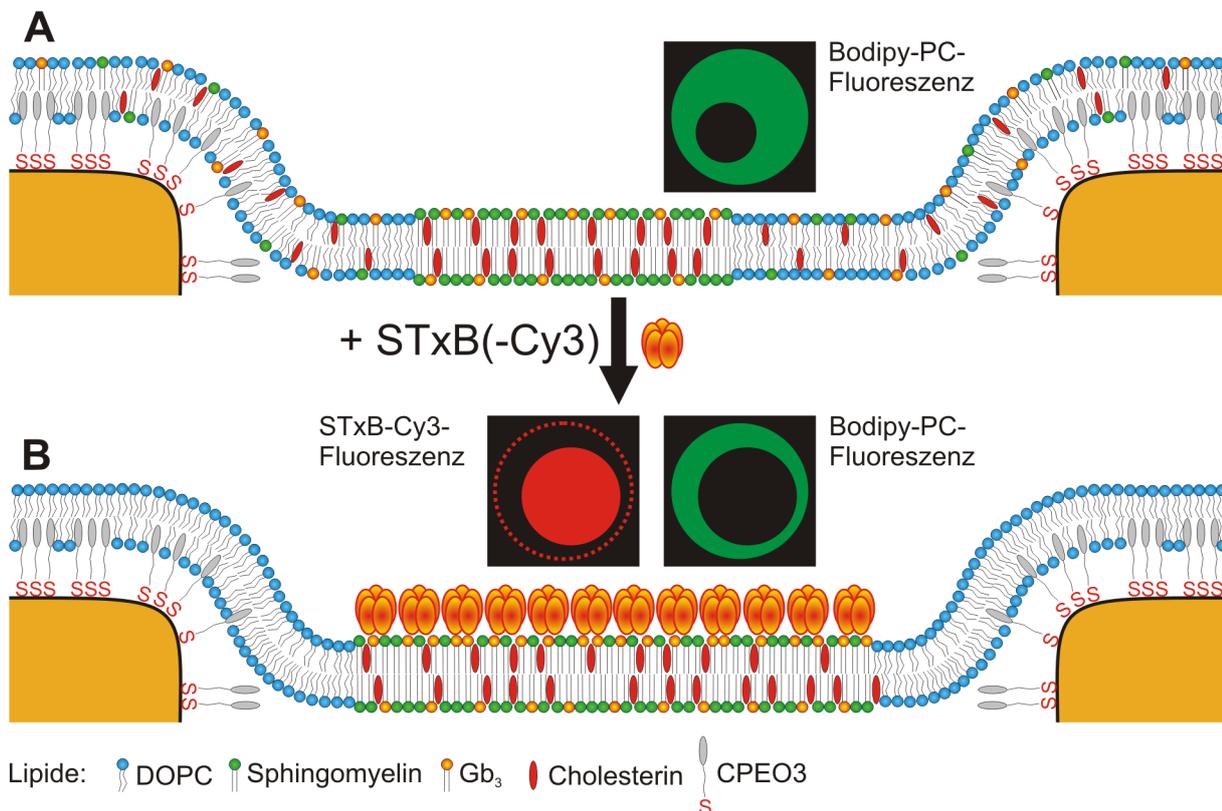


Abb. 5-6: (A) Schematische Darstellung von porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) die l_o -Domänen ausbilden, sichtbar als dunkle Bereiche in der Bodipy-PC-Fluoreszenz. (B) STxB bindet an Gb₃ in der l_o -Phase, erkennbar in der Cy3-Fluoreszenz des markierten STxB. Dabei rekrutiert STxB Gb₃-Moleküle und clustert diese, sodass der Anteil der l_o -Phase an den membranüberspannten Poren steigt.

Im Gegensatz dazu wurde in SSMs eine Abnahme des l_o -Anteils nach STxB-Bindung beobachtet. Die Abnahme wurde jedoch auf eine höhere Packungsdichte der Lipide innerhalb der l_o -Phase zurückgeführt.^[67] Dies kann durch die Kopplung der Membran an das Substrat erklärt werden, die so stark sein kann, dass keine Reorganisation der l_o -Domänen erfolgt und somit lediglich die Kondensation der Lipide innerhalb der Domänen statt der Bildung zusätzlicher l_o -Phase beobachtet werden kann.^[169]

Im Falle der porenüberspannenden Membranen konnte die direkte Rekrutierung von Gb₃-Molekülen mit einhergehender Erhöhung des Anteils der l_o -Phase nach der Bindung von STxB visualisiert werden (Abb. 5-6). Diese STxB-induzierte Lipidreorganisation wurde in festkörperunterstützten Membranen indirekt über das Phasenverhalten des Perylens vor und nach Proteininkubation gezeigt.^[67]

Zur Untersuchung, ob die in festkörperunterstützten Membranen und Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche beobachtete Lipidverdichtung nach Bindung von STxB^[67] auch in porenüberspannenden Membranen auftritt, wurde der Cholesteringehalt dieser Membranen mittels $m\beta$ CD gesenkt. Mit steigender $m\beta$ CD-Konzentration konnte gezeigt werden, dass der Anteil der l_o -Phase stetig abnahm. Bei einer Konzentration von 1,0 mM $m\beta$ CD waren weiterhin dunkle l_o -Domänen in der Bodipy-PC-Fluoreszenz sichtbar (Kap. 4.2.3). Die gleiche $m\beta$ CD-Konzentration führte in porenüberspannenden Membranen, die nicht mit STxB inkubiert wurden, zum Verschwinden der Phasenseparation (Kap. 4.2.3). Prinzipiell wären drei Fälle nach der Cholesterinextraktion denkbar. Würde keine Lipidverdichtung auftreten, sollte der Cholesteringehalt durch die Inkubation mit 1,0 mM $m\beta$ CD zu einem Verschwinden der Phasenseparation führen, analog zu den Ergebnissen von porenüberspannenden Membranen, die nicht mit STxB inkubiert wurden (Abb. 5-7 B). Wenn gebundenes STxB den Zugang für $m\beta$ CD zur Membran einschränkt und damit diese für die Cholesterinextraktion abschirmen würde, sollte der Anteil der l_o -Phase in den membranüberspannten Poren gleich bleiben (Abb. 5-7 C). Beide Fälle traten in den Experimenten an porenüberspannenden Membranen nicht auf. Die verbleibenden dunklen Domänen in der Bodipy-PC-Fluoreszenz deuten darauf hin, dass gebundenes STxB die Membranlipide durch das Clustering der Gb₃-Moleküle verdichtet. Dadurch kann Cholesterin nur in einem bestimmten Ausmaß aus der porenüberspannenden Membran extrahiert werden, sodass bei gleichen $m\beta$ CD-Konzentrationen nach STxB-Anbindung weiterhin dunkle Domänen in der Bodipy-PC-Fluoreszenz sichtbar sind, die der l_o -Phase zugeordnet werden (Abb. 5-7 D).

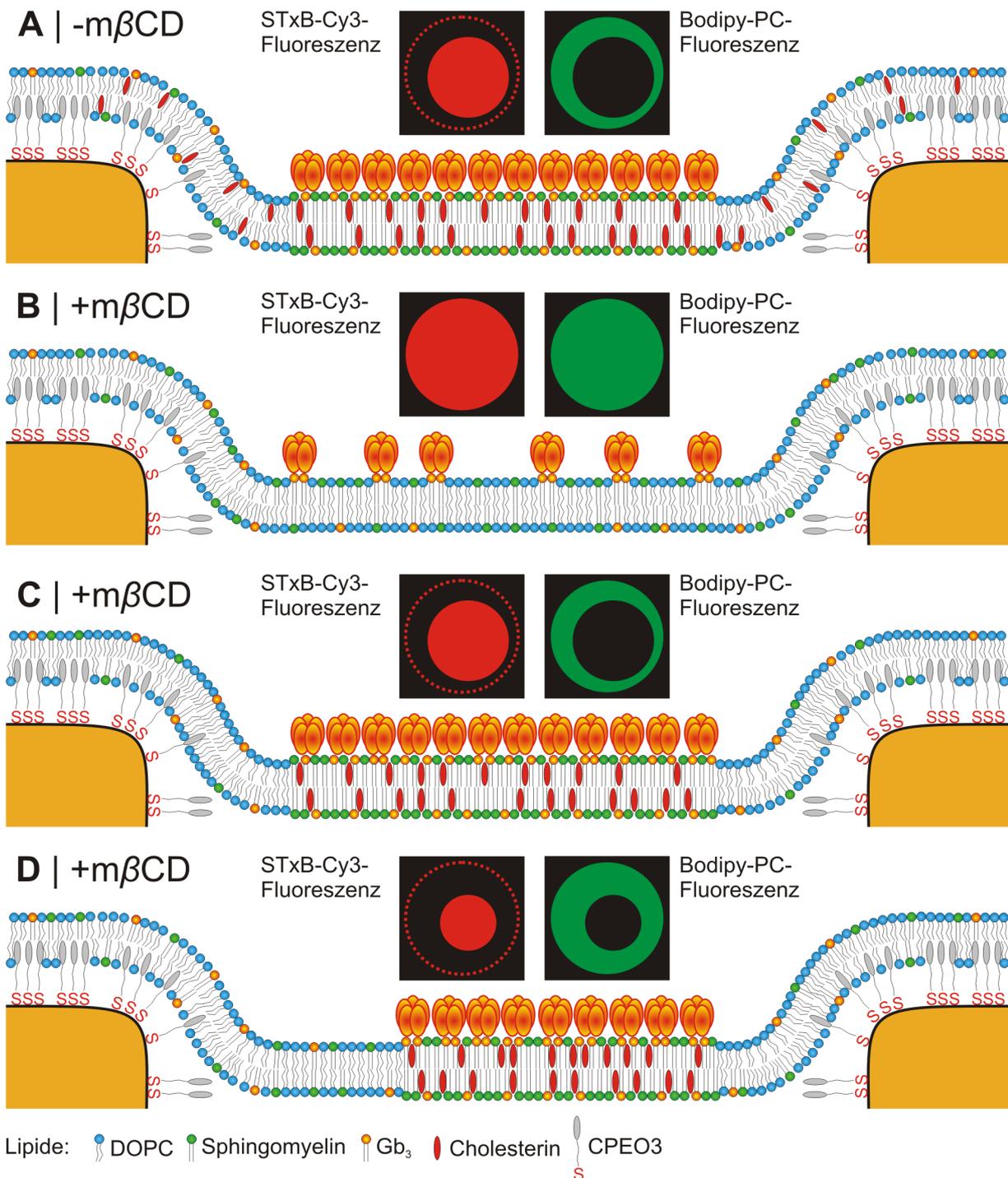


Abb. 5-7: (A) Schematische Darstellung von porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) mit gebundenem STxB. (B) Nach Inkubation mit $m\beta CD$ würde eine vollständige Cholesterinextraktion zur Auflösung der l_o -Domänen führen und eine homogene Bodipy-PC- sowie eine homogene STxB-Cy3-Fluoreszenz würden beobachtet werden. (C) Würde STxB den Zugang zur Membran blockieren, so würde Cholesterin nur aus der l_a -Phase extrahiert werden und der Anteil der l_o -Phase an der porenüberspannenden Membran sollte konstant bleiben. (D) Verdichtet STxB Lipide nach dem Clustern von Gb₃-Molekülen, so wird nur Cholesterin aus den Membranbereichen extrahiert, die nicht verdichtet wurden und der Anteil der l_o -Phase sinkt.

Einen weiteren Hinweis auf eine STxB-induzierte Lipidverdichtung geben Experimente, die klären sollten, ob Cholesterin mittels $m\beta$ CD bevorzugt aus geordneten oder ungeordneten Membranfraktionen extrahiert wird. Es wäre denkbar, dass Cholesterin bevorzugt aus geordneten Membranbereichen extrahiert wird, da in diesen Bereichen eine höhere Cholesterinkonzentration angenommen wird.^[7, 8] Je nach Extraktionsbedingungen konnte allerdings in Zellen beobachtet werden, dass Cholesterin sowohl aus geordneten (die den postulierten *Lipid Rafts* entsprechen sollen) als auch aus ungeordneteren Membranfraktionen extrahiert wird. Andere Studien ergaben auch eine bevorzugte Cholesterinextraktion aus ungeordneten Membranfraktionen. Eine Darstellung von Experimenten ist dazu in dem Übersichtsartikel von Zidovetzki *et al.* aufgeführt.^[117] Fasst man jedoch diese Studien nach den gewählten Extraktionsbedingungen zusammen, so wird deutlich, dass bei niedrigen $m\beta$ CD-Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten, wie sie in der vorliegenden Arbeit generell verwendet wurden (Kap. 3.2.5), Cholesterin bevorzugt aus geordneten Membranbereichen extrahiert wird. Ein ähnliches Verhalten konnte auch von Yancey *et al.* in artifiziellen Membranen beobachtet werden, die LUVs der Zusammensetzung DPPC/POPG/Cholesterin (80:15:5) mit verschiedenen Cyclodextrinen inkubierten. Sie stellten eine bevorzugte Extraktion des Cholesterins aus der l_o -Phase fest.^[170]

Überträgt man diese Erkenntnis auf die Cholesterinextraktions-Experimente an STxB-inkubierten, porenüberspannenden Membranen, so wären wiederum zwei Fälle denkbar. Würde keine Lipidverdichtung durch angebundenes STxB induziert, so sollte eine bevorzugte Cholesterinextraktion mittels $m\beta$ CD aus der l_o -Phase dazu führen, dass der Anteil der l_o -Phase absinkt und gegen Null tendiert. Induziert aber die STxB-Bindung an Gb₃ eine Lipidverdichtung, so wird die Cholesterinextraktion in diesem Bereich unterbunden und Cholesterin kann nur aus dem Membranbereich extrahiert werden, dessen Lipide nicht verdichtet wurden.

STxB-induzierte Phasenseparation in porenüberspannenden Membranen

In den vorigen Abschnitten wurde diskutiert, dass STxB in der Lage ist, Lipide in porenüberspannenden Membranen zu reorganisieren und dabei der Anteil der l_o -Phase ansteigt. Um zu untersuchen, ob STxB auch in der Lage ist, eine Phasenseparation durch Bildung einer geordneten Phase zu induzieren, wurden porenüberspannende Membranen präpariert, die keine Phasenseparation in l_a - und l_o -Phase zeigen. Nach Inkubation mit STxB wurde die Bildung von dunklen, unregelmäßig geformten Domänen in der Bodipy-PC-Fluoreszenz beobachtet, die der l_o -Phase zugeordnet werden konnten (Kap. 4.2.4). In Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (65:10:20:5), die keine Phasenseparation bei Raumtemperatur zeigten^[29, 30], induzierte die STxB-Inkubation ebenfalls dunkle Domänen, die einer geordneten Phase entsprechen.^[67] Ein ähnliches Verhalten konnte von Safouane *et al.* in GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (41:21:32:5), dotiert mit 1 mol% Bodipy-PC, beobachtet werden.^[141] Vor STxB-Inkubation zeigten GUVs dieser Zusammensetzung eine homogene Bodipy-PC-Fluoreszenz, die auf eine l_a -Phase hindeutet. Nach Inkubation mit STxB konnte die Induzierung einer Phasenseparation beobachtet werden.^[141] In allen erwähnten Fällen kann die Induzierung einer Domänenbildung darauf zurückgeführt werden, dass STxB in der Lage ist, an bis zu 15 Gb₃-Moleküle zu binden.^[59, 62] Die Rekrutierung von Gb₃-Molekülen und weiteren Lipiden, die sich bevorzugt in der l_o -Phase anreichern, kann somit zu einer Lipidverdichtung unterhalb des gebundenen Proteins führen und zur Bildung einer geordneten Phase, die den Bodipy-PC-Fluorophor ausschließt.

