

# Kraftspektroskopie an lebenden Zellen

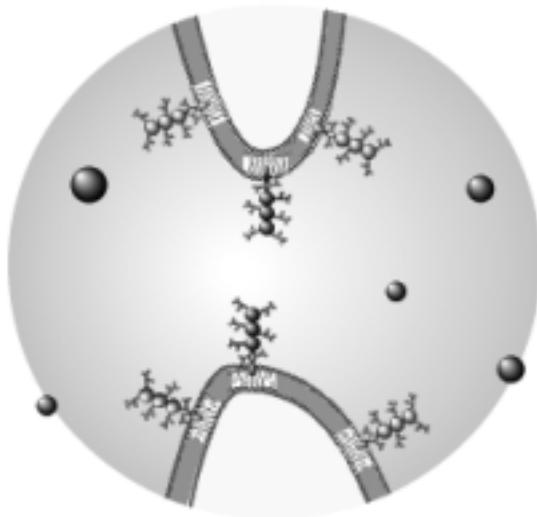
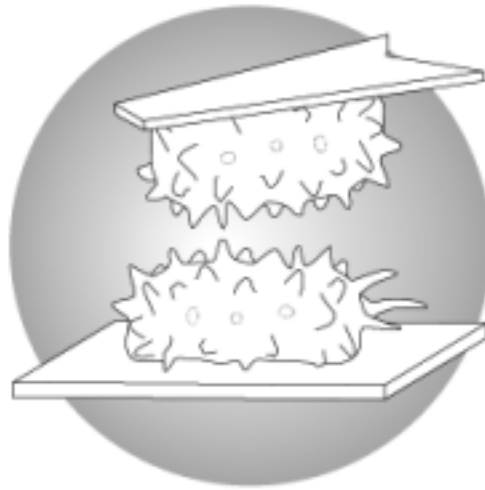
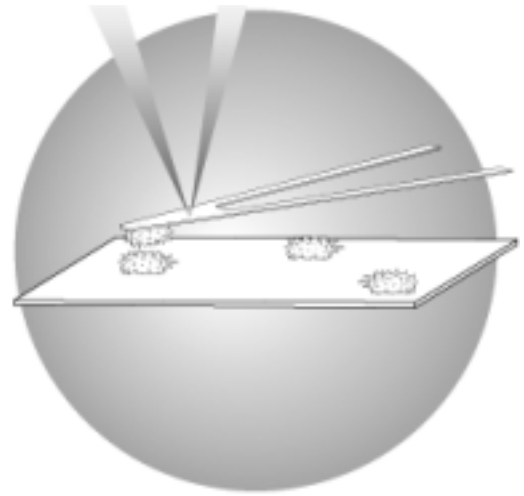
# **Kraftspektroskopie an lebenden Zellen**

**Dissertation an der Fakultät für Physik  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

**vorgelegt von**

**Martin Benoit  
aus München**

**zu München, am 14. Februar 2000**



Erster Gutachter:  
Zweiter Gutachter:  
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Hermann Gaub  
Prof. Dr. Hartmut Wiesner  
18. Dezember 2000

# Danksagung

Zu aller erst bedanke ich mich für die geniale Teamarbeit mit Dr. Wolfgang Dettmann, Alias Wolferl, über den gesamten Zeitraum der Arbeit. Ohne seine beharrliche Zielstrebigkeit im Kampf gegen das Datenchaos, seine Akrobatik beim Sprechen mit Rechnern und beim Kochen sowie seine freundschaftliche Art der Zusammenarbeit im erfolgreichsten Team mit Dr. Michel Grandbois ("ach so"), und später auch Angelika Wehle ("Du bist aber übsch") wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen! Besonderer Dank auch dem großen Meister, der auf wunderbare Weise alles organisierend überblickt und diese Arbeit ermöglicht hat: Prof. Dr. H. E. Gaub, alias Gambi. Für die Unterstützung in der längst vergessenen Anfangsphase: Markus Ludwig und Manfred Radmacher für den "AFM-Rohling", Martin Stark für den Plasmonenaufbau und Matthias Rief für den Durchblick ("nicht wirklich") und der Lapsuniversität für die zuteil gewordene Ehre eines Gastaufenthalts. Ganz herzlicher Dank gilt den lieben Menschen "hinter den Scheinwerfern": allen voran Manfred Reitmeier und Sabine Kröll, wie auch Herrn Wieser und dem Werkstatt-team unter Leitung von Herrn Wolf. Besonders elementar für diese Arbeit war die Zusammenarbeit mit René Röspel (MdB) und Dr. Michael Thie unter Prof. H.-W. Denker am Uniklinikum in Essen "an der Cote da Ruhr" sowie mit dem MPI in Martinsried: Dr. Daniela Gabriel, bei Dr. Günther Gerisch (Zellbiochemie) und Dr. Magdalena Götz (Neurologie). Für die Nachbarschaftshilfe bedanke ich mich bei Dr. Sabine André in der Tiermedizin für die Lektine, bei Dr. Armin Kriele (LS Kotthaus) für die genialen REM-Bilder sowie bei Carsten Sönnichsen (LS Feldmann) und bei "Hildegard" (Cafe Amalienstraße) für die "Plasmonen"...

(...und meinem grünen VW-Bus)

Für die zuverlässige Unterstützung und Zellkulturbetreuung: Angelika Kardinal und Agnes Mühlfeldner (LMU, München), Evi Simmeth (Zellbiochemie) und Müçella Öçalan (Neurologie) (MPI, Martinsried) sowie Birgit Maranca-Nowak und Ulrike Trottenberg (UNI, Essen).

Ein kollektives Riesendankeschön gilt den Mitgliedern der - außer im Fußball - unschlagbaren Gambicrew für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Namentlich seien aus Platzgründen stellvertretend Jan Domke (bester Gitarrist, Hofphotograf und Kollege aller Zeiten), Albert Thumann (wir machen noch eine Session - versprochen), Claudia Friedsam (für die unvergessenen Tangostunden...), Michael George, Max Kessler (ois leiwand), Rupert Krautbauer (jetzt kümmerge ich mich wieder um die Highscores!), Michael Kudera, Rainer Matzke (die besten Experimente macht Rainer und sonst keiner), Filipp Oesterhelt (die guten Physiker fahren die größten Segelboote...), Hauke Clausen-Schaumann, Wolfgang Parak, Silke Dannöhl (gut bedampft - gut gelaunt), Stefan Kölblin, Hong-Bin Li (ni-hau), Carsten Löbbbecke, Alexander Schemmel (werd scho), und mein langjähriger Mitbewohner Timo Wandel genannt. Für die hilfreiche seelische, geistige, moralische, gastfreundliche und kulinarische Hintergrundunterstützung (auch bei auswärtigen Meß- und Tagungsaufenthalten): Kornelia Rassmann, Thomas Eisenhammer, Sonja Krainhöfner, Frank Pompe, Daniel J. Müller, Eva Gahl, Heike und Andreas Hoffmann, Gundel & Gerhard Hager, der Familie Gaub und in ganz besonderer Weise für die aufopfernde Hilfe meiner lieben Anja.

Zu guter Letzt meinen Eltern, die es trotz der Kompliziertheit der Zelladhäsion geschafft haben mich irgendwie doch in diese Welt zu bringen...

Alle die sich trotz meiner tiefsten Dankverpflichtung nicht auf dieser gekürzten Zusammenstellung wiedergefunden haben sollten, bitte ich vielmals um Verzeihung - und:

**"herzlichsten Dank!"**

# Inhalt

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
2.1	DIE ZELLE .....	6
2.1.1	Das Zytoskelett.....	7
2.1.2	Die Zellmembran .....	7
2.2	ZELLADHÄSION.....	9
2.2.1	Zelladhäsionsproteine.....	9
2.2.2	Adhäsionsmechanismen.....	11
2.2.3	Adhäsionsstrategien .....	13
<b>3</b>	<b>DIE KRAFTSPEKTROSKOPIE</b> .....	<b>15</b>
3.1	DAS KRAFTSPEKTROSKOP.....	15
3.1.1	Aufbau.....	15
3.1.2	Die Kraft-Abstands-Kurve .....	16
3.1.3	Das Kraftspektrum .....	18
3.2	METHODEN DER ZELLADHÄSIONSMESSUNG.....	19
3.3	DAS ZELLADHÄSIONSKRAFTSPEKTROSKOP.....	24
3.3.1	Aufbau.....	24
3.3.2	Betriebsmodi.....	25
3.3.3	Kraftsensor Modifikationen.....	25
3.4	WECHSELWIRKUNGEN IN FLUIDEN MEDIEN.....	26
3.4.1	Statische Nahkräfte .....	27
3.4.2	Dynamische Kräfte.....	28
3.5	ADHÄSIONSKRAFTMESSUNGEN AN ZELLEN.....	29
3.5.1	Quantifizierung der Adhäsion.....	29
3.5.2	Schwierigkeiten und Artefakte .....	29
<b>4</b>	<b>ZELLINTERAKTIONEN MIT OBERFLÄCHEN</b> .....	<b>30</b>
4.1	KRAFTMESSUNGEN UNSPEZIFISCHER ADHÄSIONEN.....	30
4.2	ELASTIZITÄTSMESSUNGEN.....	33
4.3	VISKOSITÄTSMESSUNGEN.....	33
4.4	DAS ZELL-TETHER-MODELL.....	36
4.4.1	Bindungsbildung.....	37
4.4.2	Die Bindungstrennung .....	39
4.5	ZELLEN AM KRAFTSENSOR .....	47