Die untersuchten Lipidmischungen liegen bei Raumtemperatur an der Grenze zwischen dem Einphasengebiet und dem Zweiphasen-Koexistenzgebiet im ternären Phasendiagramm^[29, 30] (Kap. 1.2.1) und befinden sich damit an einem kritischen Punkt. An solchen Punkten im Phasendiagramm nähert sich die Zusammensetzung von zwei koexistierenden Phasen an und eine geringe Energiezufuhr reicht aus, um in eine Region mit einer inhomogenen Zusammensetzung zu gelangen.^[171] Dies kann bereits durch eine geringe Änderung der Temperatur, des Drucks oder durch Ände-

rung der lokalen Membranorganisation, induziert durch Proteine, geschehen. Untersuchungen an GUVs, präpariert aus der Plasmamembran von Zellen (engl. *Giant Plasma Membrane Vesicles*, GPMVs), legen nahe, dass sich auch die Zusammensetzung der zellulären Plasmamembran in der Nähe eines kritischen Punkts befindet.^[36, 94, 96] So bestimmten Veatch *et al.* an GPMVs die Linienspannung der auftretenden Mikrodomänen in Abhängigkeit von der Temperatur. Sie beobachteten, dass sich die Linienspannung einem Wert von Null näherte, wenn die Übergangstemperatur der Lipidmischung erreicht wurde. Daraus schlossen sie, dass diese GPMVs eine kritische Zusammensetzung besitzen müssen und die Übergangstemperatur die kritische Temperatur ist.^[171] Ein Nachteil der Untersuchung von GPMVs ist, dass diese durch die Extraktion aus Zellen nicht mehr an das Zytoskelett gekoppelt sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass porenüberspannende Membranen kritischer Zusammensetzung ein ähnliches Verhalten zeigen, wie es in der zellulären Plasmamembran vermutet wird. Hier wäre es für zukünftige Studien interessant, das Phasenverhalten in porenüberspannenden Membranen, präpariert aus GPMVs zu untersuchen. Möglicherweise könnte dadurch eine Korrelation zwischen dem Phasenverhalten von Membranen der verwendeten Lipidmischung und Membranen aus Plasmamembranextrakten erreicht werden, die zu einem genaueren Bild von der Organisation der zellulären Plasmamembran führt.

Lipidreorganisation nach der CTxB-Bindung an porenüberspannende Membranen

In den vorigen Abschnitten wurde die Bindung der Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB) an den Rezeptor Gb₃ in porenüberspannenden Membranen diskutiert. Ein strukturell verwandtes Protein ist das Cholera Toxin (CTx), dessen B-Untereinheit (CTxB) an das Rezeptorgangliosid G_{M1} in der zellulären Plasmamembran bindet.^[82] Der wichtigste Unterschied zum System STxB-Gb₃, besteht darin, dass ein CTxB-Monomer nur an ein G_{M1}-Molekül bindet. Daher kann ein CTxB an fünf G_{M1}-Moleküle binden, während ein STxB an bis zu 15 Gb₃-Moleküle binden kann und somit stärkere Clustering-Eigenschaften aufweisen sollte.^[62] Im Falle des STxB konnte

bereits gezeigt werden, dass bei der Bindung an porenüberspannende Membranen diese Clustering-Eigenschaften zu einer Erhöhung des l_o -Anteils mit einer einhergehenden Lipidverdichtung führen. Im folgenden Abschnitt sollen, vergleichend zum System STxB-Gb₃, die Effekte der Bindung von CTxB an G_{M1} in porenüberspannenden Membranen diskutiert werden.

Bereits die Inkorporation von 1 mol% G_{M1} in GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) zeigte einen deutlichen Unterschied, verglichen mit der Inkorporation von Gb₃. So wurde beobachtet, dass fast ein Drittel der GUVs keine Phasenseparation in l_d - und l_o -Phase aufweist (Abb. 4-32). Insgesamt wurden sehr heterogene Vesikelpopulationen erhalten, bestehend einerseits aus phasenseparierten GUVs und andererseits aus GUVs, die nur die l_d -Phase zeigen. Im Gegensatz dazu wurden im Falle der Gb₃-enthaltenden GUVs ausschließlich l_d -/ l_o -phasenseparierte GUVs erhalten (Abb. 4-1). Diese heterogenen, G_{M1}-enthaltenden Vesikelpopulationen könnten während der Präparation der GUVs entstanden sein, wie sie von Elizondo *et al.* in Vesikelpräparationen mittels Hydratisierung von Lipidfilmen beobachtet wurden.^[172]

Die erhaltenen heterogenen Vesikelpopulationen könnten auch auf die Eigenschaften des Gangliosids G_{M1} zurückzuführen sein. Aufgrund der sehr großen Kopfgruppe und der negativen Ladung, hervorgerufen durch die Sialinsäure, hat dieses Glykosphingolipid einen starken Einfluss auf die laterale Organisation von Membranen.^[84, 173] So konnten Staneva *et al.* zeigen, dass G_{M1} die Bildung von photoinduzierten l_o -Mikrodomänen in GUVs verhindert^[161], obwohl oft angenommen wird, dass G_{M1} in geordneten Membranbereichen angereichert ist.

Die präparierten porenüberspannenden Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/G_{M1} (40:39:20:1) zeigten ebenfalls das heterogene Verhalten, das in GUVs beobachtet wurde (Abb. 4-34). Einerseits wurden porenüberspannende Membranen beobachtet, die phasensepariert in l_d - und l_o -Phase vorlagen, und andererseits konnte ein deutlich erhöhter Anteil an membranüberspannten Po-

ren in der l_a -Phase, im Vergleich zu der G_b3 -enthaltenden Lipidmischung, beobachtet werden (Abb. 4-37).

Die Diskussion über die Lokalisation des G_{M1} in artifiziellen Membranen verdeutlicht, dass dieses einen starken Einfluss auf das Phasenverhalten von Membranen haben kann. Je nach angewandter Messmethode, verwendeten Lipiden und untersuchtem Modellsystem, werden unterschiedliche Ergebnisse erhalten. So konnten Samsonov *et al.* in freistehenden, planaren Membranen, zusammengesetzt aus Mischungen von DOPC/DOPE/Sphingomyelin/Cholesterin, mit Bodipy-markiertem G_{M1} zeigen, dass sich dieses bevorzugt in der l_o -Phase der Membranen befindet, während die l_a -Phase durch ein Rhodamin-gekoppeltes DOPE visualisiert wurde.^[7] Dietrich *et al.* untersuchten sowohl Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche und daraus präparierte festkörperunterstützte Lipidmonoschichten, als auch GUVs, zusammengesetzt aus Mischungen von POPC/Sphingomyelin/Cholesterin und DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin.^[93] Sie beobachteten jeweils bis zu 10 μm große l_o -Domänen, unabhängig davon, ob 1 mol% G_{M1} inkorporiert wurde oder nicht. Über die Anbindung von Fluorescein-markiertem CTxB zeigten sie, dass sich G_{M1} in der l_o -Phase befand. Sie korrelierten die Ergebnisse mit Lipidmonoschichten und GUVs, hergestellt aus Extrakten der Bürstensaummembran von Dünndarmzellen (engl. *Brush Border Membrane*, BBM). Diese zeigten im zellulären System ebenfalls, dass eingebrachtes G_{M1} (1 mol%) bevorzugt in den geordneten Membranbereichen angereichert ist. Yuan *et al.* konnten zeigen, dass die Anreicherung von G_{M1} in einer bestimmten Phase artifizieller Membranen konzentrationsabhängig ist.^[85] Bei Konzentrationen bis zu 1 mol% beobachteten sie G_{M1} -reiche Domänen innerhalb der l_o -Phase festkörperunterstützter Lipidmonoschichten. Bei höheren Konzentrationen von bis zu 5 mol% wurden diese Mikrodomänen auch innerhalb der fluiden DOPC-angereicherten Phase gefunden. Aufgrund der Beobachtungen von Yuan *et al.* wurden in dieser Arbeit nur maximal 1 mol% G_{M1} in GUVs und damit auch in porenüberspannende Membranen eingebracht (Kap. 3.2.2).

Die Inkubation der porenüberspannenden Membranen mit CTxB zeigte, dass der Anteil der l_o -Phase nach Proteinbindung anstieg (Abb. 4-35), wie es im System STxB-Gb₃ beobachtet wurde. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass CTxB an fünf G_{M1}-Moleküle binden kann und somit ein Clustering von Lipiden unterhalb des gebundenen Proteins induziert. Diese Beobachtung kann durch Experimente von Hammond *et al.* an phasenseparierten GUVs der Zusammensetzung DOPC/DOPG/Sphingomyelin/Cholesterin, dotiert mit 1-2 mol% G_{M1}, bestätigt werden.^[174] Sie verifizierten zunächst die Lokalisation des CTxB-G_{M1}-Komplexes an der l_o -Phase der Vesikel. Präparierten Sie GUVs, zusammengesetzt aus den gleichen Lipiden in unterschiedlicher Zusammensetzung, die nur die l_d -Phase zeigten, so konnten sie nach CTxB-Bindung die Bildung von l_o -Domänen beobachten. Auch GUVs, die vor Proteinbindung nur die l_o -Phase zeigten, wiesen nach CTxB-Bindung l_d -Domänen innerhalb der l_o -Phase auf. Hammond *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass der Einfluss auf das Phasenverhalten nur durch Änderungen in der lateralen Organisation der Lipide zurückzuführen ist und nicht etwa auf eine Selbstaggregation des CTxB.^[174] Auch Lingwood *et al.* konnten in Untersuchungen an GPMVs zeigen, dass die Bindung von CTxB zur Bildung von mikrometergroßen G_{M1}- und Cholesterinangereicherten Domänen innerhalb der Membran führt, die vor Proteinanbindung keine Phasenseparation aufwiesen.^[94] Sie führten diese Experimente bei einer Temperatur von 37 °C durch und konnten somit zeigen, dass durch die Bindung von CTxB auch bei physiologischen Temperaturen eine Phasenseparation in Membranen aus zellulären Plasmamembranextrakten induziert werden kann. Die untersuchten Vesikel waren aber nicht mehr an das Zytoskelett gekoppelt, sodass dessen Einfluss unberücksichtigt blieb.

Die Untersuchungen an porenüberspannenden Membranen hingegen zeigen, dass auch in einem Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran die Rekrutierung von Lipiden beobachtet werden kann. Die Analyse der Effekte beider Toxine, STxB und CTxB, ergeben, dass in beiden Fällen ein Clustering mit einhergehender Vergrößerung der l_o -Phase beobachtet werden kann, das vermutlich auf die Bindung von fünf (CTxB) bis 15 (STxB) Rezeptormolekülen pro B-Untereinheit der Toxine zurückgeführt werden kann.

Diese Erkenntnisse verdeutlichen auch, dass die Verwendung des Systems CTxB- G_{M1} als *Raft Marker* ungeeignet ist. Die Bindung von fluoreszenzmarkiertem CTxB soll die l_o -Phase artifizierender Membranen bzw. die postulierten *Lipid Rafts* in zellulären Membranen visualisieren, da G_{M1} bevorzugt in geordneten Membranbereichen vermutet wird.^[39, 86, 90, 91, 145, 146] Der beobachtete Anstieg der l_o -Phase in porenüberspannenden Membranen verdeutlicht jedoch (Abb. 4-35), dass CTxB die Bildung von geordneten Membranbereichen durch G_{M1} -Clustering induziert. Auch Bacia *et al.* stellten das Konzept des Systems CTxB- G_{M1} als *Raft Marker* in Frage.^[175] In GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (1:1:1), dotiert mit 0,1 mol% Bodipy-markiertem G_{M1} , beobachteten sie die Anreicherung des markierten G_{M1} in der l_d -Phase dieser Vesikel. Nach der Bindung von CTxB stellten sie fest, dass das fluoreszenzmarkierte G_{M1} selektiv in der l_o -Phase angereichert war. Damit bewiesen sie, dass die Bindung von CTxB eine Änderung des Phasenverhaltens der G_{M1} -haltigen Membran induzierte, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit am System der porenüberspannenden Membranen gezeigt wurde.

5.2 Lokalisation von Glykosphingolipiden

Die Lokalisation der Rezeptorlipide Gb₃ und G_{M1} vor Proteinbindung ist, wie bereits in Kap. 5.1 erwähnt, noch ungeklärt. Im Allgemeinen wird vermutet, dass Glykosphingolipide bevorzugt in der *l_o*-Phase artifizierender Membranen bzw. in den postulierten *Lipid Rafts* zellulärer Membranen angereichert sind.^[166–168] Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem STxB und CTxB deuten darauf hin, dass sich deren Rezeptoren bevorzugt in geordneten Membranbereichen anreichern.^[39, 67, 86, 90, 91, 145–147] Aber es konnte gezeigt werden, wie bereits in Kap. 5.1.6 erwähnt, dass die Bindung von CTxB an GUVs eine Relokalisation des G_{M1} aus der *l_d*-Phase vor Proteinanbindung in die *l_o*-Phase induziert.^[175] Damit stellt sich die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem CTxB zur Visualisierung von G_{M1} in *Lipid Rafts* als ungeeignet dar. Eine Möglichkeit wäre die Kopplung von Fluoreszenzsonden an Moleküle wie G_{M1} oder Gb₃. Wenn diese an Fettsäureketten von Lipiden geknüpft werden, kann sich einerseits die Hydrophobie des Moleküls ändern und es integriert nur noch schwer in die Membran. Andererseits kann die Größe der Fluoreszenzsonde die laterale Organisation der Membran deutlich beeinflussen.^[32] Alternativ könnten Fluoreszenzsonde an die Kopfgruppen der Lipide gekoppelt werden. In diesem Fall können zwar Störungen der lateralen Membranorganisation minimiert werden, aber die Bindung der Toxine könnte beeinträchtigt werden, da diese über die Kohlenhydrate der Glykosphingolipidkopfgruppen erfolgt. Der Einfluss der Fluoreszenzsonden auf das Phasenverhalten der Lipide konnte in Kap. 4.1.2 gezeigt werden. Die untersuchten Sphingomyelinmoleküle zeigten eine Anreicherung in der *l_d*-Phase von GUVs statt der erwarteten Markierung der *l_o*-Phase. Wang *et al.* konnten auch in Fluoreszenzlöschungsexperimenten zeigen, dass NBD- und Bodipy-markierte Sphingolipide mit C5- bzw. C6-Fettsäureketten niedrige Affinitäten für die Sphingolipid/Cholesterin-angereicherte *l_o*-Phase besitzen.^[143]

Ein alternativer Ansatz ist die Verwendung von intrinsischen Fluorophoren, die keine zusätzliche Fluoreszenzsonde benötigen. Das C₂₅*-Phenylgalactocerebroside (C₂₅*-Ph-GalCer) ist in GUVs selektiv in der *l_o*-Phase angereichert, während die *l_d*-