<b>5</b>	<b>INTERAKTIONEN ZWISCHEN ZELLVERBÄNDEN .....</b>	<b>50</b>
5.1	UTERUS UND TROPHOBLASTZELLEN ALS MODELLSYSTEM .....	50
5.1.1	<i>Der Uterus.....</i>	50
5.1.2	<i>Experimenteller Aufbau.....</i>	52
5.1.3	<i>Uterus Epithel- und Trophoblast- Zelllinien .....</i>	52
5.1.4	<i>Adhäsionen zwischen JAR- und HEC-Zellschichten .....</i>	54
5.1.5	<i>Adhäsionen zwischen JAR- und RL-Zellschichten .....</i>	56
5.1.6	<i>Die Rolle des Fibronektins.....</i>	57
5.2	AUSBLICK.....	58
<b>6</b>	<b>INTERAKTIONEN ZWISCHEN EINZELNEN ZELLEN .....</b>	<b>59</b>
6.1	ROTE BLUTKÖRPERCHEN ALS MODELLSYSTEM.....	59
6.1.1	<i>Grundlegende Eigenschaften der RBC .....</i>	59
6.1.2	<i>Die Lektineinzelbindung.....</i>	62
6.1.3	<i>Tether.....</i>	63
6.2	DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM ALS MODELLORGANISMUS.....	64
6.2.1	<i>Der Lebenszyklus von Dictyostelium discoideum.....</i>	64
6.2.2	<i>Kraftspektroskopische Messungen.....</i>	67
6.2.3	<i>Einzelmolekülbetrachtungen.....</i>	80
6.2.4	<i>Diskussion.....</i>	84
6.3	SCHLUßBEMERKUNG .....	86
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>97</b>
A	MATERIAL UND METHODEN.....	A2
A.1	<i>Das Zelladhäsionskraftspektroskop .....</i>	A 2
A.2	<i>Beschichtungen und funktionale Oberflächen.....</i>	A 3
A.3	<i>Kraftsensormodifikationen.....</i>	A 16
A.4	<i>Zellen und Zellkulturtechniken .....</i>	A 21
A.5	<i>Chemikalien, Lösungen und Medien .....</i>	A 25
B	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	A 28

# 1 Zusammenfassung

Das Kraftmikroskop hat sich in vieler Hinsicht als effizientes Gerät für Untersuchungen und Manipulationen auf molekularer Ebene erwiesen. Dabei wird selbst unter physiologischen Bedingungen eine Auflösung erreicht, die Proteinsubstrukturen erkennen läßt. Als Kraftspektroskop kann es mechanische Eigenschaften wie Dehnungsverhalten und Reißfestigkeit einzelner Moleküle, die zwischen der Sensorfeder und der Unterlage eingespannt werden, untersuchen. Sogar die Bindungskräfte zwischen einem Molekül am Kraftsensor und einem anderen am Substrat können mittels Kraftspektroskopie mit etwa 3 pN Genauigkeit ermittelt werden. Von besonderem Interesse solcher Untersuchungen sind Moleküle mit spezifischer Affinität nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip, wie Rezeptor-Ligand-Systeme und Adhäsionsmoleküle.

Bisher waren hauptsächlich wasserlösliche Moleküle solchen Messungen zugänglich. Bindungen zwischen amphiphilen Proteinen oder Membranproteinen zu messen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen in der Membran verankert sind, erfordert neue Konzepte. Diesen Molekülen gilt das Augenmerk dieser Arbeit. Da die Verankerung in sogenannten „supported bi-layers“ und Vesikeln nicht immer zum gewünschten Erfolg führt, wird hier eine ungewöhnliche, aber sehr natürliche Alternative vorgestellt:

Das Adhäsionsmolekül wird nicht aufwendig isoliert und der Meßmethode zugänglich gemacht, sondern bleibt in seiner natürlichen Umgebung, der Zelle, wohingegen die Methode angepasst wird. Dies ist durch die Befestigung einer Zelle am Kraftsensor eines Kraftspektroskopes geglückt und es gelang damit erstmals die Adhäsionskraft eines einzelnen Adhäsionsmoleküls in einer lebenden Zelle zu messen.

So einfach diese Methode beschrieben ist, so viele Unwägbarkeiten treten dabei durch die hohe Komplexität der Zelle und der Zelloberfläche im Besonderen auf. Daher wird einleitend eine grobe Einführung in die Funktionen und den Aufbau einer Zelle und die üblichen Meßmethoden im Bereich der Zelladhäsionsmessung vorgestellt. Die Beschreibung der Meßmethode und der Umrüstung des Kraftmikroskopes zum Zelladhäsionskraftspektroskop sind durch technische Details im Anhang vervollständigt. Etwas aufwendig ist die Zusammenstellung der Daten, Theorien und Annahmen zum Aufbau eines semi-empirischen Modells zur Beschreibung der Adhäsionskraftmeßkurven beim Trennen adhärrierender Zellen, auf der Basis vieler unabhängiger Einzelmolekülbindungen. Mit dem Zelladhäsionskraftspektroskop wurden dafür die Youngs-Moduli und die visko-elastischen Kelvin-Modell-Parameter verschiedener Zellen in dem eigens entwickelten „visko-elastic-response-mode“ vermessen. Ebenso wurden die

Einflüsse der Zellkontaktkraft und der Kontaktzeit, sowie der Zuggeschwindigkeit auf die Zelladhäsionsantwort studiert und in Formeln gefaßt. Das Modell simuliert diese Meßdaten in guter Übereinstimmung und gibt dadurch einen Einblick in die physikalischen Randbedingungen für das einzelne Adhäsionsmolekül während solcher Experimente unter Berücksichtigung des zelltypischen Phänomens der Tetherbildung. Insbesondere kann damit die Bindungsdichte bei Adhäsionen auf verschiedenen Oberflächen berechnet werden. Demnach schließt eine Epithelzelle etwa vier Bindungen pro Quadratmikrometer mit einer Glasoberfläche, zwei mit einer anderen Epithelzelle und nur 0,8 mit einer passivierten Oberfläche.

Mit kraftspektroskopischen Messungen der Adhäsionskräfte bei der Einnistung eines Trophoblasten in die Gebärmutter an einem naturnahen Laborsystem kann eine andersartige - mit dem Modell unabhängiger Bindungen nicht beschreibbare - Wechselwirkung identifiziert werden. Die Meßergebnisse deuten auf einen kooperativen Prozeß der molekularen Adhäsionsinselbildung hin. Kontrollmessungen an funktionalisierten Oberflächen erhärten diese Hypothese. Mit ersten Ergebnissen von Adhäsionsmessungen zwischen Knochenzellen und potentiellen Implantatoberflächen wird neben dem Einfluß der Oberflächenbeschaffenheit auch der des Meßmediums nachweisbar, wodurch die Generalität dieser Methode verdeutlicht wird.

Im letzten Kapitel über die Interaktionen einzelner Zellen wird anhand der induzierten Lektinwechselwirkung zwischen roten Blutkörperchen die prinzipielle Möglichkeit der Zelladhäsionskraftspektroskopie Einzelmolekülereignisse zu vermessen nachgewiesen. Die dafür nötigen geringsten Kontaktkräfte von unter 40 pN, konnten durch extrem weiche Kraftsensoren (<5 mN/m) verwirklicht werden.

Schließlich gelang die Vermessung der wahrscheinlichsten Abrißkraft der homophilen Einzelmolekülwechselwirkung des Adhäsionsproteins csA am Einzeller *Dictyostelium discoideum*. Sie beträgt bei einer Zuggeschwindigkeit von etwa 2  $\mu\text{m/s}$  22.5 pN  $\pm$  5 pN. Mit einer *Dictyostelium*mutante, bei der die Verankerung des csA-Moleküls in der Membran verstärkt war, konnte zudem nachgewiesen werden, daß nicht etwa die Haltekraft des Lipidankers gemessen wurde. Die An- und Abschaltbarkeit der csA- Wechselwirkung, sowie die wirksame Unterdrückung kompetitiver Adhäsionsmoleküle durch Kalziumentzug waren dabei von entscheidender Bedeutung für den Nachweis der Spezifität und Effektivität dieser Meßmethode.



## 2 Einleitung

Die in dieser Arbeit untersuchte Zelladhäsion ist eine Überlebensgrundlage für alle Zellen. Für Einzeller ist bei der Fortbewegung und Nahrungsaufnahme vornehmlich die unspezifische Adhäsion wichtig, während spezifische Zell-Zell-Kontakte und Zellerkennung zur Entwicklung höherer Eukaryonten entscheidend sind: Die Bewerkstelligung einer Immunantwort, die Bildung und Abgrenzung von Organen [1], der Aufbau von Nervenverbindungen [2,3], aber auch das Einnisten einer frisch befruchteten Eizelle an der richtigen Stelle der Gebärmutter [4] hängen von spezifischen Zelladhäsionsmolekülen ab. Darüber hinaus sind in der neueren Krebsforschung Zelladhäsionsvorgänge wichtige Untersuchungsbereiche, um über die Zell-Zell-Erkennung und Metastasenbildung Erkenntnisse zu gewinnen [5].

Allerdings ist die Adhäsion zwischen Zellen von vielen Einflußgrößen in zum Teil sehr komplexer Weise abhängig. Da die Umgebungsbedingungen den Ausgang eines Zellexperimentes stark beeinflussen können muß darauf geachtet werden, daß sie möglichst der natürlichen Umgebung der Zelle entsprechen. Während die klassisch analytische Forschung versucht die Zelladhäsionsmoleküle zu isolieren und zu charakterisieren um diese Ergebnisse wieder in ein Gesamtbild zusammenzufügen, sollen hier die Adhäsionsmoleküle in ihrem komplexen, natürlichen Kontext belassen werden. Bei dieser „ganzheitlichen Methodik“ werden Zellen mit einem Kraftmikroskop mit verschiedenen Reaktionspartnern zusammengebracht, um aus dem Verlauf der zum Trennen der Zellen benötigten Kraft Rückschlüsse auf Adhäsionsmechanismen bis hinab zur Ebene einzelner Moleküle zu gewinnen. Da Zellen wegen ihrer Komplexität viele Umweltveränderungen ohne erkennbare Veränderungen ausgleichen können, sind einerseits solche Experimente an lebenden Zellen erst möglich, andererseits können scheinbar belanglose Veränderungen der Randbedingungen den Ausgang eines Experimentes stark beeinflussen. Aus der Zusammenarbeit mit kompetenten BiologInnen, MedizinerInnen und ChemikerInnen konnten alle für diese Messungen notwendigen Randbedingungen realisiert werden.

Um einen kleinen Überblick über grundlegende Vorgänge in der Zelle [6] zu geben, soweit sie für diese Arbeit von Bedeutung sind, werden im folgenden einige Funktionen der Zelle und ihrer Organelle vorgestellt.

## 2.1 Die Zelle<sup>1</sup>

Als zentraler Bestandteil allen Lebens hat die Zelle ihre Funktionen, ihren Aufbau und ihre Organelle über Jahrmillionen optimiert (Abb. 2.1). Eine Zellmembran schützt den Mikrokosmos vieler Proteine gegen schädliche Einflüsse der Umgebung. Viele Zellen sind erstaunlich vielfältige Einzelkämpfer, andere hochspezialisierte Zellen teilen ihre Aufgaben in einem komplexen Organismus untereinander auf. Zur Energiegewinnung verarbeitet die pflanzliche Zelle, CO<sub>2</sub> mit Hilfe von Sonnenlicht zu Sauerstoff und Kohlenstoffverbindungen. Die Mitochondrien versorgen die Tier- und Pflanzenzellen mit den universellen Energiepaketen aus ATP durch die Oxidation von Kohlenstoffverbindungen mit Sauerstoff zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O.

Der Bauplan eines Organismus befindet sich im Zellkern in Form von Genen in der DNS. Die Gene enthalten Blaupausen zur Konstruktion bestimmter Proteine. Die Speicherorte der Gene sind durch **Promotoren** indiziert und werden von bestimmten "Lesemolekülen" erkannt. Diese Promotoren sind je nach Bedarf der Zelle aktiv oder gesperrt. Bei der **Expression** eines Gens wird die aktivierte Information als m-RNS abgelesen und zum endoplasmatischen Retikulum (den Proteinsynthesemaschinen) transportiert. Dort wird die m-RNS zur Herstellung der genetisch kodierten Proteine übersetzt (transkribiert), die dann über verschiedene Transportmechanismen in der Zelle verteilt werden. Der Golgi Apparat ist ein labyrinthartiges Röhrengeflecht zum Stofftransport aus dem Inneren der Zelle. Dort erfolgt die Sortierung und zusätzliche Prozessierung der frisch synthetisierten Proteine, wie z.B. die Glykosilierung.

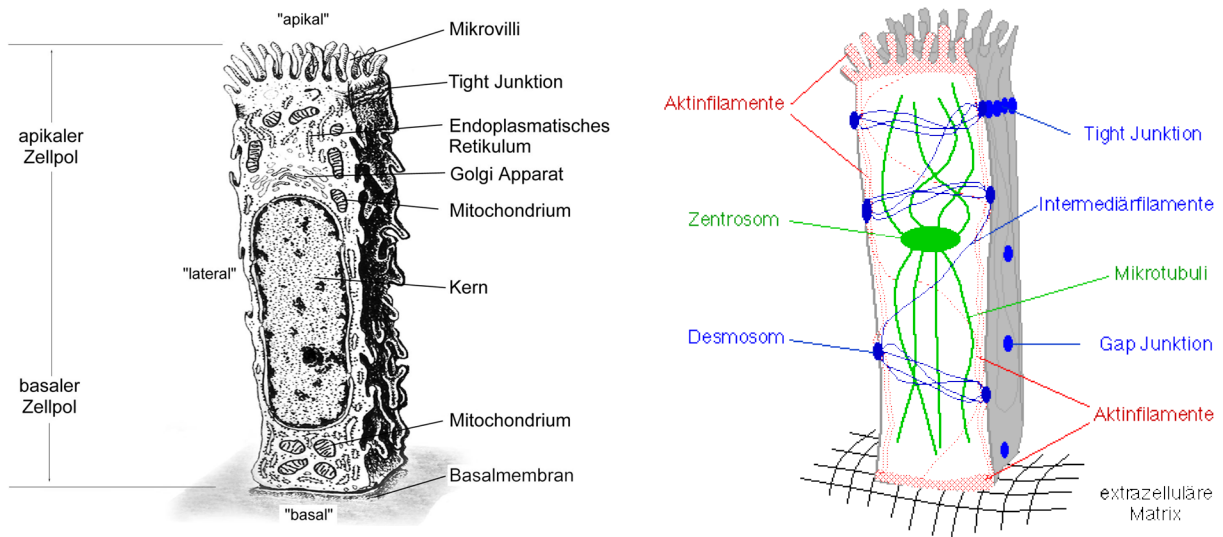


Abb. 2.1: Die Epithelzelle (verändert nach [7]) ist polarisiert und stabilisiert sich und den Zellverband durch ihr Zytoskelett sowie die damit verknüpften Junctionen.

<sup>1</sup> Diese Einführung ist für den nicht biologisch vorgebildeten Leser gedacht - alle anderen mögen anhand der Überschriften zum Unbekannten vorspringen.

Die Gesamtheit der zellulären Informationsflüsse geben der Zelle ihre spezifische Funktion, ihre Erscheinungsform und ihre Zugehörigkeit. Zur Stabilisierung der Zellgestalt werden drei Hauptgruppen von Proteinpolymeren synthetisiert, die das **Zytoskelett** aufbauen.

### 2.1.1 Das Zytoskelett

**Aktinfilamente** (Microfilamente  $\varnothing$  5-9nm) sind am dichtesten direkt an der Zellmembran vertreten und über Ankyrin und Spektrin mit ihr verbunden. Aktinfilamente organisieren die Feinstruktur der Zelloberfläche; wie Mikrovilli (fingerartige Membranausstülpungen), Lamellipodien (flächige Ausstülpungen) und Pseudopodien (aktive Membranfüße). Sie können netzartig oder gebündelt zu Streifasern über starre Filamin-, Fimbrin- oder -Aktininknoten verkettet und mit Tropomyosin verstärkt sein, oder über Myosine gegeneinander verschoben werden (Muskelzellen). Durch die Verbindung mit Adhäsionsmolekülen übertragen sie direkt Adhäsionskräfte auf das Zytoskelett (Abb. 2.5). Auf Zugbeanspruchung reagieren sie wie elastische Federn [8].

**Mikrotubuli** ( $\varnothing$  25nm) sind orientierte Röhren aus Tubulin, deren Minusenden am zellkernnahen Zentrosom zusammenhängen. An ihnen laufen die Motorproteine (Dyneine von plus nach minus und Kinesine in entgegengesetzter Richtung) zu zellulären Transportzwecken entlang [9]. Bei Zugbeanspruchung geben sie sofort nach und reißen schnell [8]. Die **Polarisation** von Zellen, die zur Ausbildung der apikal-basalen Strukturierung führt, wird durch die Aktinfilamente und Mikrotubuli organisiert.

**Intermediäre Filamente** ( $\varnothing$  10nm) sind stabile Polymerfasern aus verschiedenen Faserproteinfamilien. Sie festigen die Form von Zellen und Zellverbänden seilartig zwischen starken Adhäsionspunkten (Desmosomen) und sind extrem hart und reißfest [8].