Phase mittels Bodipy-PC markiert wurde (Abb. 4-5). Die fluorophore Gruppe wird in diesem Molekül von fünf (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen in Konjugation mit einem Phenylring am Ende der Fettsäurekette gebildet (Kap. 3.1.2). Der zusätzlich angebundene Phenylring störte die erwartete Anreicherung des Galactocerebroside in der *l_o*-Phase der Membran nicht, erweiterte aber das konjugierte π -System und ermöglichte somit die Untersuchung mittels einer UVB-Laserlinie bei 375 nm. Dieses Ergebnis zeigt, dass es mit Hilfe der Polyen-Lipide möglich ist, selektiv geordnete Membranbereiche zu markieren. Sie sind somit ein vielversprechender Ansatz für die genaue Lokalisation von Glykosphingolipiden wie Gb₃ und G_{M1} vor Proteinbindung, sowohl in artifiziellen Membranen als auch in biologischen Zellen. Weiterhin könnten Polyen-Lipide als Marker für die *l_o*-Phase artifizieller Membranen eingesetzt werden. In vielen Untersuchungen wurden dazu häufig Fluoreszenzsonden an Lipide gekoppelt oder polyzyklische Aromaten verwendet, deren Phasenverhalten unterschiedlich war, je nachdem welche Lipide eingesetzt wurden.^[33, 102]

Kuerschner *et al.* konnten bereits in Fluoreszenzlösungs-Experimenten an Liposomen zeigen, dass Sphingomyeline und Ceramide, die C18:5-Fettsäuren mit konjugierten und all-*trans*-konfigurierten Doppelbindungen enthalten, selektiv in der *l_o*-Phase angereichert waren.^[176] Sie untersuchten außerdem an COS7-Zellen den zellulären Metabolismus von Polyen-Sphingomyelin und unmarkiertem Sphingomyelin. Die Polyen-Lipide wurden, im Gegensatz zu Lipiden mit angekoppelten Fluoreszenzsonden, vergleichbar gut metabolisiert und konnten in den gleichen detergentenresistenten Membranfraktionen (DRMs) wie das unmarkierte Sphingomyelin wiedergefunden werden. Damit konnte von Kuerschner *et al.* auch eine erfolgreiche Anwendung der Polyen-Lipide in biologischen Zellen gezeigt werden.^[176] Die Nachteile der Polyen-Lipide sind allerdings die geringe Quantenausbeute von 10 %, bestimmt in DMPC-Membranen^[177], sowie das starke Bleichen, das Kuerschner *et al.* unter Benutzung der Zwei-Photonenanregung reduzierten. Außerdem wäre es möglich, dass ungewollte photoinduzierte Nebenreaktionen erfolgen. So könnten z. B. Cyclobutan-Dimere durch photochemisch-induzierte [2+2]-Cycloadditionen entstehen oder Peroxide durch UV-B-Strahlung gebildet werden.^[178] Die Reaktionsproduk-

te würden einerseits keine fluoreszierenden Eigenschaften mehr besitzen, da das konjugierte π -System zerstört wird, und andererseits stören sie die laterale Organisation der Lipiddoppelschicht.

5.3 Einfluss der molekularen Gb₃-Struktur auf die Membranorganisation in Abhängigkeit von der Shiga Toxin-Bindung

Das Globotriaosylceramid Gb₃ ist der natürliche Rezeptor für die Shiga Toxin B-Untereinheit (STxB). STxB bindet an die Kopfgruppe dieses Glykosphingolipids, die von einem Trisaccharid gebildet wird und mit einem Sphingosin-Grundgerüst verknüpft ist. An dieses Grundgerüst ist wiederum eine Fettsäure über eine Amidbindung gebunden (Kap. 3.1.1). In der vorliegenden Arbeit und in vorhergehenden Untersuchungen^[65, 67, 147] wurde Gb₃, isoliert aus Schweine-Erythrozyten, eingesetzt. Dieses enthält hauptsächlich gesättigte Fettsäuren (29 % C24:0, 17 % C22:0), sowie α -hydroxylierte Fettsäuren (19 % C24:0- α -OH, 10 % C24:1- α -OH).^[100] Untersuchungen an Riesenvesikeln (engl. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUVs) zeigten, dass die Bindung von STxB an Gb₃, isoliert aus Schweine-Erythrozyten, zur Bildung tubulärer Membraninvaginationen führt.^[65] Wurde das Rezeptorlipid durch aus HeLa-Zellen isoliertem Gb₃ substituiert, wurden ebenfalls Membraninvaginationen gebildet, die sich jedoch in Abhängigkeit von Cholesterin abschnüren konnten.^[100] Dieser Effekt wurde auch in HeLa-Zellen beobachtet, jedoch nicht in GUVs, die Gb₃, isoliert aus Schweine-Erythrozyten, enthielten. Das Gb₃ aus HeLa-Zellen enthält hauptsächlich α -hydroxylierte Fettsäuren (43 % C24:1- α -OH, 29 % C24:0- α -OH, 10 % C22:0- α -OH) und nur einen geringen Anteil gesättigter Fettsäuren (8 % C23:0, 6 % C24:0).^[100] Römer *et al.* konnten die Abschnürung der Membraninvaginationen ebenfalls beobachten, wenn sie das aus Schweinen isolierte Gb₃ in α -hydroxylierte und unhydroxylierte Fraktionen auftrennten, nur die α -hydroxylierten Anteile in GUVs inkorporierten und diese mit STxB inkubierten.^[100] Da die gewählten Gb₃-Mischungen aus verschiedenen Spezies in unterschiedlichen Anteilen zusammengesetzt sind, stellte sich die Frage, welche Auswirkungen die jeweiligen Fettsäuren des Gb₃ auf die laterale Or-

ganisation einer Membran in Abhängigkeit der Bindung von STxB haben. Zunächst wurde daher Gb₃ aus HeLa-Zellen (HeLa-Gb₃) in festkörperunterstützte Membranen eingebracht. Dessen Einfluss auf die laterale Organisation in Abhängigkeit der STxB-Bindung wurde mit den Untersuchungen an festkörperunterstützten Membranen^[67, 147], die Gb₃, isoliert aus Schweine-Erythrozyten enthielten, verglichen.

Um die beobachteten Effekte eindeutig auf den Einfluss der verschieden-funktionalisierten Fettsäuren zurückführen zu können, wurden von der Arbeitsgruppe PD Dr. D. B. Werz Gb₃-Moleküle definierter Struktur synthetisiert. Zur Untersuchung des Einflusses einer α -hydroxylierten Fettsäure wurde das C₂₄- α -OH-Gb₃ hergestellt. Um den Einfluss einer ungesättigten Fettsäure in Gb₃ zu untersuchen, wurde Gb₃ mit einer C₂₄:1-Fettsäure synthetisiert, bei dem die (Z)-Doppelbindung an Position 15 lokalisiert ist (C₂₄- Δ^{15} -Gb₃). Letzteres ist zwar lediglich zu geringeren Anteilen in beiden Gb₃-Mischungen enthalten (5 % in Gb₃ aus Schweine-Erythrozyten, 1 % in Gb₃ aus HeLa-Zellen), dient aber als Vergleich für das doppelt-funktionalisierte C₂₄- α -OH- Δ^{15} -Gb₃, das den Hauptanteil in HeLa-Gb₃ bildet.^[100] Dieses Molekül und die gesättigte Verbindung C₂₄-Gb₃ sollen in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Im System der porenüberspannenden Membranen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Bindung von STxB an Gb₃ zu einer Lipidreorganisation führte, welche durch die Erhöhung des Anteils der *l_o*-Phase gekennzeichnet ist (Kap. 4.2.4). Die Membranen auf CPEO₃-funktionalisierten Substraten sind vorgespannt, da die Lipide bevorzugt an den Porenrand adhäreren (Kap. 5.1.4). Dadurch kann eine mögliche Lipidkondensation, die zur Verringerung des *l_o*-Anteils führt, beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen an festkörperunterstützten Membranen, dass sich der Anteil der *l_o*-Phase nach Inkubation mit STxB reduzierte, was auf eine Lipidverdichtung zurückgeführt wurde.^[67, 147] Daraus ergibt sich, dass STxB in Abhängigkeit vom verwendeten Modellsystem in der Lage ist, sowohl Lipide zu reorganisieren und aufgrund der Rekrutierung von Gb₃-Molekülen eine Vergrößerung der *l_o*-Phase zu induzieren (Abb. 5-8 B) als auch *l_o*-Domänen dichter zu packen und damit zu einer Kondensation zu führen (Abb. 5-8 C). Im Folgenden soll daher disku-

tiert werden, wie sich Änderungen der molekularen Struktur des Gb₃-Moleküls auf die laterale Membranorganisation in Abhängigkeit der STxB-Bindung und des verwendeten Modellsystems auswirken.

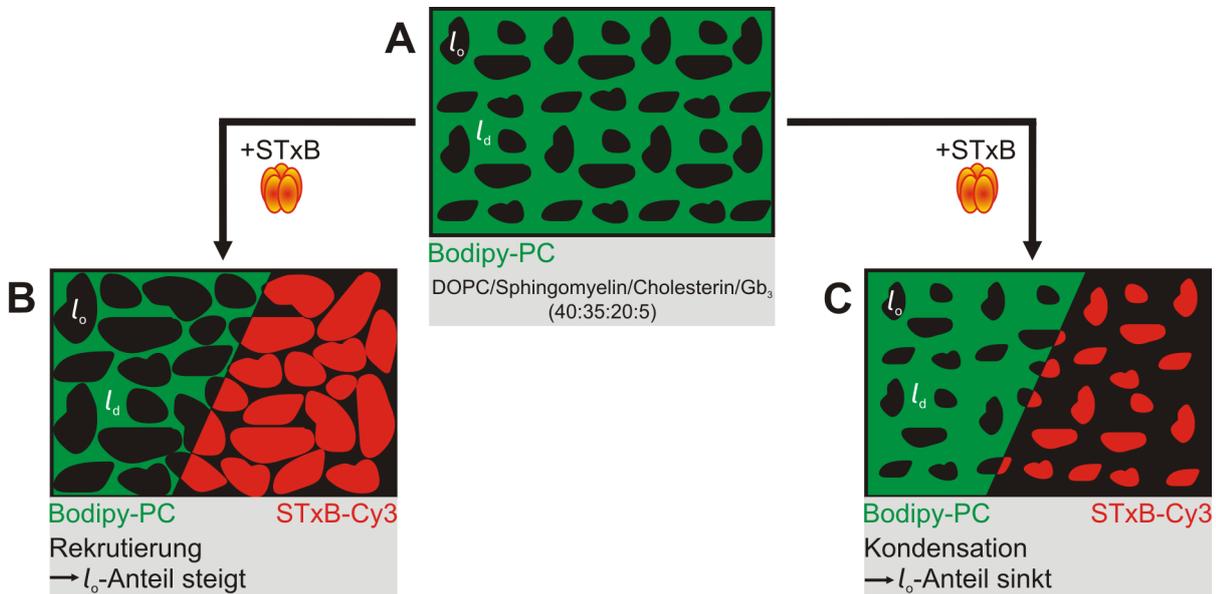


Abb. 5-8: Schematische Darstellung der beobachteten Effekte auf die laterale Membranorganisation nach Inkubation mit STxB. (A) Eine phasenseparierte Membran, dotiert mit Bodipy-PC weist vor STxB-Zugabe l_o-Domänen (dunkle Domänen) umgeben von l_d-Phase (grüne Bereiche) auf. (B) Fluoreszenzmarkiertes STxB (rot) bindet an die l_o-Phase, die durch Rekrutierung von Gb₃-Molekülen ansteigen kann. (C) Eine Lipidkondensation, induziert durch STxB, führt zur Verringerung des l_o-Anteils in der Membran.

Als Modellsystem für die Untersuchung des Einflusses der molekularen Struktur des Rezeptorlipids Gb₃ auf die Membranorganisation wurden festkörperunterstützte Membranen gewählt, um die Ergebnisse mit vorherigen Arbeiten^[67, 147] vergleichen zu können. Ein Vorteil festkörperunterstützter Membranen ist, dass deren laterale Organisation mittels Fluoreszenzmikroskopie einfach analysiert werden kann und die Anteile der jeweiligen l_d- und l_o-Domänen mittels Pixelanalyse ausgewertet werden können. Durch Kombination von Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie ist es möglich, die beobachteten Phasen zuzuordnen. Die direkte Untersuchung der Topografie mittels Rasterkraftmikroskopie liefert weiterhin Höheninformationen, aus denen der *Hydrophobic Mismatch* (Abb. 5-1) zwischen Domänen und gebundenen Proteinen direkt über deren Höhe ermittelt werden können.

5.3.1 Einfluss der molekularen Gb₃-Struktur auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium

Die Untersuchungen an festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Silizium, in denen jeweils HeLa-Gb₃, C₂₄- α -OH-Gb₃ oder C₂₄- Δ^{15} -Gb₃ inkorporiert wurden, zeigen eine Phasenseparation in *l_d*- und *l_o*-Phase (Kap. 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.4). Die *l_d*-Phase dieser Membranen wird in allen drei Fällen durch den Fluorophor TexasRed DHPE visualisiert, während Perylen in der *l_o*-Phase angereichert ist. Mittels Rasterkraftmikroskopie konnte eine Höhendifferenz in allen Membransystemen im Bereich von 0,6 bis 0,8 nm ermittelt werden, die eine Phasenseparation in *l_d*- und *l_o*-Phase bestätigt. Die tieferliegenden Bereiche werden der *l_d*-Phase zugeordnet, die hauptsächlich mit DOPC angereichert ist. Die *l_o*-Phase hingegen ist mit Sphingomyelin sowie Cholesterin und vermutlich mit Gb₃ angereichert. Eine dichtere Packung der Lipide in dieser Phase führt hier zu einer höheren Membrandicke.^[148, 149] Die ermittelten Werte vor und nach STxB-Inkubation stimmen mit dem Höhenunterschied zwischen beiden Phasen früherer Arbeiten überein.^[147] Das fluoreszenzmarkierte STxB bindet selektiv an die *l_o*-Phase der Membranen, wie in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen gezeigt wurde. Daraus folgt, dass Gb₃ nach der Bindung von STxB in der *l_o*-Phase lokalisiert ist. Der Anteil der *l_o*-Phase in den festkörperunterstützten Membranen wurde jeweils mittels Pixelanalyse bestimmt. Dieser änderte sich in den drei betrachteten Systemen nach der STxB-Inkubation nicht (Kap. 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.4). Im Falle der porenüberspannenden Membranen wurde jedoch in analogen Experimenten eine Erhöhung des *l_o*-Anteils nach Zugabe von STxB beobachtet, die auf die Rekrutierung von Gb₃ zurückgeführt wurde (Abb. 4-22). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Bindung von STxB an festkörperunterstützte Membranen auf Silizium, die jeweils HeLa-Gb₃, C₂₄- α -OH-Gb₃ oder C₂₄- Δ^{15} -Gb₃ enthalten, ein Gleichgewicht herrscht zwischen der STxB-induzierten Rekrutierung von Gb₃-Molekülen, die zur Erhöhung der *l_o*-Phase führen würde und einer induzierten Lipidverdichtung, die zu einer Abnahme der *l_o*-Phase führen würde. Somit erfolgt netto keine Änderung des Anteils der *l_o*-Phase in den Membranen auf Silizium.