### 2.1.2 Die Zellmembran

Die aus einer Lipid-Doppelschicht bestehende Zellmembran stellt das Trenn- und Bindeglied des Zellinneren (Zytosol) zur Umgebung dar. Zur Stabilisierung der Zellform ist sie an einigen Stellen über zytosolische Anker-moleküle mit dem Zytoskelett verbunden (z.B. am transmembranen Bande3 - Rezeptor über Ankyrin und Spektrin, das an Aktin koppelt [10]). Bei Epithelzellen im Zellverband unterscheidet man zwischen apikaler (freier) Zellmembran, lateraler Membran (zu benachbarten Zellen) und basaler Zellbasismembran (am Bindegewebe). Dadurch ist die basal-apikale **Polarisation** der Zelle definiert [11,12]. Die **Glykokalyx** aus langkettigen Glykoproteinen in der äußeren Lipidschicht schützt die apikale

Zellmembran vor ungewollten Kontakten mit Fremdkörpern<sup>2</sup> und reaktiven Molekülen [13] und spielt eine wichtige Rolle in der Zellerkennung [14,15].

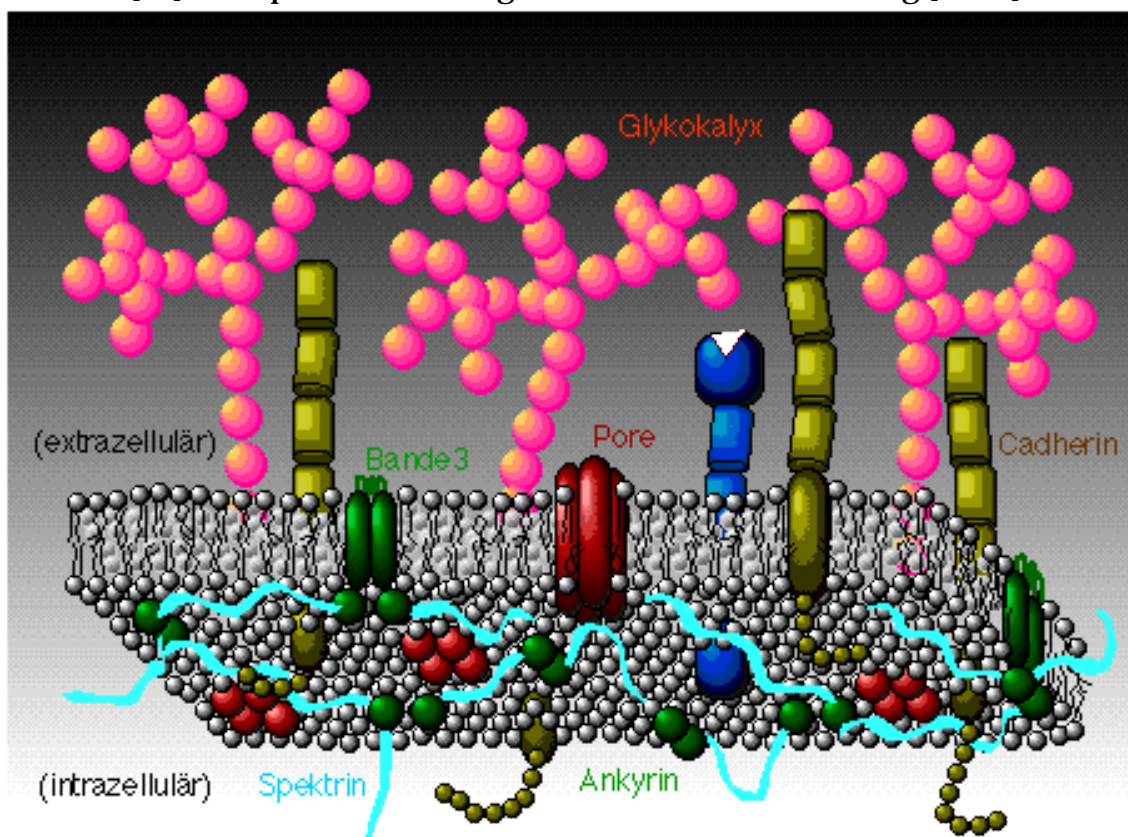


Abb. 2.2: Bild einer Zellmembran: die Lipiddoppelschicht wird verstärkt durch ein Spektrinnetzwerk mit Membran-Ankern. Poren regeln den Transport durch die Membran. Die Glykokalyx schützt die Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle vor ungewollten Kontakten und stellt den „Fingerabdruck“ einer Zelle dar.

Die undurchlässige Zellmembran wird durch Poren für kleine Moleküle (wie Wasser und Aquaporine) permeabel, andere Moleküle müssen über Membrankanäle oder Endozytose (Membraneinstülpungen) ins Zytosol transportiert werden. Nähr-, Abfall- und Botenstoffe können so kontrolliert durch die Zellmembran gelangen. Oft wird eine Kaskade von molekularen Bindungs- und Diffusionsvorgängen bemüht, um Informationen (z.B. in Form von Hormonen) durch die Zellmembran zu transferieren, die im Zellkern bestimmte Promotoren aktivieren oder drosseln sollen. Dafür sitzen vielfältige, oft hochspezifische Rezeptormoleküle in der Membran, von denen einige sich möglicherweise vom Inneren der Zelle in einen adhäsiven Zustand versetzen lassen [16].

Auf diese Weise kann eine Zelle die Signale des Zellverbandes verstehen, bestimmte Stoffe für die Umgebung produzieren oder aus den vorhandenen Stoffen gezielt die benötigten selektieren. Die effizienteste Kommunikation zwischen direkt

<sup>2</sup> Vor allem geladene und leitende Festkörperoberflächen interagieren mit Proteinen und können sie sogar denaturieren.

benachbarten Zellen wird dabei durch Adhäsionsmoleküle und Junctionen bewerkstelligt.

## 2.2 Zelladhäsion

Die Untersuchung der Zelladhäsion ist Voraussetzung für ein grundlegendes Verständnis der Organisation höherer Lebewesen. Einige Adhäsionsmechanismen sind bereits bekannt, wie auch die meisten für die Adhäsion verantwortlichen Moleküle [10]:

### 2.2.1 Zelladhäsionsproteine

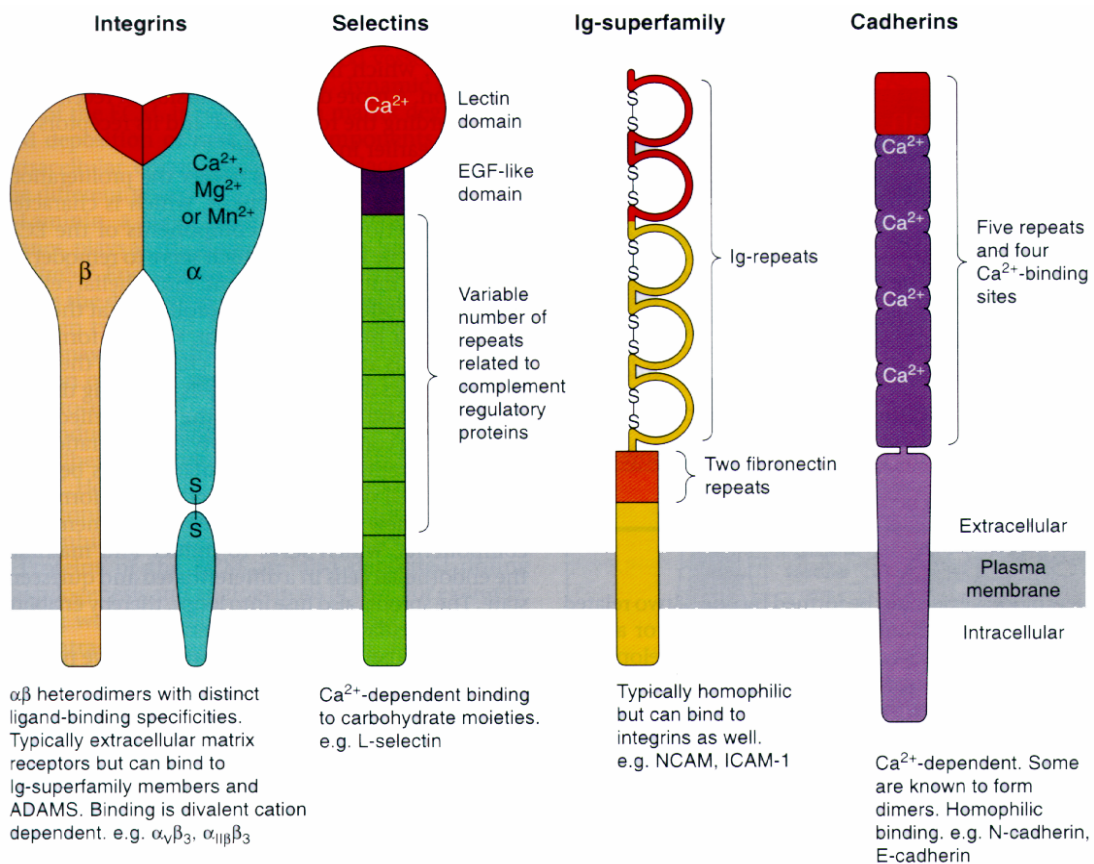


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Zelladhäsionsmoleküle (aus [17]).