Im Falle des HeLa-Gb₃ konnte mittels AFM eine Bindung des STxB detektiert und eine Höhendifferenz zwischen *l_a*- und proteinbedeckter *l_o*-Phase zu 1,6 nm bestimmt werden (Abb. 4-40). Dieser Wert ist generell zu niedrig für an die *l_o*-Phase gebundenes STxB. Die aus der Kristallstruktur abgeleitete Höhe des Proteins beträgt 2,2 nm^[179], sodass inklusive der Höhendifferenz zwischen *l_a*- und *l_o*-Phase ein Wert im Bereich von 2,8 bis 3,0 nm erwartet wurde. Eine Erklärung für den unterbestimmten Wert liefert die Wahl des *Contact Modes*. Durch die applizierte Kraft des *Cantilevers* auf die Probe kann das an die Membran gebundene Protein zu stark eingedrückt werden, was zur Unterbestimmung der Höhendifferenz führt. Im Falle des C₂₄- α -OH-Gb₃ und des C₂₄- Δ^{15} -Gb₃ konnte das gebundene STxB mittels Rasterkraftmikroskopie nicht visualisiert werden, d. h. es wurde keine zusätzliche Höhendifferenz ermittelt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach der Bindung von fluoreszenzmarkiertem STxB bestätigen jedoch die Proteinbindung.

In *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP)-Experimenten an festkörperunterstützten Membranen der Zusammensetzung DOPC/Cholesterin/Gb₃ (65:30:5) auf Silizium konnte ein Diffusionskoeffizient von 4,6 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt werden, während Membranen dieser Zusammensetzung, präpariert auf Mica, einen Diffusionskoeffizienten unterhalb von 1 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ lieferten.^[147] Die Werte verdeutlichen, dass Lipide in Membranen auf Silizium eine höhere Mobilität aufweisen als auf Mica. Eine erhöhte laterale Mobilität kann dazu führen, dass das gebundene STxB während der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme durch den *Cantilever* verschoben wird und somit nicht abgebildet werden kann.

Ein Unterschied in festkörperunterstützten Membranen auf Silizium und auf Mica konnte auch von Mao *et al.* beobachtet werden.^[180] Sie untersuchten Membranen der Zusammensetzung Sphingomyelin/Cholesterin/G_{M1} (40:40:20) und konnten nach einer längeren Inkubationszeit Sphingomyelin- und G_{M1}-angereicherte Domänen in Membranen auf Mica beobachten, während sie auf Silizium flache und homogene Membranen erhielten. Diese Membranen inkubierten sie mit dem Peptid Amyloid-beta 40 (A β 40), welches an G_{M1} binden kann und dabei eine Konformationsänderung erfährt. Diese führt zur A β 40-Aggregation und einer damit einhergehenden Ausbil-

dung von Fibrillen. Ablagerungen dieser A β 40-Fibrillen sind im Gehirn von Alzheimer-Patienten zu finden.^[181] In den festkörperunterstützten Membranen konnten Mao *et al.* diese Strukturen mittels Rasterkraftmikroskopie nur auf Mica beobachten, während sie auf Silizium kleinere Agglomerate von A β 40-Peptiden abbildeten.^[180] Sie führten die Unterschiede in den untersuchten Membransystemen auf eine unterschiedliche Wechselwirkung zwischen der G_{M1}-Kopfgruppe und den Wassermolekülen, die sich in einer Schicht zwischen Membran und Substrat befinden, zurück.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die untersuchten Membranen auf dem Substrat Silizium vermutlich eine erhöhte laterale Mobilität besitzen. Somit kann gebundenes STxB zwar fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden, eine Abbildung mittels Rasterkraftmikroskopie ist aber aufgrund der durch den *Cantilever* applizierten Kraft auf die Probe erschwert. In den weiteren Experimenten wurde daher mit festkörperunterstützten Membranen, präpariert auf dem Substrat Mica, gearbeitet.

5.3.2 Einfluss der α -Hydroxylierung in Gb₃ auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) auf Mica

Um den Einfluss der α -Hydroxylierung in Gb₃ auf die laterale Organisation festkörperunterstützter Membranen in Abhängigkeit der STxB-Bindung zu untersuchen, wurde das synthetische C₂₄- α -OH-Gb₃ in diese eingebracht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Membranen, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/C₂₄- α -OH-Gb₃ (40:35:20:5) zeigen feinverteilte *l_o*-Domänen mit einem Anteil von 55 % an der gesamten Membran (Abb. 4-45). Die Lokalisation des Perylens war nicht immer eindeutig zuzuordnen. Teilweise zeigte dieses eine Anreicherung in der *l_d*-Phase und teilweise in der *l_o*-Phase, während in vielen Experimenten kein Kontrast zwischen den beiden Phasen in der Perylen-Fluoreszenz beobachtet wurde, was wiederum auf eine Gleichverteilung in beiden Phasen hindeuten könnte (Abb. 4-45). Ein Problem stellte bei den Membranpräparationen auf Mica die höhere Dichte von Membrandefekten dar. In der Nähe dieser Defekte konnte ein stark abweichendes Phasenverhalten der Membran im Vergleich zur restlichen Probe

beobachtet werden, sodass es teilweise schwierig war, das tatsächliche Phasenverhalten der Fluorophore zu analysieren. Daher wurden nur Bildanteile betrachtet und ausgewertet, die keine Membrandefekte enthielten.

Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine Höhendifferenz zwischen l_d - und l_o -Phase von 0,8 nm, wie sie sowohl in festkörperunterstützten Membranen auf Silizium (siehe vorheriger Abschnitt) als auch in Membranen auf Mica, die die Gb₃-Mischungen (isoliert aus Schweine-Erythrozyten oder aus HeLa-Zellen) enthielten^[67, 147], beobachtet wurde (Abb. 4-48).

Nach der Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem STxB wird deutlich, dass dieses selektiv an die l_o -Phase der Membranen bindet (Abb. 4-47). Der Fluorophor Perylen ist nach der STxB-Bindung in der l_d -Phase angereichert und damit in der gleichen Phase wie TexasRed DHPE lokalisiert (Abb. 4-46). Ausgehend von einer annähernden Gleichverteilung des Perylens in l_d - und l_o -Phase vor STxB-Inkubation kann somit beobachtet werden, dass eine Reorganisation der Lipide durch die Proteinbindung induziert wurde. Dieses Verhalten zeigte Perylen auch in festkörperunterstützten Membranen, die Gb₃ aus Schweine-Erythrozyten enthielten.^[67] Die STxB-induzierte Lipidreorganisation wird weiterhin durch den Anstieg des Anteils der l_o -Phase auf 77 % nach der Proteinbindung deutlich. Dies bedeutet, dass STxB in der Lage ist, α -hydroxyliertes Gb₃ zu rekrutieren, was sich mit einer höheren Affinität von STxB für α -hydroxyliertes Gb₃ als an unhydroxyliertes Gb₃ erklären lässt. Binnington *et al.* konnten mittels Rezeptor-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) und Bindungstests auf Mikrotiterplatten mit iodmarkiertem Vero Toxin bestätigen, dass STxB eine höhere Affinität für α -hydroxyliertes Gb₃ besitzt.^[69]

Ekholm *et al.* führten Verteilungstests mit Cholestatrienol an Vesikeln, zusammengesetzt aus POPC/Sphingomyelin (80:20), durch. Diese ergaben, dass Cholesterin eine höhere Affinität für unhydroxyliertes als für α -hydroxyliertes C22:0-Sphingomyelin besitzt, da der Cholesteringehalt in l_o -Domänen mit α -hydroxyliertem Sphingomyelin geringer war.^[182] Befindet sich also weniger Cholesterin in den l_o -Domänen, so können die Lipide in dieser Phase nach STxB-Bindung weniger verdichtet werden.

Daher sollte der Anteil der l_o -Phase nach Proteinbindung nicht geringer werden, sondern aufgrund der Rekrutierung von Gb_3 -Molekülen ansteigen.

Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen nach STxB-Bindung ergaben einen leichten Anstieg der Höhendifferenz zwischen l_a - und l_o -Phase von 1,0 nm, während die Höhe des gebundenen STxB mit 0,7 nm deutlich unterbestimmt wurde (Abb. 4-49). Eine Erklärung hierfür ist die Komplettdedeckung der l_o -Phase mit STxB. Der *Cantilever* kann aufgrund der dichten Packung von STxB auf der l_o -Phase diese nicht erreichen (siehe Messartefakte in der Rasterkraftmikroskopie, Abb. 3-33 B) und somit nicht die Höhendifferenz zwischen l_o -Phase und angebindenem STxB abbilden. Eine Bindung des STxB konnte aber eindeutig mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten Proteins gezeigt werden (Abb. 4-47).

Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen der STxB-Bindung an C_{24} - α -OH- Gb_3 in festkörperunterstützten Membranen auf Mica, dass eine Lipidreorganisation nach Proteinbindung erfolgt. Diese wird durch die Rekrutierung von Gb_3 -Molekülen, die einen Anstieg des l_o -Anteils bewirkt, und einer Reorganisation des Fluorophors Perylen deutlich.

5.3.3 Einfluss von Gb_3 mit einer ungesättigten Fettsäure auf das Phasenverhalten der Lipidmischung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ Gb_3 (40:35:20:5) auf Mica

Zur Untersuchung des Einflusses einer ungesättigten Fettsäure in Gb_3 auf die laterale Organisation festkörperunterstützter Membranen auf Mica, wurde das synthetische C_{24} - Δ^{15} - Gb_3 in diese inkorporiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Membranen, zusammengesetzt aus DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/ C_{24} - Δ^{15} - Gb_3 (40:35:20:5) zeigen drei unterschiedliche Intensitätsstufen in der TexasRed DHPE-Fluoreszenz, die ebenfalls in der Perylen-Fluoreszenz sichtbar werden (Abb. 4-54). Die Bereiche dunkler Intensität der beiden Fluorophore sind kolokalisiert, während die mittlere Intensitätsstufe des TexasRed DHPE mit der hellen Intensitätsstufe des Perylens kolokalisiert ist und umgekehrt. Diese Intensitätsverteilung beider Fluoro-

phore deutet auf eine unterschiedliche Ordnung der Lipide in den jeweiligen Domänen hin. Die Bereiche hellster TexasRed DHPE- und mittlerer Perylen-Intensität werden der l_d -Phase zugeordnet (Abb. 5-9). Die Domänen mittlerer TexasRed DHPE- und hellster Perylen-Fluoreszenz sind vermutlich stärker geordnet als der zuvor erwähnte Bereich, da hier Perylen angereichert ist und TexasRed DHPE bereits ausgeschlossen wird ($l_{o,1}$ in Abb. 5-9). Bereiche, die in beiden Fluoreszenzkanälen dunkel erscheinen, sind vermutlich noch stärker geordnet, da beide Fluorophore aus diesen Domänen ausgeschlossen wurden ($l_{o,2}$ in Abb. 5-9). Somit scheint die Inkorporation von $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ zur Bildung einer l_d -Phase und zwei unterschiedlich stark geordneten l_o -Phasen zu führen. Es wurde erwartet, dass sich die stärker geordnete $l_{o,2}$ -Phase aufgrund des geringeren *Hydrophobic Mismatch* bevorzugt innerhalb der weniger stark geordneten $l_{o,1}$ -Phase ausbilden sollte. Auffällig ist hier jedoch die zufällige Verteilung dieser drei beobachteten Domänen über die gesamte Probe (Abb. 4-54).

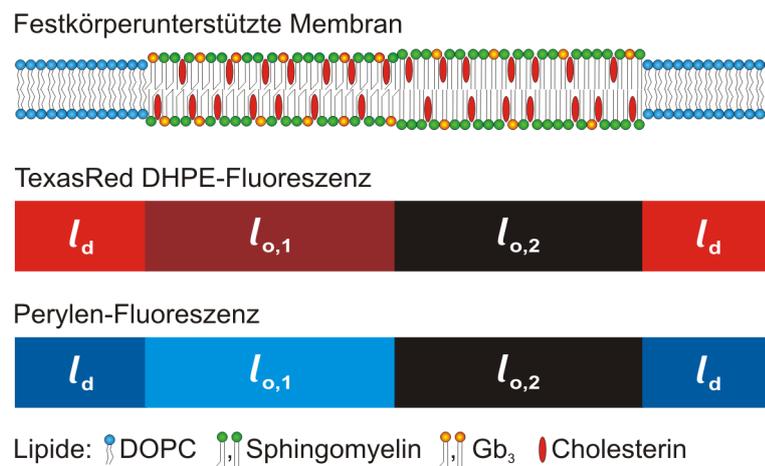


Abb. 5-9: Schematische Darstellung der drei beobachteten Membranphasen und die jeweilige Fluoreszenzintensität im TexasRed DHPE- und im Perylen-Kanal.

Das verwendete *brain*-Sphingomyelin enthält zu mehr als einem Drittel einfach-ungesättigte Fettsäuren (Kap. 3.1.1). Wird das synthetische Gb₃, das ebenfalls eine einfach-ungesättigte Fettsäure enthält, in die Lipidmischung eingebracht, so erhöht sich der Anteil der ungesättigten (Glyko-)Sphingolipide stärker als im Falle der Gb₃-Mischungen (aus HeLa-Zellen oder Schweine-Erythrozyten), die nur wenig ungesättigte Fettsäuren enthalten (Kap. 3.1.1). Die Wechselwirkung des Sphingomyelins und des Gb₃ mit dem in der Lipidmischung enthaltenen Cholesterin kann dazu führen,

dass sich zwei verschiedene geordnete Domänen ausbilden. Eine enthält bevorzugt die ungesättigten Anteile der (Glyko-)Sphingolipide, während die gesättigten Anteile des Sphingomyelins in der zweiten Domäne angereichert sind. Dies wird bestätigt, durch die Beobachtung, dass auch in biologischen Membranen geordnete Domänen unterschiedlicher Sphingolipid- und Protein-Zusammensetzung koexistieren können.^[183] Halling *et al.* konnten anhand von Cholesterin-Verteilungsexperimenten in LUVs zeigen, dass sich Cholesterin zwar mit gesättigtem und ungesättigtem Sphingomyelin mischt, aber eine höhere Affinität für gesättigtes Sphingomyelin aufweist.^[184] Daher kann bereits die abweichende Wechselwirkung von Cholesterin mit gesättigten und ungesättigten (Glyko-)Sphingolipiden zur Ausbildung unterschiedlich geordneter Domänen beitragen. Björkqvist *et al.* zeigten ebenfalls in Untersuchungen an GUVs, dass Sphingomyelin mit einer ungesättigten Fettsäure zu einer weniger dichten Packung führt als gesättigtes Sphingomyelin.^[144] In GUVs der Zusammensetzung POPC/C24:1-Sphingomyelin/Cholesterin (60:30:10) konnte keine l_o -Phase beobachtet werden. Es wurde nur eine fluide Phase aus den drei Membrankomponenten gebildet. Sie untersuchten weiterhin gesättigte und ungesättigte Galactocerebroside, um den Einfluss von Kohlenhydraten in der Kopfgruppe auf das Phasenverhalten gesättigter und ungesättigter Sphingolipide zu bestimmen. Das gesättigte C24:0-Galactocerebroside wurde so dicht gepackt, dass bereits Gelphase-Domänen beobachtet wurden, während das ungesättigte C24:1-Galactocerebroside, im Gegensatz zum C24:1-Sphingomyelin, in l_o -Domänen angereichert war.^[144] Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass nicht nur der Sättigungsgrad der Fettsäuren in Sphingolipiden, sondern auch die laterale Wechselwirkung der Kohlenhydrate in den Kopfgruppen berücksichtigt werden muss.