Die spezifischen membrangebundenen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle werden als „CAM“ (cell adhesion molecule) bezeichnet. Bindet ein CAM an ein identisches Molekül auf einer benachbarten Zelle, spricht man von **homophiler** Interaktion, während bei der **heterophilen** ein andersartiges Rezeptormolekül gebunden wird. Aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten können die CAM der Wirbeltiere in die vier großen Gruppen der **Immunglobuline (Ig)**, der **Cadherine**, der **Integrine** und der **Selektine** eingeordnet werden [18-20] (Abb. 2.3).

Die Adhäsionsproteine der **Immunglobulin-Superfamilie** sind an vielfältigen zellulären Erkennungsprozessen beteiligt. Die gemeinsame strukturelle Einheit

dieser ersten Gruppe von Proteinen ist die etwa 100 Aminosäuren lange Immunglobulin-Domäne in ihrem extrazellulären Bereich [21]. Diese Adhäsionsmoleküle sind  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige, heterophile oder homophile Zell-Zell-Adhäsionsproteine, mit einer variablen Anzahl von Immunglobulin-artigen Domänen [22].

Die zweite Gruppe der **Cadherine** umfaßt strikt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, homophile Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle. Die Spezifität der Bindung einiger Cadherine wird durch die kurze Peptidsequenz LXXHAVXXNG im N-terminalen Bereich dieses Proteins festgelegt [23]. Die hochkonservierte intrazelluläre Domäne der Cadherine ist mit zytosolischen Proteinen komplexiert, die als Catenine bezeichnet werden und im wesentlichen für die Zytoskelettanbindung verantwortlich sind [24-27]. Die Expression verschiedener Cadherine wird im Verlauf der Embryonalentwicklung zeitlich und gewebsspezifisch reguliert und scheint im Zusammenhang mit der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen wichtig zu sein [28-31].

Als dritte ist die **Integrin**-Superfamilie, eine Gruppe von Rezeptoren die heterophile Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (Abschnitt 2.2.2) vermitteln. Alle Integrine sind heterodimere Moleküle, die sich aus nicht kovalent verknüpften  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzen (Abb. 2.3). Ihre strukturelle Vielfalt entsteht durch zahlreiche Kombinationen zwischen 14 verschiedenen  $\alpha$ - und acht verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten [32]. Die von zweiwertigen Kationen abhängige Bindungsfähigkeit des Liganden und die Spezifität der Bindung sind in den N-terminalen Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit codiert. Einige dieser Rezeptoren erkennen spezifisch die Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD) in ihrem Liganden [33]. Bei manchen Integrinen ist der zytosolische Teil der  $\beta$ -Untereinheit über das Protein Talin mit dem Zytoskelett assoziiert [17,34] (Abb. 5.7).

Die vierte Gruppe von Adhäsionsmolekülen bilden die **LEC-CAMs** ("lectin, epidermal growth factor, complement regulatory - cell adhesion molecules") oder **Selektine**. Diese Glykoproteine weisen sich durch drei charakteristische Proteinmotive in ihrer extrazellulären Domäne aus, die Homologie zu  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen tierischen Lektinen, zum epidermalen Wachstumsfaktor und zu regulierenden Proteinen des Komplement-Systems aufweisen [35,36]. Die Bindung dieser heterophilen Zelladhäsionsmoleküle an die Kohlenhydrat-Bestandteile ihrer Liganden wird durch die N-terminale Lektin-artige Domäne vermittelt [37,38]. Die von diesen Molekülen erkannten - vor allem in der Glykokalyx vertretenen - Oligosaccharid-Determinanten, sind miteinander strukturell verwandt und aus Sialinsäure, Galactose, N-Acetylglucosamin und Fucose zusammengesetzt [39].

## 2.2.2 Adhäsionsmechanismen

Die reversible Interaktion der Adhäsions- und Rezeptormoleküle wird im wesentlichen von drei nichtkovalenten Wechselwirkungen bewerkstelligt. Aus dem geschickt arrangierten Zusammenspiel vieler solcher schwacher Wechselwirkungen läßt sich eine hohe Selektivität und eine genaue Dosierung der Bindungsstärke verwirklichen. Die Reichweite der **elektrostatischen** Kraft zwischen geladenen Gruppen der Adhäsionsmoleküle ist in Salzlösung zwar auf die Debye-Länge verkürzt [40] (Abschnitt 3.4), wirkt aber als erste bei der Annäherung geladener Proteingruppen. Sie kann attraktiv oder repulsiv das Partnermolekül vorpositionieren bis es in die Bindungstasche passt. Die Rolle der **hydrophil-hydrophoben** Wechselwirkung, die auf dem Bestreben der polaren Wassermoleküle zur Wasserstoffbrückenbildung beruht, ist noch relativ unbekannt. Die **Van-der-Waals**-Wechselwirkung (Abschnitt 3.4.1) liefert den schwächsten Beitrag mit der kürzesten Reichweite (4Å) zur nichtkovalenten Bindung. Sie wird durch molekulare Dipolfluktuationen hervorgerufen ihre Wirkung beginnt erst kurz vor der Kontaktdistanz der Bindungspartner. Besonders, wenn die Bindungspartner topographisch gut zueinander passen, kann ihre attraktive Wirkung sehr mächtig werden. Im Bereich weniger Ångström besonders stark sind die **Wasserstoffbrückenbindungen**<sup>3</sup>, die sich jeweils zwischen dem Sauerstoff- und einem Wasserstoffatom, von Wassermolekülen oder anderen Molekülgruppen (etwas allgemeiner betrachtet zwischen Lewis-Basen und elektronegativeren Atomen, den Lewis-Säuren) der Bindungspartner ausbilden können. Aus der Summe der Wechselwirkungen ergibt sich eine Bindungspotentiallandschaft, deren Verlauf in Abb. 2.4 eindimensional stilisiert ist.

Die Schwäche und die Reversibilität der Bindung führen wegen thermischer Fluktuationen zu einem ständigen Binden mit der Reaktionsgeschwindigkeit (Rate)  $k_{\text{on}}$  und wieder Lösen der Bindung mit der Rate  $k_{\text{off}}$ . Das Verhältnis von geschlossener zu offener Bindung wird durch die temperaturabhängige Dissoziationsgleichgewichtskonstante  $K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$  beschrieben.  $K_D$  kann beispielsweise mit oberflächenplasmonenspektrometrischer Messung von  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  bestimmt werden (siehe Anhang).

Nach Van't Hoff und Arrhenius gilt für die Dissoziationsgeschwindigkeit:

$$k_{\text{off}} := \cdot e^{-\frac{G}{k_B T}} \quad (2-1)$$

---

<sup>3</sup> Ein besonders prominentes Beispiel dafür ist die spezifische Kopplung der DNA-Basenpaare.

$v$  ist dabei eine Art „Trägheitsfaktor“ für den Prozeß der Bindungstrennung, der mit der Aktivierungsenergie ( $U - G$ ) korreliert ist. Beim Zusammenschluß der Bindungspartner aus der freien Lösung gilt:

$$G = H - T \cdot S = - \frac{k_B \cdot T}{N_A} \ln(K_D) \quad (2-2)$$

Die Enthalpieänderung  $H$  enthält die Beiträge der oben beschriebenen Wechselwirkungskräfte inklusive etwaiger Konformationsübergänge der Bindungspartner beim Schließen der Bindung. Die temperaturgewichtete Entropiebilanz  $S$  teilen sich das Lösungsmittel als Gewinn oder Verlust an Freiheitsgraden durch das Abgeben der Liganden und die Liganden durch Verlust an Freiheitsgraden beim Schließen der Bindung. Aus kalorimetrischen Messungen kann  $K_D$  und durch Messungen bei verschiedenen Temperaturen können auch die entropischen und enthalpischen Beiträge von  $G$  bestimmt werden [41-43].

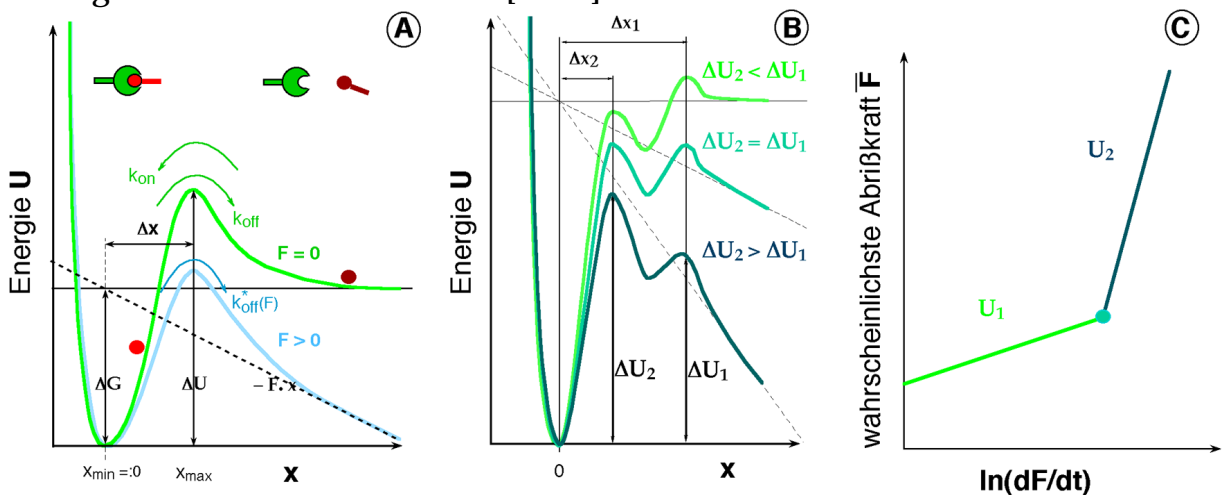


Abb. 2.4: (Kraftabhängige Dissoziation) A: einfaches Potential; B: strukturiertes Potential; C: Verlauf der wahrscheinlichsten Abrißkraft durch Erhöhen der Zuggeschwindigkeit am Potential(B).