Die genaue Lokalisation des $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ in einer der beiden geordneten l_o -Phasen vor Inkubation mit STxB kann nur abgeschätzt werden. Es wird vermutet, dass dieses aufgrund der ungesättigten Fettsäure einen höheren Platzanspruch besitzt und sich somit bevorzugt in den Domänen mit heller Perylen- und mittlerer TexasRed DHPE-Fluoreszenz anreichert, die etwas weniger dicht gepackt sind als die zweite beobachtete l_o -Phase ($l_{o,1}$ in Abb. 5-9). Genauere Einblicke in das Phasenverhalten dieser Ver-

bindung könnte ein fluoreszenzmarkiertes $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ -Derivat ermöglichen, das eine ähnliche Polyen-Struktur, wie das in dieser Arbeit untersuchte C_{25}^* -Phenyl-Galactocerebroside (Kap. 3.1.2), aufweisen sollte.

Mit Hilfe der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen konnte eine Höhendifferenz von 1,2 nm (Abb. 4-56) bestimmt werden. Für eine Phasenseparation in l_d - und l_o -Phase ist dieser Wert allerdings recht hoch. Er könnte sich aus der Höhendifferenz zwischen l_d - und $l_{o,1}$ -Phase, sowie einer möglichen Höhendifferenz zwischen $l_{o,1}$ - und $l_{o,2}$ -Phase zusammensetzen.

Die beiden l_o -Phasen sind vermutlich unterschiedlich dicht gepackt, wie bereits zu Beginn dieses Kapitels diskutiert wurde (Abb. 5-9). Dies kann zu unterschiedlichen Membrandicken der Domänen führen. Eine mögliche Höhendifferenz zwischen $l_{o,1}$ - und $l_{o,2}$ -Phase konnte allerdings mittels AFM nicht aufgelöst werden.

Die ermittelte Höhendifferenz zwischen der l_d -Phase und den beiden geordneten Phasen deutet auf einen stärkeren *Hydrophobic Mismatch* hin (Abb. 5-1). García-Sáez *et al.* zeigten in Untersuchungen an GUVs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20), dass ein größerer *Hydrophobic Mismatch* zu einer höheren Linienspannung und damit zu einer höheren Linienenergie führt.^[39]

Nach der Inkubation mit STxB erfolgt eine Kondensation der vorher feinverteilten Domänen zu größeren Domänen. Der jeweilige relative Anteil der drei beobachteten Phasen an der gesamten festkörperunterstützten Membran ändert sich nach der Domänenkondensation nicht (Tab. 4-3) und die Fluorophore TexasRed DHPE und Perylen zeigen weiterhin das zuvor beschriebene Phasenverhalten (Abb. 4-54). Die Kondensation zu größeren Domänen wird vermutlich durch die Minimierung der Linienenergie getrieben. Diese ist bereits vor Proteinbindung höher als im Falle des α -hydroxylierten Gb_3 . Da wenige große Domänen insgesamt eine geringere Grenzlinie zwischen den Domänenrändern besitzen als viele kleine Domänen, ist die Bildung von größeren Domänen energetisch bevorzugt. Anscheinend führt die Bindung des STxB somit mittels Domänenkondensation zu einer Minimierung der Membranenergie.

Nach der Proteinbindung wird außerdem eine STxB-induzierte Reorganisation des $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ vermutet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Bindung des STxB-Cy3 an die Domänen, die sowohl in der TexasRed DHPE- als auch in der Perylen-Fluoreszenz dunkel erscheinen ($l_{o,2}$ in Abb. 4-55). Diese Domänen wurden vor Proteinanbindung einer hochgeordneten Phase, die bevorzugt gesättigte Sphingomyelin-Anteile enthält, zugeordnet ($l_{o,2}$ in Abb. 5-9). Ein solches Verhalten wurde nicht erwartet und könnte entweder durch eine STxB-induzierte Änderung des Phasenverhaltens des ungesättigten Gb_3 oder der falschen Annahme, dass das Gb_3 vor STxB-Inkubation in der weniger geordneten l_o -Phase ($l_{o,1}$) lokalisiert war, erklärt werden. Bestätigt werden könnte eine solche Rekrutierung des $C_{24}\text{-}\Delta^{15}\text{-Gb}_3$ von einer der beiden geordneten Phasen in die andere durch eine intrinsische Fluoreszenzmarkierung, wie sie bereits in Kap. 5.2 vorgeschlagen wurde.

Nach der STxB-Bindung wird weiterhin ein erhöhter Wert von 1,3 nm für die Phasenseparation zwischen l_a - und den beiden l_o -Phasen beobachtet (Abb. 4-57). Anscheinend führt die vermutete, durch STxB-induzierte, Minimierung der gesamten Linienenergie des Systems zwar zu einer Kondensation der Domänen, aber nicht zu einer Minimierung des *Hydrophobic Mismatch*. Die Bindung des STxB konnte eindeutig durch die gefundene Höhendifferenz von 1,9 nm zwischen proteinbedeckter und -unbedeckter Phase bestätigt werden (Abb. 4-57). Dieser Wert liegt nah an der literaturbekannten Höhendifferenz von 2,2 nm.^[67]

5.3.4 Zusammenfassendes Modell des Einflusses der molekularen Gb_3 -Struktur auf die Membranorganisation

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in der molekularen Struktur des Rezeptorlipids Gb_3 einen großen Einfluss auf die laterale Organisation einer phasenseparierten Membran ausüben. Zu Beginn des Kapitels wurde bereits ein Modell auf Grundlage der Untersuchungen zur STxB-Bindung an porenüberspannende Membranen und der Ergebnisse von festkörperunterstützten

Membranen aus vorherigen Arbeiten^[67, 147], die jeweils Gb₃ aus Schweine-Erythrozyten enthielten, vorgestellt (Abb. 5-8).

Dabei zeigte sich, dass STxB in porenüberspannenden Membranen in der Lage ist, Gb₃-Moleküle zu rekrutieren und den Anteil der *l*_o-Phase nach Proteinbindung somit zu erhöhen (Abb. 5-10 A). In den vorherigen Arbeiten konnte anhand von festkörperunterstützten Membranen gezeigt werden, dass die STxB-Bindung auch zur Kondensation der *l*_o-Domänen und damit zur Erniedrigung des *l*_o-Anteils führen kann (Abb. 5-10 B).^[67, 147] Dieses Modell wurde in der vorliegenden Arbeit durch Untersuchung der STxB-Bindung an HeLa-Gb₃, α -hydroxyliertes C₂₄- α -OH-Gb₃ und ungesättigtes C₂₄- Δ ¹⁵-Gb₃ in Membranen auf den Substraten Mica und Silizium erweitert. Dabei wurde jeweils der Einfluss der Gb₃-Rekrutierung bzw. der *l*_o-Domänenkondensation diskutiert.

In Abb. 5-10 A ist, analog zu den Ergebnissen von porenüberspannenden Membranen, der Anstieg der *l*_o-Phase nach STxB-Bindung an festkörperunterstützte Membranen auf Mica, die C₂₄- α -OH-Gb₃ enthielten, dargestellt. Dieser wurde auf die bevorzugte Rekrutierung von Gb₃-Molekülen durch STxB zurückgeführt, die mit einer erhöhten Affinität von STxB zu α -hydroxyliertem Gb₃ erklärt werden kann.

Im Falle des ungesättigten C₂₄- Δ ¹⁵-Gb₃ konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dessen Inkorporation in Membranen auf Mica zur Bildung einer weiteren geordneten *l*_o-Phase führt, die vermutlich mit ungesättigten Glykosphingolipiden, den ungesättigten Sphingomyelin-Anteilen und Cholesterin angereichert ist (Abb. 5-10 C). Die zweite geordnete Phase wird vermutlich von den gesättigten Sphingomyelin-Anteilen und Cholesterin gebildet. Nach der Inkubation mit STxB änderte sich das Phasenverhalten der Lipidmischung nicht, jedoch wurde eine Kondensation zu größeren Domänen beobachtet, die auf eine Minimierung der Linienenergie des Systems zurückgeführt wurde (Abb. 5-10 D). Außerdem wurde eine Reorganisation des C₂₄- Δ ¹⁵-Gb₃ von der *l*_{o,1}-Phase in die *l*_{o,2}-Phase, induziert durch STxB, postuliert.

In festkörperunterstützten Membranen auf dem Substrat Silizium, die HeLa-Gb₃, C₂₄- α -OH-Gb₃ oder C₂₄- Δ ¹⁵-Gb₃ enthielten, wurde keine Änderung des *l*_o-Anteils nach

Inkubation mit STxB beobachtet (Abb. 5-10 E). Dies wurde auf eine höhere laterale Mobilität der Lipide auf Silizium im Vergleich zu Mica und damit auf einen Einfluss des unterliegenden Substrats zurückgeführt. Diese erhöhte Mobilität ermöglicht sowohl eine STxB-induzierte Rekrutierung von Gb₃-Molekülen, die zur Erhöhung des *l_o*-Anteils führt, als auch eine Kondensation von Lipiden, die eine Erniedrigung des *l_o*-Anteils zur Folge hat. Damit kann erklärt werden, dass der Anteil der *l_o*-Phase in festkörperunterstützten Membranen auf Silizium nach STxB-Bindung annähernd konstant bleibt.

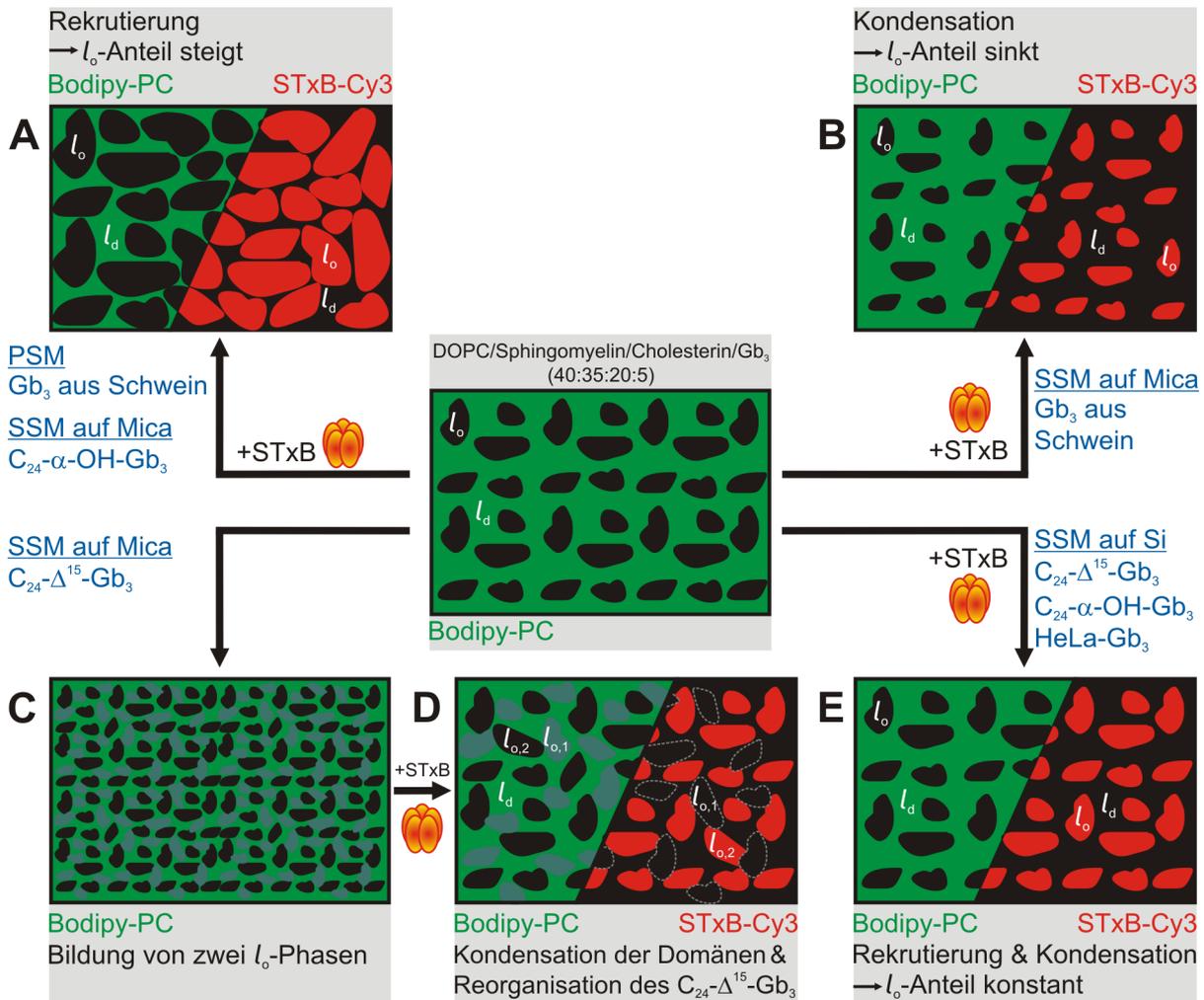


Abb. 5-10: Zusammenfassendes Modell des Einflusses der molekularen Gb₃-Struktur auf die Membranorganisation. Vor STxB-Zugabe weist eine phasenseparierte Membran, dotiert mit Bodipy-PC, l_o-Domänen (dunkle Domänen) umgeben von l_d-Phase (grüne Bereiche) auf (mittlere Grafik). Fluoreszenzmarkiertes STxB (rot) bindet an die l_o-Phase der Membranen. **(A)** Nach STxB-Zugabe kann der Anteil der l_o-Phase durch die Rekrutierung von Gb₃ ansteigen (beobachtet in porenüberspannenden Membranen (PSM), die Gb₃ aus Schwein enthalten und in festkörperunterstützten Membranen (SSM), die α-hydroxyliertes Gb₃ enthalten) **(B)** Eine Lipidkondensation, induziert durch STxB, führt zur Verringerung des l_o-Anteils in der Membran (beobachtet in SSMs, die Gb₃ aus Schwein enthalten).^[67, 147] **(C)** Die Inkorporation von Gb₃ mit einer ungesättigten Fettsäure führt zur Bildung von zwei l_o-Phasen (schwarze und dunkelgrüne Bereiche), **(D)** die nach STxB-Inkubation zu größeren Domänen kondensieren. Dabei wird das ungesättigte Gb₃ durch STxB reorganisiert. **(E)** In SSMs auf Silizium bleibt der Anteil der l_o-Phase nach STxB-Inkubation konstant, was auf die Fähigkeit des STxB zur Rekrutierung von Gb₃-Molekülen und anschließender Lipidkondensation schließen lässt.

Die Ergebnisse der Bindung von STxB an die synthetischen Gb₃-Moleküle in festkörperunterstützten Membranen zeigen unterschiedliche Einflüsse der molekularen Struktur des Gb₃-Rezeptors auf die STxB-Gb₃-Interaktion.

Bindet STxB an α -hydroxyliertes Gb₃, so steigt der Anteil der *l_o*-Phase. Dies deutet darauf hin, dass C₂₄- α -OH-Gb₃ vor der Inkubation mit STxB zu einem gewissen Anteil in der *l_d*-Phase lokalisiert ist und durch die Bindung des STxB in die *l_o*-Phase rekrutiert wird. Damit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von STxB an den α -hydroxylierten Anteil der Gb₃-Mischungen (HeLa-Gb₃ bzw. Gb₃ aus Schweine-Erythrozyten) einen Einfluss auf das Clustering von Gb₃-Molekülen hat, das in GUVs zu einer negativen Membrankrümmung und zur Ausbildung von tubulären Membraninvaginationen führt.^[65]

Die Bindung von STxB an Gb₃ mit einer ungesättigten Fettsäure (C₂₄- Δ^{15} -Gb₃) bewirkt eine Kondensation der drei Phasen zu größeren Domänen. Die STxB-Bindung an diesen Anteil der Gb₃-Mischungen führt somit zu einer Reorganisation der Membranlipide. Die Kombination dieser Lipidreorganisation mit dem beobachteten Gb₃-Clustering, induziert durch die Bindung von STxB an C₂₄- α -OH-Gb₃, verstärkt vermutlich zusätzlich die Anreicherung der Gb₃-Moleküle unterhalb des Proteins und fördert eine negative Krümmung in freistehenden Membranen, die den ersten Schritt der Endozytose des Proteins bildet.

Einen tieferen Einblick in das unterschiedliche Phasenverhalten der Gb₃-Mischungen, isoliert aus HeLa-Zellen und aus Schweine-Erythrozyten, und die Folgen auf die STxB-Gb₃-Interaktion können die gesättigte Verbindung C₂₄-Gb₃ sowie das doppelt-funktionalisierte C₂₄- α -OH- Δ^{15} -Gb₃ geben. Diese standen zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeit nicht zur Verfügung. Das gesättigte C₂₄-Gb₃ bildet den Hauptanteil in Gb₃ aus Schweine-Erythrozyten. In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass die STxB-Bindung an Membranen, die diese Gb₃-Mischung enthielten, eine Lipidkondensation induziert.^[67, 147] Es wird daher vermutet, dass im Fall des gesättigten C₂₄-Gb₃ der Anteil der *l_o*-Phase ebenfalls nach STxB-Bindung sinkt.

6 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung eines neuartigen Modellsystems für die zelluläre Plasmamembran auf Basis von porenüberspannenden Membranen (PSMs). Unter Berücksichtigung eines unterliegenden Netzwerks konnte erstmalig dessen Einfluss auf die laterale Membranorganisation gezeigt werden. PSMs der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin (40:40:20) wurden durch Spreiten von *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs) auf Gold-beschichtetem und CPEO3-funktionalisiertem, porösem Siliziumnitrid erhalten. Durch Dotierung mit den Fluorophoren Bodipy-PC und Perylen konnte fluoreszenzmikroskopisch die Separation dieser Membranen in *liquid-disordered* (l_d)- und *liquid-ordered* (l_o)-Phase beobachtet werden. Die Modulation der Temperatur und des Cholesteringehalts mittels Methyl- β -Cyclodextrin ($m\beta$ CD) verifizierte die Separation in l_o - und l_d -Phase.

Die Größe der l_o -Domänen wurde direkt durch die Porengröße des unterliegenden Substrats gesteuert. In Membranen auf Substraten mit Porendurchmessern zwischen 0,8 und 2,0 μm wurde jeweils ein durchschnittlicher Anteil der l_o -Domänen an den porenüberspannenden Bereichen von 24 % ermittelt. Damit konnte gezeigt werden, dass eine energetisch günstigere Kondensation zu größeren Domänen in PSMs durch den Einfluss des unterliegenden Substrats verhindert wird, ähnlich wie es in der zellulären Plasmamembran vermutet wird. Die l_o -Domänen besitzen eine laterale Mobilität und sowohl deren Größe als auch deren Zirkularität fluktuierte, was auf laterale Lipiddiffusion zurückgeführt wurde. PSMs werden somit als geeignetes Modellsystem für die zelluläre Plasmamembran angesehen, da gezeigt werden konnte, dass einerseits das unterliegende Substrat die Organisation der Membran direkt beeinflusst und andererseits eine Dynamik wie in freistehenden Membranen vorliegt.

Sie wurden weiterhin genutzt, um die Bindung von bakteriellen Toxinen, wie Shiga Toxin (STxB) und Cholera Toxin (CTxB), an ihre Glykosphingolipidrezeptoren Gb₃ und G_{M1} zu untersuchen. Beide Proteine induzierten eine Erhöhung des Anteils der

l_o -Phase in den freistehenden Membranbereichen, was auf eine Rekrutierung des jeweiligen Glykosphingolipids zurückgeführt wurde. Nach Reduzierung des Cholesteringehaltes wurden weiterhin l_o -Domänen beobachtet, da die STxB-induzierte Lipidkondensation dazu führte, dass weniger Cholesterin aus der l_o -Phase extrahiert werden konnte. Untermauert wurden die kondensierenden Eigenschaften des Proteins durch die STxB-induzierte Phasenseparation von zuvor nicht-phasenseparierten PSMs. Damit wurde erstmals gezeigt, dass die Toxin-Bindung an Modellmembranen, die den Einfluss eines unterliegenden Netzwerks berücksichtigen, zur Bildung von geordneten Membrandomänen führt, wie es in der *Raft*-Hypothese postuliert wird.

In bisherigen Studien wurde die STxB-Gb₃-Interaktion mit Gb₃-Mischungen, gewonnen aus natürlichen Geweben, analysiert. Zur Untersuchung des Einflusses der molekularen Struktur des Rezeptorlipids Gb₃ auf die Membranorganisation wurde in dieser Arbeit die STxB-Interaktion mit synthetischen Gb₃-Molekülen definierter Struktur untersucht. Dazu wurden festkörperunterstützte Membranen (SSMs) der Zusammensetzung DOPC/Sphingomyelin/Cholesterin/Gb₃ (40:35:20:5) verwendet, die eine Charakterisierung mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie ermöglichten. Die Bindung von STxB an α -hydroxyliertes Gb₃ in SSMs auf Mica führte zu dessen Rekrutierung und damit zu einem Anstieg des l_o -Anteils, wie er ebenfalls in PSMs beobachtet wurde. In Membranen auf Silizium hingegen wurde beobachtet, dass die Bindung von STxB an alle untersuchten Gb₃-Moleküle wahrscheinlich sowohl zu deren Rekrutierung als auch zur Kondensation von Lipiden führte. Die Inkorporation von Gb₃ mit einer ungesättigten Fettsäure bewirkte die Bildung einer weiteren geordneten Phase, die vermutlich mit ungesättigten (Glyko-)Sphingolipiden und Cholesterin angereichert ist. Nach der Inkubation mit STxB wurden in diesem System eine Gb₃-Reorganisation und eine Domänenkondensation beobachtet. Es wurde somit gezeigt, dass sowohl die Membran-Substrat-Interaktion als auch die molekulare Gb₃-Struktur genutzt werden können, um die STxB-Gb₃-Interaktion zu beeinflussen. Die Eigenschaft des STxB, Gb₃ zu rekrutieren, wurde auf die Bindung an α -hydroxylierte Anteile in natürlichen Gb₃-Mischungen und die Induktion einer Domänenkondensation auf die Bindung an Anteile mit ungesättigten Fettsäuren in Gb₃ zurückgeführt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] M. Luckey, *Membrane structural biology*. Cambridge University Press, Cambridge, **2008**.
- [2] R. Winter. Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen, *Chem. Unserer Zeit* **1990**, *24*, 71–81.
- [3] S. J. Singer, G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* **1972**, *175*, 720–731.
- [4] B. Alberts, J. Wilson, T. Hunt, A. Johnson, *Molecular biology of the cell*, 5th ed., Garland Science, New York, NY, **2008**.
- [5] K. Simons, E. Ikonen. Functional rafts in cell membranes, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [6] K. Simons, J. L. Sampaio. Membrane organization and lipid rafts, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*.
- [7] A. V. Samsonov, I. Mihalyov, F. S. Cohen. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1486–1500.
- [8] J. J. Wenz. Predicting the effect of steroids on membrane biophysical properties based on the molecular structure, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 896–906.
- [9] D. M. Engelman. Membranes are more mosaic than fluid, *Nature* **2005**, *438*, 578–580.
- [10] K. Simons, D. Toomre. Lipid rafts and signal transduction, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31–39.
- [11] J. Fan, M. Sammalkorpi, M. Haataja. Formation and regulation of lipid microdomains in cell membranes: theory, modeling, and speculation, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1678–1684.

- [12] D. Lingwood, H.-J. Kaiser, I. Levental, K. Simons. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes, *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 955–960.
- [13] C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V. N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schönle *et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell, *Nature* **2009**, *457*, 1159–1162.
- [14] K. Simons, M. J. Gerl. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 688–699.
- [15] D. A. Brown, J. K. Rose. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell* **1992**, *68*, 533–544.
- [16] D. Lingwood, K. Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science* **2010**, *327*, 46–50.
- [17] a) H. Heerklotz. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2693–2701.
b) D. Lichtenberg, F. M. Goñi, H. Heerklotz. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 430–436.
- [18] G. J. Doherty, H. T. McMahon. Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 65–95.
- [19] Q. Xu, A. Bateman, R. D. Finn, P. Abdubek, T. Astakhova, H. L. Axelrod, C. Bakolitsa, D. Carlton, C. Chen, H.-J. Chiu *et al.* Bacterial pleckstrin homology domains: a prokaryotic origin for the PH domain, *J. Mol. Biol.* **2010**, *396*, 31–46.
- [20] a) J. Delaunay. Genetic disorders of the red cell membranes, *FEBS Lett.* **1995**, *369*, 34–37.
b) V. Bennett, P. J. Stenbuck. The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes, *Nature* **1979**, *280*, 468–473.
- [21] A. Kusumi, Y. Sako. Cell surface organization by the membrane skeleton, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 566–574.

- [22] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, A. Kusumi. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane, *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 1071–1081.
- [23] A. J. Laude, I. A. Prior. Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking, *Mol. Membr. Biol.* **2004**, *21*, 193–205.
- [24] P.-F. Lenne, L. Wawrezynieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, X.-J. Guo, H. Rigneault, H.-T. He, D. Marguet. Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork, *EMBO J.* **2006**, *25*, 3245–3256.
- [25] N. Morone, T. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, A. Kusumi. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography, *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 851–862.
- [26] I. Y. Wong, M. L. Gardel, D. R. Reichman, E. R. Weeks, M. T. Valentine, A. R. Bausch, D. A. Weitz. Anomalous diffusion probes microstructure dynamics of entangled F-actin networks, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 178101.
- [27] V. Mueller, C. Ringemann, A. Honigmann, G. Schwarzmann, R. Medda, M. Leutenegger, S. Polyakova, V. N. Belov, S. W. Hell, C. Eggeling. STED nanoscopy reveals molecular details of cholesterol- and cytoskeleton-modulated lipid interactions in living cells, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 1651–1660.
- [28] M. Eeman, M. Deleu. From biological membranes to biomimetic model membranes, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2010**, *14*, 719–736.
- [29] S. L. Veatch, S. L. Keller. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3074–3083.
- [30] S. L. Veatch, S. L. Keller. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 148101–148104.
- [31] S. L. Veatch, S. L. Keller. Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1746*, 172–185.
- [32] O. Maier, V. Oberle, D. Hoekstra. Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review), *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116*, 3–18.

- [33] T. Baumgart, G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb, G. W. Feigenson. Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2182–2194.
- [34] M. E. Davis, M. E. Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023–1035.
- [35] M.-C. Giocondi, P. E. Milhiet, P. Dosset, C. Le Grimellec. Use of cyclodextrin for AFM monitoring of model raft formation, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 861–869.
- [36] T. Baumgart, A. T. Hammond, P. Sengupta, S. T. Hess, D. A. Holowka, B. A. Baird, W. W. Webb. Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2007**, *104*, 3165–3170.
- [37] P. I. Kuzmin, S. A. Akimov, Y. A. Chizmadzhev, J. Zimmerberg, F. S. Cohen. Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1120–1133.
- [38] S. A. Akimov, P. I. Kuzmin, J. Zimmerberg, F. S. Cohen. Lateral tension increases the line tension between two domains in a lipid bilayer membrane, *Phys. Rev. E* **2007**, *75*, 11919.
- [39] A. J. García-Sáez, S. Chiantia, P. Schwille. Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 33537–33544.
- [40] A. J. García-Sáez, P. Schwille. Surface analysis of membrane dynamics, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 766–776.
- [41] T. S. Ursell, W. S. Klug, R. Phillips. Morphology and interaction between lipid domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2009**, *106*, 13301–13306.
- [42] R. P. Richter, A. R. Brisson. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3422–3433.
- [43] V. Kiessling, L. K. Tamm. Measuring distances in supported bilayers by fluorescence interference-contrast microscopy: polymer supports and SNARE proteins, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 408–418.

- [44] L. J. Johnston. Nanoscale imaging of domains in supported lipid membranes, *Langmuir* **2007**, *23*, 5886–5895.
- [45] C. Steinem, A. Janshoff. Multicomponent membranes on solid substrates: Interfaces for protein binding, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15*, 479–488.
- [46] D. Weiskopf, E. K. Schmitt, M. H. Klühr, S. K. Dertinger, C. Steinem. Micro-BLMs on highly ordered porous silicon substrates: rupture process and lateral mobility, *Langmuir* **2007**, *23*, 9134–9139.
- [47] M. Böcker, S. Muschter, E. K. Schmitt, C. Steinem, T. E. Schäffer. Imaging and patterning of pore-suspending membranes with scanning ion conductance microscopy, *Langmuir* **2009**, *25*, 3022–3028.
- [48] I. Mey, M. Stephan, E. K. Schmitt, M. M. Müller, M. Ben Amar, C. Steinem, A. Janshoff. Local membrane mechanics of pore-spanning bilayers, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7031–7039.
- [49] M. Kocun, T. D. Lazzara, C. Steinem, A. Janshoff. Preparation of solvent-free, pore-spanning lipid bilayers: modeling the low tension of plasma membranes, *Langmuir* **2011**, *27*, 7672–7680.
- [50] M. Kocun, A. Janshoff. Pulling Tethers from Pore-Spanning Bilayers: Towards Simultaneous Determination of Local Bending Modulus and Lateral Tension of Membranes, *Small* **2012**, *8*, 847–851.
- [51] I. Höfer. Entwicklung eines Fusionsassays basierend auf porenüberspannenden Membranen, Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, **2011**.
- [52] E. A. Merritt, W. G. Hol. AB₅ toxins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 165–171.
- [53] O. Odumosu, D. Nicholas, H. Yano, W. Langridge. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable, *Toxins* **2010**, *2*, 1612–1645.
- [54] J. Konowalchuk, J. I. Speirs, S. Stavric. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* **1977**, *18*, 775–779.
- [55] a) F. Proulx, E. G. Seidman, D. Karpman. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome, *Pediatr. Res.* **2001**, *50*, 163–171.
b) T. G. Obrig. *Escherichia coli* Shiga Toxin Mechanisms of Action in Renal Disease, *Toxins* **2010**, *2*, 2769–2794.

- [56] Zimmerhackl, Lothar Bernd, H. Verweyen, A. Gerber, H. Karch, M. Brandis. Das hämolytisch-urämische Syndrom, *Deutsches Ärzteblatt* **2002**, *99*, 196–203.
- [57] a) C. Frank, D. Werber, J. P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. d. an Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode et al. Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing Escherichia coli O104:H4 Outbreak in Germany - Preliminary Report, *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 1771–1780.
- b) B. Borgatta, N. Kmet-Lunaček, J. Rello. E. coli O104:H4 outbreak and haemolytic-uraemic syndrome, *Med. Intensiva* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.medin.2011.11.022>.
- [58] H. Karch. EHEC O104:H4 und die Folgen, *Biospektrum* **2011**, *17*, 616–620.
- [59] K. Sandvig. Shiga toxins, *Toxicon* **2001**, *39*, 1629–1635.
- [60] S. DeLano Scientific LLC. PyMOL - The Molecular Graphics System, San Francisco, **2006**.
- [61] D. G. Pina, J. Gómez, E. Villar, L. Johannes, V. L. Shnyrov. Thermodynamic analysis of the structural stability of the shiga toxin B-subunit, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9498–9506.
- [62] D. G. Pina, L. Johannes. Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications, *Toxicon* **2005**, *45*, 389–393.
- [63] L. Johannes, S. Mayor. Induced domain formation in endocytic invagination, lipid sorting, and scission, *Cell* **2010**, *142*, 507–510.
- [64] D. G. Pina, L. Johannes, M. A. R. B. Castanho. Shiga toxin B-subunit sequential binding to its natural receptor in lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 628–636.
- [65] W. Römer, L. Berland, V. Chambon, K. Gaus, B. Windschiegl, D. Tenza, M. R. E. Aly, V. Fraisier, J.-C. Florent, D. Perrais et al. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells, *Nature* **2007**, *450*, 670–675.
- [66] P. Sens, L. Johannes, P. Bassereau. Biophysical approaches to protein-induced membrane deformations in trafficking, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 476–482.