Beim Auseinanderreißen einer solchen Bindung wird durch das Anlegen einer äußeren Kraft der Verlauf des Potentials „gekippt“. Dabei verschieben sich die Reaktionskonstanten, und als Formel für die durch die Kraft  $F$  veränderte Rate  $k_{off}^*(F)$  erhält man nach Kramers [44]:

$$k_{off}^*(F) := \kappa^* \cdot e^{-\frac{U-F \cdot x}{k_B T}} \quad (2-3)$$

$\kappa^*$  ist dabei ein Faktor der von der Potentialkrümmung  $\kappa_{min}$  und  $\kappa_{max}$  an dessen -je nach „Verkipfung“ aktuellen- absoluten Extremalstellen und von der Potentialbreite  $x := x_{max} - x_{min}$  abhängt [45]:

$$\kappa^* = \frac{\kappa_{max} \kappa_{min}}{2 (x_{max} - x_{min})} \quad (2-4)$$



Die kraftabhängige Bindungstrennung kann auch über eine Dissoziationswahrscheinlichkeit beschrieben werden:

$$P(F) = \frac{k_{off}^*(F)}{\dot{F}} e^{-\frac{1}{F} \int_0^F k_{off}^*(F) dF} \quad (2-5)$$

Durch Differenzieren dieser Wahrscheinlichkeit unter der Annahme eines zeitlich konstanten Kraftanstieges  $\dot{F} = \text{const}$  erhält man die wahrscheinlichste Kraft, bei der sich die Bindung unter Last trennt [46]. Sie ist logarithmisch vom Kraftanstieg  $\dot{F}$  abhängig:

$$\bar{F} = \frac{k_B T}{x} \ln\left(\frac{\dot{F}}{k_{off}} \frac{x}{k_B T}\right) \quad (2-6)$$

Somit erhält man bei logarithmischer Auftragung der wahrscheinlichsten Abrißkraft  $\bar{F}$  gegen den Kraftanstieg eine Gerade, deren Steigung von der Potentialbreite der Bindungstasche abhängt (Abb. 2.4 C).

Im Verhältnis zur kovalenten (chemischen) Bindung ist diese nichtkovalente Bindung zwischen Adhäsionsmolekülen um mehr als eine Größenordnung schwächer und daher reversibel. Um dennoch starke Verbindungen aufbauen zu können, haben Zellen verschiedene Strategien entwickelt, die auf der Kooperation vieler einzelner schwacher Bindungen beruhen.

### 2.2.3 Adhäsionsstrategien

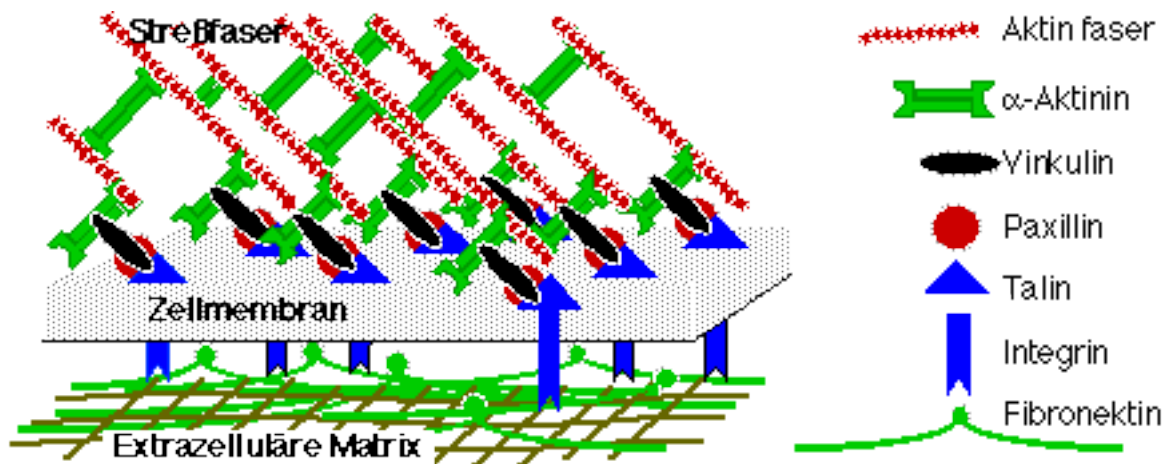


Abb. 2.5: Modell eines Fokalkontakts zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix

Über  $\alpha$ -Aktinin, Talin, Vinkulin und Paxillin kann das Aktinnetzwerk an die intrazellulären Enden von Integrinen gekoppelt werden. Durch Quervernetzung solcher Kopplungen kann ein sehr kräftiger **Fokalkontakt** zwischen der fibronektinhaltigen extrazellulären Matrix und dem Aktinnetzwerk entstehen [47]. Ähnlich erfolgt die Ankopplung von Cadherinen über Catenine an das Aktinnetzwerk. Der strukturelle Aufbau der Cadherine legt die Möglichkeit zu

extrazellulärer Multimerisierung unter Einbeziehung des Bindungspartners nahe. So vernetzte “Molekülaggregate” (**molecular cluster**) halten durch die Aufteilung der molekularen Belastung große Kräfte aus [48,49].

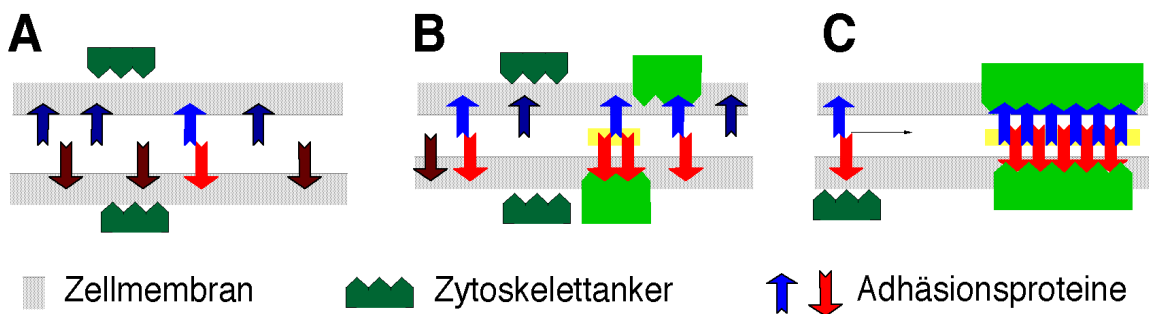


Abb. 2.6: Je länger die Zellmembranen in Kontakt sind (von A nach C), desto mehr kooperieren die Adhäsionsproteine untereinander und mit dem Zytoskelett und bilden einen hochstabilen, organisierten Molekülknoten.

Die **extrazelluläre Matrix (ECM)** ist ein Geflecht aus verschiedenen Kollagenen, Laminin, Fibronectin und weiteren Proteinen und Proteoglycanen. Die Bestandteile werden in den Zellen gebildet, nach außen transportiert wo sie vernetzen und wiederum über Fibronectinrezeptoren von Zellen stark gebunden werden. Im Zellverband wird durch die ECM die Basalseite einer Epithelzelle definiert. Durch Festkörperbeschichtungen (Petrischale) mit Fibronectin, Kollagenen oder Polylysinen kann Zellen eine ECM vorgespiegelt werden. Sie entwickeln einen natürlichen Epithelzellverband und polarisieren sich. Den Aufbau einer starken Bindung zur ECM kann die Zelle etwa innerhalb einer halben Stunde organisieren [10].

Die stärksten Verbindungen lateraler Zellmembranen im Zellverband sind die **Adhärenz-Junktionen** und **Desmosomen**. Sie sind komplizierte Molekülkomplexe an der zytoplasmatischen Membran, die mit Bündeln aus Intermediärfilamenten verknüpft sind und den Zellverband lateral zusammenhalten. Die **Tight Junktionen** dichten den Zellverband an der apikalen Seite wie eine Saumnaht ab. **Gap-Junktionen** bilden Transportporen zu Nachbarzellen aus. Im Zusammenspiel mit den Nachbarzellen etabliert die Zelle solche Verbindungen über einen Zeitraum von Stunden [6].

## 3 Die Kraftspektroskopie

Im Folgenden wird die Kraftspektroskopie als grundlegende Methode für diese Arbeit vorgestellt. Sie dient zur Messung von Kräften im Piconewton-Bereich und soll hier mit bisher existierenden Techniken der Zelladhäsionsmessung verglichen werden.

### 3.1 Das Kraftspektroskop

Das Kraftspektroskop [50] ist die Weiterentwicklung eines Betriebsmodus des Raster-Kraftmikroskopes (AFM, atomic force microscope) [51].

#### 3.1.1 Aufbau

Der Kraftsensor - eine Abtastspitze am Ende einer feinen Blattfeder (Cantilever) - wird über Piezostellelemente nanometergenau positioniert, während die an der Spitze wirkenden Kräfte die Feder verbiegen. Zur Detektion dieser Verbiegungen im Subnanometerbereich wird ein Laserstrahl an der metallbedampften Rückseite der Feder so reflektiert, daß er beide Segmente eines Photodetektors zu gleichen Teilen beleuchtet (Abb. 3.1). Die Differenz der Ausgangsspannungen beider Segmente ist dann weitgehend proportional zu kleinen Auslenkungen des Kraftsensors. Sie wird vom Meß- und Steuerrechner eingelesen und prozessiert.

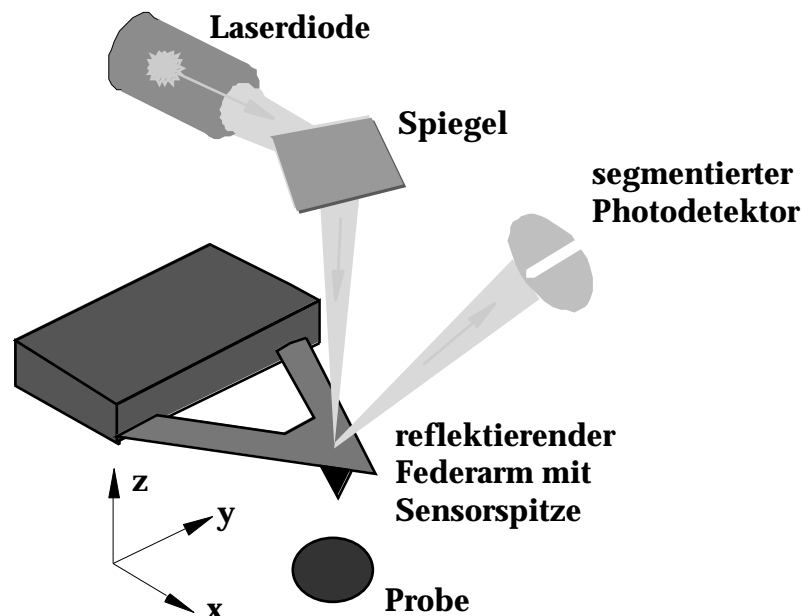


Abb. 3.1: Skizze des Grundprinzips eines Kraftmikroskopes

Aus der Verbiegung des Federarms in z-Richtung kann man elastische [52], elektrostatische [53] und weitere Eigenschaften der Probe, wie deren Adhäsivität

[54], durch die Wechselwirkung mit der Abtastspitze ermitteln. Beim Abbilden mit dem AFM wird aus der z-Auslenkung der Feder hauptsächlich die Probentopographie mittels Rasterbewegungen der Spitze vermessen [55,56], bei weichen Proben wie den Zellen gelingt es dadurch auch filamentäre Strukturen und deren Bewegungen "durch die Zellmembran hindurch" zu beobachten (Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu steht beim hier eingesetzten Kraftspektroskop die an der Spitze wirkende Kraft im Mittelpunkt des Interesses.

Das Piezo-Stellelement eines Kraftspektroskopes ist daher auf Bewegungen und Messungen in z-Richtung optimiert. Ist die Probe unter dem Kraftsensor optimal positioniert, bleibt daher die x-y-Ebene während eines kraftspektroskopischen Experiments fest und wird rechnergesteuert durch den Piezo nur in z-Richtung bewegt. Zu jedem Positionspunkt des z-Piezos wird dabei die zugehörige Auslenkung des Sensors über den Laserreflex im Photodetektor aufgezeichnet (Abb. 3.1).

Zur Rauschunterdrückung wird das Kraftspektroskop schwingungsgedämpft aufgehängt und das Signal der Zweisegmentdiode tiefpaß gefiltert ( $>10$  kHz). Bei Kraftexperimenten mit sehr langsamen Piezobewegungen ( $<1$   $\mu\text{m/s}$ ) werden die Federauslenkungsdatenpunkte zusätzlich mehrfach gemittelt (oversampling).

Das verwendete Kraftspektroskop verzichtet gegenüber dem AFM auf die bildgebenden Eigenschaften und auf schnelle Piezobewegungen. Vielmehr konzentriert es sich mit Sensoren niedriger Resonanzfrequenz auf langsame Bewegungen in der z-Richtung, in der die Kraft als die fundamentale Information enthalten ist.

### 3.1.2 Die Kraft-Abstands-Kurve

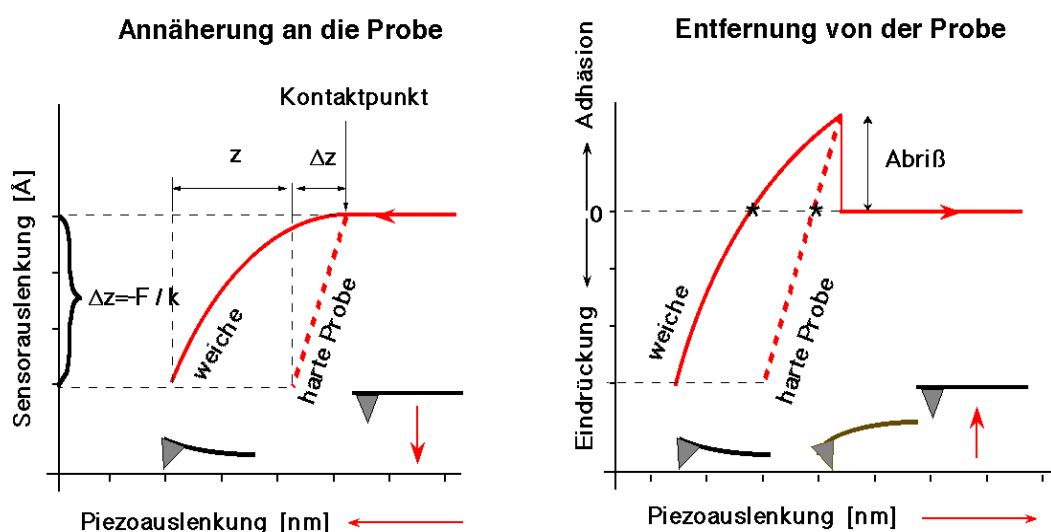


Abb. 3.2: Bei der Annäherung an die Probe wird der Sensor ab dem Kontaktpunkt um  $z$  ausgelenkt und dringt in weiche Proben die Strecke  $z$  tief ein. Beim Zurückziehen wird im Fall von Adhäsion eine Auslenkung oberhalb des Kraftnullpunktes (\* auf der Linie des kräftefreien Sensors) bis zum Abreißen des Kontaktes beobachtet.

Bei Kenntnis der Federkonstante  $k$  des Sensors kann die zur Auslenkung  $z$  führende Kraft  $F$  gemäß dem Hooke'schen Gesetz präzise bestimmt werden:

$$F = k \cdot z \quad (3-1)$$

$z$  ist bei harten Proben mit der Piezoauslenkung identisch, während die Federkonstante aus der Intensität der Resonanzfrequenz im Frequenzspektrum des thermischen Rauschens ermittelt werden kann (Anhang) [57,58]. Zur Erzielung der erforderlichen Kraftauflösung von unter 10 pN ist es daher sinnvoll weiche Kraftsensoren mit kleinen Federkonstanten von etwa 10 mN/m zu verwenden.

Die Daten eines Kraftexperimentes werden üblicherweise durch Auftragen der Piezoposition gegen die so in Kraft umgerechnete Auslenkung des Kraftsensors (3-1) als Kraft-Abstands- oder Kraft-Dehnungs-Kurve (kürzer: "Kraftkurve") dargestellt. Diese enthält spezifische Informationen zur verwendeten Probe (Abb. 3.2). Beim Annähern an die Probe beschreibt die Kurve zunächst nach Ausmitteln des thermischen Rauschens eine Gerade, bis die Wechselwirkung mit der Probe meßbar wird. Diese kann im Einzelfall zunächst attraktiv sein, wird aber spätestens bei direktem Kontakt repulsiv und folgt der Bewegung des Piezoelements wenn die Probe nicht zunächst viskoelastisch verformt wird.