- [67] B. Windschiegl, A. Orth, W. Römer, L. Berland, B. Stechmann, P. Bassereau, L. Johannes, C. Steinem. Lipid reorganization induced by Shiga toxin clustering on planar membranes, *PLoS One* **2009**, *4*, e6238.
- [68] A. Kiarash, B. Boyd, C. A. Lingwood. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11138–11146.
- [69] B. Binnington, D. Lingwood, A. Nutikka, C. A. Lingwood. Effect of globotriaosyl ceramide fatty acid alpha-hydroxylation on the binding by verotoxin 1 and verotoxin 2, *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 807–813.
- [70] D. S. Newburg, P. Chaturvedi, E. L. Lopez, S. Devoto, A. Fayad, T. G. Cleary. Susceptibility to hemolytic-uremic syndrome relates to erythrocyte glycosphingolipid patterns, *J. Infect. Dis.* **1993**, *168*, 476–479.
- [71] L. Johannes, W. Römer. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 105–116.
- [72] D. C. Smith, J. M. Lord, L. M. Roberts, L. Johannes. Glycosphingolipids as toxin receptors, *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2004**, *15*, 397–408.
- [73] K. Sandvig, B. van Deurs. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin, *FEBS Lett.* **2002**, *529*, 49–53.
- [74] J. S. Bonifacino, R. Rojas. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 568–579.
- [75] K. Sandvig, J. Bergan, A.-B. Dyve, T. Skotland, M. L. Torgersen. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin, *Toxicon* **2010**, *56*, 1181–1185.
- [76] K. Sandvig, B. van Deurs. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins, *Gene Ther.* **2005**, *12*, 865–872.
- [77] U. Distler, J. Souady, M. Hülsewig, I. Drmić-Hofman, J. Haier, A. W. Friedrich, H. Karch, N. Senninger, K. Dreisewerd, S. Berkenkamp *et al.* Shiga Toxin Receptor Gb₃Cer/CD77: Tumor-Association and Promising Therapeutic Target in Pancreas and Colon Cancer, *PLoS One* **2009**, *4*, e6813.
- [78] N. Engedal, T. Skotland, M. L. Torgersen, K. Sandvig. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging, *Microb. Biotechnol.* **2011**, *4*, 32–46.

- [79] B. Vingert, O. Adotevi, D. Patin, S. Jung, P. Shrikant, L. Freyburger, C. Eppolito, A. Sapozhnikov, M. Amessou, F. Quintin-Colonna *et al.* The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity, *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36*, 1124–1135.
- [80] K.-P. Janssen, D. Vignjevic, R. Boisgard, T. Falguières, G. Bousquet, D. De-caudin, F. Dollé, D. Louvard, B. Tavitian, S. Robine *et al.* In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 7230–7236.
- [81] a) J. R. Thiagarajah, A. S. Verkman. New drug targets for cholera therapy, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 172–175.
b) W. I. Lencer, T. R. Hirst, R. K. Holmes. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1450*, 177–190.
- [82] J. Sanchez, J. Holmgren. Cholera toxin - a foe & a friend, *Indian J. Med. Res.* **2011**, *133*, 153–163.
- [83] W. B. Turnbull, B. L. Precious, S. W. Homans. Dissecting the Cholera Toxin–Ganglioside GM1 Interaction by Isothermal Titration Calorimetry, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1047–1054.
- [84] R. Bao, L. Li, F. Qiu, Y. Yang. Atomic force microscopy study of ganglioside GM1 concentration effect on lateral phase separation of sphingomyelin/dioleoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 5923–5929.
- [85] C. Yuan, J. Furlong, P. Burgos, L. J. Johnston. The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2526–2535.
- [86] T. Harder, P. Scheiffele, P. Verkade, K. Simons. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components, *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 929–942.
- [87] a) P. I. Bastiaens, I. V. Majoul, P. J. Verveer, H. D. Söling, T. M. Jovin. Imaging the intracellular trafficking and state of the AB₅ quaternary structure of cholera toxin, *EMBO J.* **1996**, *15*, 4246–4253.

- b) W. I. Lencer, D. Saslowsky. Raft trafficking of AB₅ subunit bacterial toxins, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1746, 314–321.
- [88] D. J.-F. Chinnapen, H. Chinnapen, D. Saslowsky, W. I. Lencer. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER, *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 266, 129–137.
- [89] a) T. Harakuni, H. Sugawa, A. Komesu, M. Tadano, T. Arakawa. Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems, *Infect. Immun.* **2005**, 73, 5654–5665.
- b) K. Eriksson, J.-B. Sun, I. Nordström, M. Fredriksson, M. Lindblad, B.-L. Li, J. Holmgren. Coupling of antigen to cholera toxin for dendritic cell vaccination promotes the induction of MHC class I-restricted cytotoxic T cells and the rejection of a cognate antigen-expressing model tumor, *Eur. J. Immunol.* **2004**, 34, 1272–1281.
- c) A. George-Chandy, K. Eriksson, M. Lebens, I. Nordström, E. Schön, J. Holmgren. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells, *Infect. Immun.* **2001**, 69, 5716–5725.
- [90] N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia, B. Poolman, P. Schwille. Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 28109–28115.
- [91] K. Bacia, D. Scherfeld, N. Kahya, P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes, *Biophys. J.* **2004**, 87, 1034–1043.
- [92] N. Kahya. Targeting membrane proteins to liquid-ordered phases: molecular self-organization explored by fluorescence correlation spectroscopy, *Chem. Phys. Lipids* **2006**, 141, 158–168.

- [93] C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton. Lipid rafts reconstituted in model membranes, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1417–1428.
- [94] D. Lingwood, J. Ries, P. Schwille, K. Simons. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2008**, *105*, 10005–10010.
- [95] H.-J. Kaiser, D. Lingwood, I. Levental, J. L. Sampaio, L. Kalvodova, L. Rajendran, K. Simons. Order of lipid phases in model and plasma membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2009**, *106*, 16645–16650.
- [96] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson. Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112–124.
- [97] B. L. Stottrup, D. S. Stevens, S. L. Keller. Miscibility of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol in monolayers, and application to bilayer systems, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 269–276.
- [98] B. Ramstedt, P. Leppimäki, M. Axberg, J. P. Slotte. Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 997–1002.
- [99] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 5th ed., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, **2003**.
- [100] W. Römer, L.-L. Pontani, B. Sorre, C. Rentero, L. Berland, V. Chambon, C. Lamaze, P. Bassereau, C. Sykes, K. Gaus *et al.* Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis, *Cell* **2010**, *140*, 540–553.
- [101] T. Janas, T. Janas, M. Yarus. Specific RNA binding to ordered phospholipid bilayers, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2128–2136.
- [102] T. Baumgart, S. T. Hess, W. W. Webb. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension, *Nature* **2003**, *425*, 821–824.

- [103] Sigma-Aldrich, "C4555 - General Information", URL:
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/1/c4555inf.Par.0001.File.tmp/c4555inf.pdf, **2012**.
- [104] a) A. Pockels. Surface Tension, *Nature* **1891**, *43*, 437–439.
b) G. Beisswanger. Das Portrait: Agnes Pockels (1862-1935) und die Oberflächenchemie, *Chem. Unserer Zeit* **1991**, *25*, 97–101.
- [105] I. Langmuir. Oil Lenses on Water and the Nature of Monomolecular Expanded Films, *J. Chem. Phys.* **1933**, *1*, 756–776.
- [106] a) L. Wilhelmy. Ueber die Abhängigkeit der Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers, *Ann. Phys. Chem.* **1863**, *195*, 177–217.
b) J. T. Buontempo, F. A. Novak. An inexpensive Wilhelmy balance for the study of Langmuir monolayers, *Rev. Sci. Instrum.* **1992**, *63*, 5707–5713.
- [107] H. Möhwald. Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, *41*, 441–476.
- [108] a) M. I. Angelova, D. S. Dimitrov. Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81*, 303–311.
b) M. I. Angelova, S. Soléau, P. Méléard, F. Faucon, P. Bothorel. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications, *Trends in Colloid and Interface Science VI* **1992**, *89*, 127–131.
- [109] D. Dimitrov. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields, *J. Electroanal. Chem.* **1988**, *253*, 323–336.
- [110] L. Mathivet, S. Cribier, P. F. Devaux. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1112–1121.
- [111] R. Naumann, S. M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K. B. Hartman, I. Kärcher, I. Köper, J. Lübben, K. Vasilev, W. Knoll. Tethered lipid bilayers on ultraflat gold surfaces, *Langmuir* **2003**, *19*, 5435–5443.

- [112] H. Matsuura, T. Sagawa. Anomalous conformational behavior of short poly(oxyethylene) chains in water: An FT-IR spectroscopic study, *J. Mol. Liq.* **1995**, 65-66, 313–316.
- [113] E. K. Schmitt. Hochohmige porenüberspannende Lipidmembranen: Elektrochemische Untersuchungen zur Aktivität von Gramicidin und Bacteriorhodopsin, Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, **2009**.
- [114] H. Römpp, *Römpp Online*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2007**.
- [115] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang. Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4872–4897.
- [116] Y. Yu, C. Chipot, W. Cai, X. Shao. Molecular dynamics study of the inclusion of cholesterol into cyclodextrins, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 6372–6378.
- [117] R. Zidovetzki, I. Levitan. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1768, 1311–1324.
- [118] L. Johannes, D. Tenza, C. Antony, B. Goud. Retrograde transport of KDEL-bearing B-fragment of Shiga toxin, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 19554–19561.
- [119] Sigma-Aldrich, "C9903 - Datasheet", URL:
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/3/c9903dat.Par.0001.File.tmp/c9903dat.pdf>, **2012**.
- [120] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, NY, **2006**.
- [121] P. W. Atkins, A. Höpfner, *Physikalische Chemie*, 3. korrigierte Aufl., 1. Nachdr., WILEY-VCH, Weinheim, **2004**.
- [122] H. Mustroph, S. Ernst. Das Franck-Condon-Prinzip, *Chem. Unserer Zeit* **2011**, 45, 256–269.
- [123] J. W. Lichtman, J.-A. Conchello. Fluorescence microscopy, *Nat. Methods* **2005**, 2, 910–919.
- [124] G. G. Stokes. On the Change of Refrangibility of Light, *Phil. Trans. R. Soc.* **1852**, 142, 463–562.

- [125] M. Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope, *Scanning* **1988**, *10*, 128–138.
- [126] J.-A. Conchello, J. W. Lichtman. Optical sectioning microscopy, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 920–931.
- [127] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics, *Biophys. J.* **1976**, *16*, 1055–1069.
- [128] D. M. Soumpasis. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments, *Biophys. J.* **1983**, *41*, 95–97.
- [129] L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, H. J. Tanke. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy, *Biophys. J.* **1995**, *68*, 2588–2600.
- [130] D. M. Owen, D. Williamson, C. Rentero, K. Gaus. Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organisation, *Traffic* **2009**, *10*, 962–971.
- [131] S. W. Hell, J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [132] M. Dyba, S. W. Hell. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 163901.
- [133] a) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- b) S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272.
- c) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [134] G. Binnig, C. F. Quate. Atomic Force Microscope, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.

- [135] a) P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater *et al.* Tapping mode atomic force microscopy in liquids, *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *64*, 1738–1740.
- b) F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A. M. Baró. Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **2004**, *69*, 31915.
- [136] P. C. Braga, *Atomic force microscopy. Biomedical methods and applications*, Humana Press, Totowa, NJ, **2004**, Vol. 242.
- [137] P. F. Devaux, R. Morris. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes, *Traffic* **2004**, *5*, 241–246.
- [138] B. Maggio, G. A. Borioli, M. Del Boca, L. de Tullio, M. L. Fanani, R. G. Oliveira, C. M. Rosetti, N. Wilke. Composition-driven surface domain structuring mediated by sphingolipids and membrane-active proteins. Above the nano- but under the micro-scale: mesoscopic biochemical/structural cross-talk in biomembranes, *Cell Biochem. Biophys.* **2008**, *50*, 79–109.
- [139] K. Simons, W. L. C. Vaz. Model systems, lipid rafts, and cell membranes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 269–295.
- [140] I. Höfer, C. Steinem. A membrane fusion assay based on pore-spanning lipid bilayers, *Soft Matter* **2011**, *7*, 1644–1647.
- [141] M. Safouane, L. Berland, A. Callan-Jones, B. Sorre, W. Römer, L. Johannes, G. E. S. Toombes, P. Bassereau. Lipid cosorting mediated by shiga toxin induced tubulation, *Traffic* **2010**, *11*, 1519–1529.
- [142] D. L. Marks, R. Bittman, R. E. Pagano. Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 819–832.
- [143] T. Y. Wang, J. R. Silvius. Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1478–1489.

- [144] Y. J. E. Björkqvist, J. Brewer, L. A. Bagatolli, J. P. Slotte, B. Westerlund. Thermotropic behavior and lateral distribution of very long chain sphingolipids, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 1310–1320.
- [145] N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia, P. Schwille. Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy, *J. Struct. Biol.* **2004**, *147*, 77–89.
- [146] D. C. Carrer, A. W. Schmidt, H.-J. Knölker, P. Schwille. Membrane Domain-Disrupting Effects of 4-Substitued Cholesterol Derivatives, *Langmuir* **2008**, *24*, 8807–8812.
- [147] B. Windschiegl. Laterale Organisation von Shiga Toxin gebunden an Gb₃-haltige Modellmembranen, Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen, **2008**.
- [148] D. E. Saslowsky, J. Lawrence, X. Ren, D. A. Brown, R. M. Henderson, J. M. Edwardson. Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26966–26970.
- [149] S. Chiantia, N. Kahya, J. Ries, P. Schwille. Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4500–4508.
- [150] T. L. Williams, A. T. A. Jenkins. Measurement of the binding of cholera toxin to GM1 gangliosides on solid supported lipid bilayer vesicles and inhibition by europium (III) chloride, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6438–6443.
- [151] T. Falguières, W. Römer, M. Amessou, C. Afonso, C. Wolf, J.-C. Tabet, C. Lamaze, L. Johannes. Functionally different pools of Shiga toxin receptor, globotriaosyl ceramide, in HeLa cells, *FEBS J.* **2006**, *273*, 5205–5218.
- [152] C. J. Fielding (Ed.) *Lipid rafts and caveolae. From membrane biophysics to cell biology*, WILEY-VCH, Weinheim, **2006**.
- [153] S. L. Veatch, S. L. Keller. A closer look at the canonical 'Raft Mixture' in model membrane studies, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 725–726.