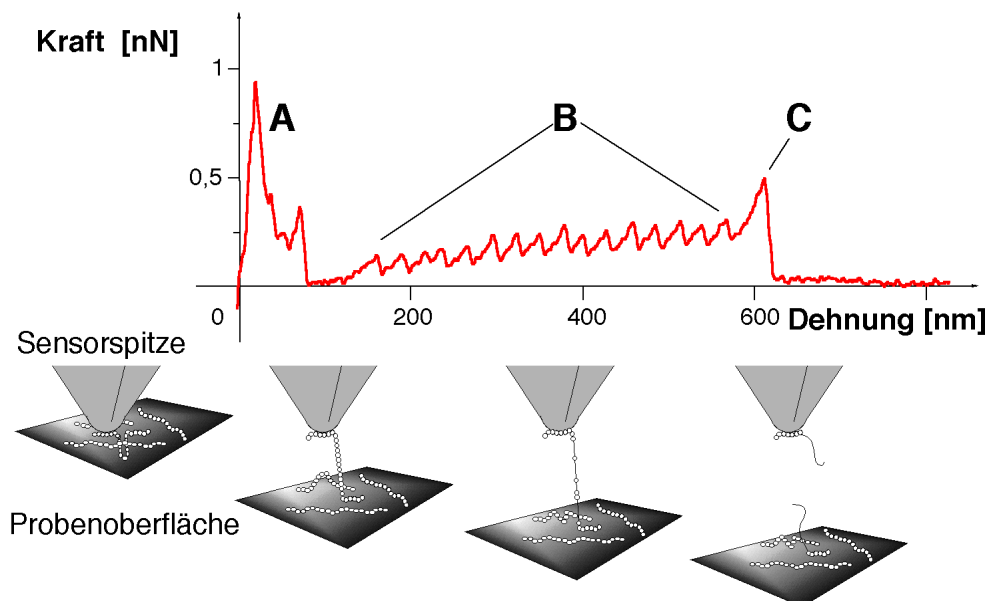


Abb. 3.3: Trennungskraftkurve eines Einzelmolekülexperimentes an Titin (aus [59]); A: kurzreichweitige Wechselwirkungen an der Oberfläche und Abreißen kurzer Moleküle; B: leicht ansteigendes Kraftplateau -typisch für Konformationsübergänge - mit Sägezahnfeinstruktur durch Entfaltung einzelner Ig -Domänen; C: Abriß des Moleküls nach Entfaltung aller Domänen. Davor (und vor jeder Zackenspitze aus B) das typische Kraft-Dehnungsmuster einer sich streckenden Polymerkette.

Die Trennungskurve wird beim Zurückziehen des Sensors von der Probe aufgenommen. Sie beginnt mit dem viskoelastischen Entlasten der Probe bis zu dem Punkt, an dem die Sensorfeder in der kräftefreien Ausgangsposition erreicht (Kontaktpunkt oder Kraftnullpunkt). Die Kraftauslenkungen über diesen Nullpunkt

hinaus sind auf Adhäsion zurückzuführen (Abb. 3.2) und führen zur Dehnung der Probe zwischen Sensor und Substrat. Die Interpretation und Auswertung von Adhäsionsexperimenten konzentriert sich daher auf den Verlauf der Trennungskurve.

Für Einzelmolekülexperimente, auf einer sehr kleinen Skala von einigen 100 Nanometern, wird eine Sensorspitze auf Moleküle gedrückt, die an einer Oberfläche adsorbiert sind und nach einer gewissen Kontaktzeit wieder zurückgezogen. Ab und zu bleibt dabei, nach dem Abklingen der ersten Adhäsion, (Abb. 3.3 A) noch ein einzelnes Molekül am Sensor hängen. Elastizität, Konformationsübergänge oder die Kräfte zur Entfaltung oder zum Zerreißen innerer Molekül-Strukturen lassen sich in den Abrißstufen solcher Kraftkurven erkennen (Abb. 3.3). Mit dieser Technologie konnte die Stabilität molekularer Über- [60] und Unterstrukturen [61] untersucht werden (Abb. 3.3). Ebenso wurden Rezeptor-Ligand-Bindungskräfte [62] und die Bruchkraft chemischer Bindungen auf diese Weise vermessen [63]. Die typischen "Scanartefakte" wie Topographiefaltung mit der Spitzengeometrie oder Einflüsse von Lateralkräften [64] sind bei den Anwendungen des Kraftspektroskopes in der Regel nicht vorhanden.

Die Form der Kraftkurve hängt nicht nur von der Art der Probe, sondern auch von den Randbedingungen des Kontaktes (Dauer, Stärke, Temperatur, pH-Wert) ab. Durch den Vergleich von Kraftkurven gleicher Proben bei verschiedenen Randbedingungen kann man weitere Rückschlüsse auf adhäsionsbeeinflussende Faktoren ziehen.

### 3.1.3 Das Kraftspektrum

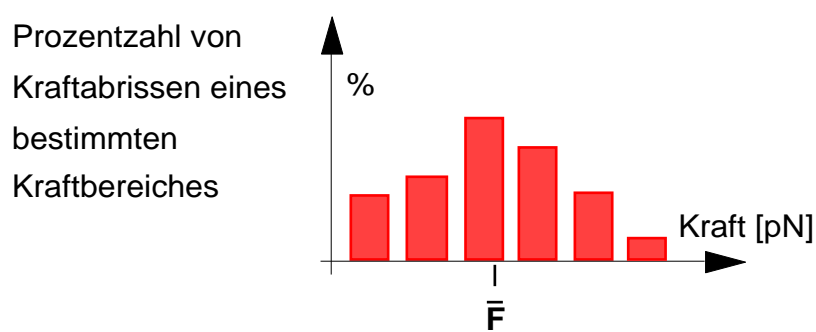


Abb. 3.4: Stilisiertes Kraftspektrum der Kraftstufen der letzten Abrißkräfte. Das Maximum der Verteilung ergibt die wahrscheinlichste Abrisskraft  $\bar{F}$ .

Auf molekularer Ebene sind physiologische Messungen an Biomolekülen bei Raumtemperatur immer mit dem thermischen Rauschen unterlegt. Eine Methode um zum "wahren Meßwert" zu gelangen ist ihn aus der Verteilung vieler Meßwerte auszumitteln. So können z.B. die letzten Abrißkräfte (Abb. 3.4 C) aus Kraftkurven vieler Experimente nach Kraftbereichen in ein Histogramm sortiert werden. Daraus ergibt sich eine, für die Probe und die experimentellen Randbedingungen

charakteristische, Kraftverteilung als Kraftspektrum (Abb. 3.4). Die Maxima der Kraftspektren geben dann die wahrscheinlichsten Abrißkräfte  $\bar{F}$  wieder ( 2-6 ). Typischerweise verschieben sich die wahrscheinlichsten Abrißkräfte mit der Trennungsgeschwindigkeit [65]. Das hat zum einen mit hydrodynamischen Reibungseinflüssen zu tun, aber vor allem mit der Natur nichtkovalenter Bindungen (Abschnitt 2.2.2), deren Trennungseigenschaft sich in den Kraftspektren widerspiegelt. Aus dem Verschiebungsverhalten können, wie von W. Dettmann [15,66] gezeigt, dynamische Komponenten der Bindungstasche spezifischer Bindungspartner abgeleitet werden [67,68].

### 3.2 Methoden der Zelladhäsionsmessung

Die Zelladhäsion wurde und wird mit unterschiedlichsten Methoden untersucht [69]. Die klassische Methode der Beobachtung von Zelladhäsion ist das **Lichtmikroskop**. An Gewebeschnitten und mit geeigneten Färbemethoden kann im Lichtmikroskop der Zusammenhalt von Zellen phänomenologisch bestimmt werden. Bereits die Form der Zellen auf Zellkulturschalen gibt dem Mikroskopiker Aufschluß über die Adhäsivität der Zelle. Kontrastreiche runde Zellen sind meist wenig mit der Unterlage verbunden, dagegen adhären die schwer erkennbaren, flach gestreckten Zellen stark am Substrat (Abb. 3.11).

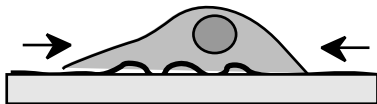
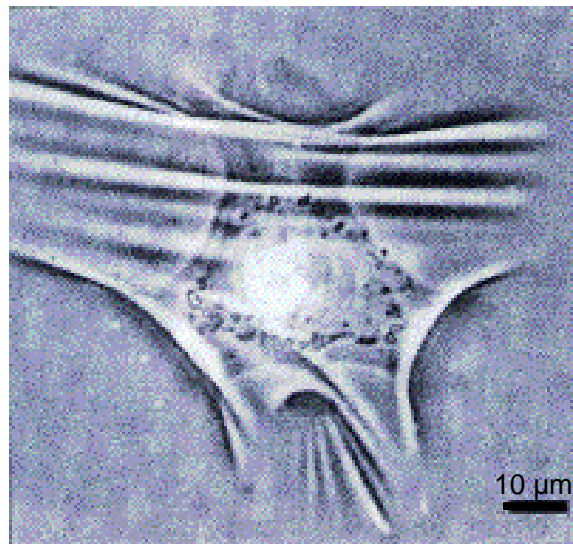


Abb. 3.5: Auf einer dünnen Silikonfolie kann die Kontraktionskraft einer Zelle durch die Verformung der Unterlage vermessen werden (aus [70]).