- [154] J. Korlach, P. Schwille, W. W. Webb, G. W. Feigenson. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1999**, *96*, 8461–8466.
- [155] a) L. A. Bagatolli, E. Gratton. A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 434–447.
b) D. Scherfeld, N. Kahya, P. Schwille. Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3758–3768.
- [156] M. P. Besenicar, A. Bavdek, A. Kladnik, P. Macek, G. Anderluh. Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl- β -cyclodextrin--a surface plasmon resonance approach, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 175–184.
- [157] H. M. McConnell, M. Vrljic. Liquid-liquid immiscibility in membranes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 469–492.
- [158] J. Ehrig, E. P. Petrov, P. Schwille. Near-critical fluctuations and cytoskeleton-assisted phase separation lead to subdiffusion in cell membranes, *Biophys. J.* **2011**, *100*, 80–89.
- [159] Z. P. Yang, I. Engquist, J.-M. Kauffmann, B. Liedberg. Thiocholesterol on Gold: A Nanoporous Molecular Assembly, *Langmuir* **1996**, *12*, 1704–1707.
- [160] L. M. Williams, S. D. Evans, T. M. Flynn, A. Marsh, P. F. Knowles, R. J. Bushby, N. Boden. Kinetics of the Unrolling of Small Unilamellar Phospholipid Vesicles onto Self-Assembled Monolayers, *Langmuir* **1997**, *13*, 751–757.
- [161] G. Staneva, M. Seigneuret, H. Conjeaud, N. Puff, M. Angelova. Making A Tool Of An Artifact: The Application Of Photoinduced Lo Domains In Giant Unilamellar Vesicles To The Study Of Lo/Ld Phases Spinodal Decomposition And Its Modulation By The Ganglioside GM1, *Langmuir* **2011**, *27*, 15074–15082.
- [162] a) R. Parthasarathy, J. T. Groves. Curvature and spatial organization in biological membranes, *Soft Matter* **2006**, *3*, 24–33.
b) R. Parthasarathy, C.-h. Yu, J. T. Groves. Curvature-modulated phase separation in lipid bilayer membranes, *Langmuir* **2006**, *22*, 5095–5099.

- [163] T.-Y. Yoon, C. Jeong, S.-W. Lee, J. H. Kim, M. C. Choi, S.-J. Kim, M. W. Kim, S.-D. Lee. Topographic control of lipid-raft reconstitution in model membranes, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 281–285.
- [164] I. Mey. Elastizität porenüberspannender Membranen: Eine kraftmikroskopische Studie, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2009**.
- [165] a) T. D. Lazzara, C. Carnarius, M. Kocun, A. Janshoff, C. Steinem. Separating attoliter-sized compartments using fluid pore-spanning lipid bilayers, *ACS Nano* **2011**, *5*, 6935–6944.
- b) T. D. Lazzara, T.-T. Kliesch, A. Janshoff, C. Steinem. Orthogonal functionalization of nanoporous substrates: control of 3D surface functionality, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 1068–1076.
- [166] G. Gupta, A. Surolia. Glycosphingolipids in microdomain formation and their spatial organization, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1634–1641.
- [167] S. M. Pontier, F. Schweisguth. Glycosphingolipids in signaling and development: From liposomes to model organisms, *Dev. Dyn.* **2011**, *241*, 92–106.
- [168] I. Carton, L. Malinina, R. P. Richter. Dynamic modulation of the glycosphingolipid content in supported lipid bilayers by glycolipid transfer protein, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 2947–2956.
- [169] a) Y. Kaizuka, J. T. Groves. Structure and dynamics of supported intermembrane junctions, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 905–912.
- b) B. L. Stottrup, S. L. Veatch, S. L. Keller. Nonequilibrium behavior in supported lipid membranes containing cholesterol, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2942–2950.
- [170] P. G. Yancey, W. V. Rodriguez, E. P. Kilsdonk, G. W. Stoudt, W. J. Johnson, M. C. Phillips, G. H. Rothblat. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 16026–16034.
- [171] S. L. Veatch, P. Cicuta, P. Sengupta, A. Honerkamp-Smith, D. A. Holowka, B. Baird. Critical Fluctuations in Plasma Membrane Vesicles, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 287–293.

- [172] E. Elizondo, J. Larsen, N. S. Hatzakis, I. Cabrera, T. Bjørnholm, J. Veciana, D. Stamou, N. Ventosa. Influence of the preparation route on the supramolecular organization of lipids in a vesicular system, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1918–1921.
- [173] a) L. Cantu', M. Corti, P. Brocca, E. Del Favero. Structural aspects of ganglioside-containing membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 202–208. b) L. Cantù, E. Del Favero, S. Sonnino, A. Prinetti. Gangliosides and the multiscale modulation of membrane structure, *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164*, 796–810.
- [174] A. T. Hammond, F. A. Heberle, T. Baumgart, D. A. Holowka, B. Baird, G. W. Feigenson. Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2005**, *102*, 6320–6325.
- [175] K. Bacia, P. Schwille, T. Kurzchalia. Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2005**, *102*, 3272–3277.
- [176] L. Kuerschner, C. S. Ejsing, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. I. Anderson, C. Thiele. Polyene-lipids: a new tool to image lipids, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 39–45.
- [177] C. R. Mateo, A. A. Souto, F. Amat-Guerri, A. U. Acuña. New fluorescent octadecapentaenoic acids as probes of lipid membranes and protein-lipid interactions, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2177–2191.
- [178] J. Rozema, J. van de Staaij, L. O. Björn, M. Caldwell. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation, *Trends Ecol. Evol.* **1997**, *12*, 22–28.
- [179] a) P. E. Stein, A. Boodhoo, G. J. Tyrrell, J. L. Brunton, R. J. Read. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*, *Nature* **1992**, *355*, 748–750.
b) M. E. Fraser, M. M. Chernai, Y. V. Kozlov, M. N. James. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 59–64.
- [180] Y. Mao, Z. Shang, Y. Imai, T. Hoshino, R. Tero, M. Tanaka, N. Yamamoto, K. Yanagisawa, T. Urisu. Surface-induced phase separation of a sphingo-

- myelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerates A β oligomerization, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1798, 1090–1099.
- [181] K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, Y. Ihara. GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A β): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease, *Nat. Med.* **1995**, 1, 1062–1066.
- [182] O. Ekholm, S. Jaikishan, M. Lönnfors, T. K. M. Nyholm, J. P. Slotte. Membrane bilayer properties of sphingomyelins with amide-linked 2- or 3-hydroxylated fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1808, 727–732.
- [183] D. N. Arvanitis, W. Min, Y. Gong, Y. M. Heng, J. M. Boggs. Two types of detergent-insoluble, glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains from isolated myelin, *J. Neurochem.* **2005**, 94, 1696–1710.
- [184] K. K. Halling, B. Ramstedt, J. H. Nyström, J. P. Slotte, T. K. M. Nyholm. Cholesterol interactions with fluid-phase phospholipids: effect on the lateral organization of the bilayer, *Biophys. J.* **2008**, 95, 3861–3871.

8 Anhang

8.1 Symbolverzeichnis

A	Fläche
A_D	Domänenfläche
C	Zirkularität
c	Konzentration
γ	Linienspannung
D	Diffusionskoeffizient
d	Auflösungsgrenze
E_γ	Linienenergie
F	Kraft
f_0	Resonanzfrequenz
F_i	Immobiler Anteil
F_m	Mobiler Anteil
Δh	Höhendifferenz
k	Federkonstante
λ	Wellenlänge
M	Molare Masse
n	Brechungsindex
NA	Numerische Apertur
Π	Oberflächendruck
σ_{Sub}	Oberflächenspannung der Subphase
σ_{Film}	Oberflächenspannung der filmbedeckten Subphase
T_m	Umwandlungstemperatur

t	Zeit
τ_D	Halbwertszeit
U	Umfang
ω	Radius des ROI

8.2 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>Atomic Force Microscope</i>)
CLSM	Konfokales Laserrastermikroskop (<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>)
COase	Cholesterin-Oxidase
CPEO3	Cholesterylpolyethylenoxythiol
CTxB	Cholera Toxin B-Untereinheit
DHPE	1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerin
DPhPC	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DRM	Detergensresistente Membranen
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot Spektroskopie
GalCer	Galactocerebrosid
Gb ₃	Globotriaosylceramid
G _{M1}	Monosialogangliosid
GPMV	<i>Giant Plasma Membrane Vesicle</i>

GUV	Riesiger, unilamellarer Vesikel (<i>Giant Unilamellar Vesicle</i>)
h	Stunde
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
ITC	Isothermale Kalorimetrie
ITO	Indiumzinnoxid (<i>Indium Tin Oxide</i>)
L_{α}	Flüssig-kristalline Phase
L_{β}'	Gelphase
l_d	<i>liquid-disordered</i>
l_o	<i>liquid-ordered</i>
LUV	Großer unilamellarer Vesikel (<i>Large Unilamellar Vesicle</i>)
M	molar
m β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
min	Minute
PALM	<i>Photoactivated Localization Microscopy</i>
P_{β}'	<i>Ripple-Phase</i>
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerin
ROI	<i>Region Of Interest</i>
s	Sekunde
S_o	Gelphase
SSM	Festkörperunterstützte Membran (<i>Solid-Supported Membrane</i>)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SFM	<i>Scanning Force Microscopy</i>
STM	<i>Scanning Tunneling Microscopy</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
STORM	<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
STxB	Shiga Toxin B-Untereinheit
SUV	Kleiner unilamellarer Vesikel (<i>Small Unilamellar Vesicle</i>)
TIRF	<i>Total Internernal Reflection Fluorescence</i>

8.3 Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

8.3.1 Chemikalien

Ammoniak	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Argon	Air Liquide Deutschland GmbH (Düsseldorf)
β -Bodipy [®] C12-HPC	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
C11 TopFluor-Sphingomyelin	Avanti Polar Lipid (Alabaster, USA)
Calciumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Chrom	Umicore Materials AG (Balzers, Liechtenstein)
Chloroform	VWR International (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
DOPC	Avanti Polar Lipid (Alabaster, USA)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Gb ₃ (aus Schweine-Erythrozyten)	Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
G _{M1}	Avanti Polar Lipid (Alabaster, USA)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Mucosol	Merck KGaA (Darmstadt)
Oregon Green DHPE	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Pacific Blue DMPE	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Perylen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>n</i> -Propanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Salzsäure	Merck KGaA (Darmstadt)

Sphingomyelin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Sucrose	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
TexasRed DHPE	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg)
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

8.3.2 Materialien

<i>Cantilever</i> CSC 38	MikroMasch (Tallin, Estland)
Eppendorf-Cups	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Gold-Target	Elektronen Optik Service GmbH (Dortmund)
ITO-Gläser	Präzisions Glas & Optik GmbH (Iserlohn)
Kupferklebeband	Präzisions Glas & Optik GmbH (Iserlohn)
Mica	Plano GmbH (Wetzlar)
Petrischalen	VWR International (Darmstadt)
Polycarbonatmembran	Avestin (Ottawa, Kanada)
Poröse Substrate	fluXXion (Eindhoven, Niederlande)
Siliziumträger	CrysTec (Berlin)
Schleifpapier P100	AEG (Frankfurt/Main)
Schwingquarz für MTM20	Elektronen Optik Service GmbH (Dortmund)
Titan-Target	Elektronen Optik Service GmbH (Dortmund)

8.3.3 Geräte

Konfokales Laserrastermikroskop (CLSM)

LSM 710 Examiner	Carl Zeiss GmbH (Jena)
Objektiv W Plan-Apochromat (63×, NA 1,0)	Carl Zeiss GmbH (Jena)

Rasterkraftmikroskop (AFM)

NanoWizard I JPK Instruments (Berlin)

NanoWizard II JPK Instruments (Berlin)

Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop

Axiotech Vario Carl Zeiss GmbH (Jena)

Filtersatz 44 Carl Zeiss GmbH (Jena)

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

Filtersatz 45 Carl Zeiss GmbH (Jena)

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

Filtersatz 47 Carl Zeiss GmbH (Jena)

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

Objektiv W Achromplan Carl Zeiss GmbH (Jena)

(40×, NA 0,8)

Wilhelmy-Filmwaage

RK 1 Standard Langmuir Trough Riegler & Kirstein GmbH (Potsdam)

Reinstwasseranlage

Milli-Q Gradient A10 Millipore (Eschborn)

Milli-Q Elix 5 Millipore (Eschborn)

Kathodenzerstäuber

Sputter Coater 108 auto Cressington Scientific Instruments (Watford, UK)

Thickness Controller MTM20 Cressington Scientific Instruments (Watford, UK)

Plasmacleaner

PDC 32 G-2 Harrick Plasma (Ithaca, USA)

Sonstige Geräte

Frequenzgenerator Agilent 33220A	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Miniextruder LiposoFast	Avestin (Ottawa, Kanada)
Osmometer Osmomat 030	Gonotec GmbH (Berlin)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Ultraschallbad Sonorex RK 255 H	Bandelin (Berlin)
Vakuumentrockenschrank VD 23	Binder GmbH (Tuttlingen)

8.3.4 Software

AxioVision 4.8 LE	Carl Zeiss GmbH (Jena)
Data Processing Software 4.0	JPK Instruments (Berlin)
Gwyddion 2.25	http://gwyddion.net
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij
Origin 7G	OriginLab Corporation
SPM Desktop 4.0	JPK Instruments (Berlin)
ZEN 2008	Carl Zeiss GmbH (Jena)
ZEN 2009 LE	Carl Zeiss GmbH (Jena)

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an erster Stelle bei Frau Prof. Dr. Claudia Steinem für das interessante Thema und die hervorragende Betreuung, einschließlich der hilfreichen Diskussionen, bedanken.

Herrn Dr. Dirk Fasshauer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Winfried Römer vom *Institut für Biologie II/BIOSS* in Freiburg sowie Ludger Johannes vom *Institut Curie* in Paris möchte ich mich für die Bereitstellung des Shiga Toxins bedanken.

Die Glykosphingolipide wurden von Annika Ries und Lukas Patalag aus dem Arbeitskreis PD Dr. D. B. Werz synthetisiert. Außerdem ermöglichten Christoph Pieper (Arbeitskreis Prof. Dr. J. Enderlein) und Matthias Grunwald (Arbeitskreis Prof. Dr. P. J. Walla) die Untersuchung des fluoreszenzmarkierten Galactocerebroside. Danke für die tolle Zusammenarbeit mit euch!

Bei meinen Bachelorstudenten Ole, Martin und Waldemar möchte ich mich für die Unterstützung bedanken. Vor allem danke ich Ole, der mir bei unseren Diskussionen immer gute Denkanstöße gab.

Christian, Christoph, Daniel, Dany, Ingo, Julia und Ole danke ich für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit und die hilfreichen Kommentare und Anmerkungen.

Weiterhin danke ich unseren technischen Angestellten Jutta und Micha für die Hilfsbereitschaft im Laboralltag sowie Marianne und Frau Gastrock für die Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen.

Der ganzen Arbeitsgruppe danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und den tollen Zusammenhalt. Danke für die Hilfe und Unterstützung bei allen wissenschaftlichen und sonstigen Dingen, vor allem für den Spaß, den wir im Labor, bei Grillabenden, Messzeiten und im Kaffeeraum hatten.

Bei allen Hersfelder- und Göttinger-Freunden möchte ich mich für die Freundschaft und den Spaß, den wir abseits des Studiums hatten, bedanken. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet!

Ein großer Dank geht an meine Familie für die Unterstützung! Ich konnte mich die ganze Zeit auf euch verlassen und ihr habt mir immer den Rücken gestärkt.

Danke, Sabrina, dass du immer für mich da bist! Ich könnte mir keinen besseren Menschen an meiner Seite vorstellen und freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft.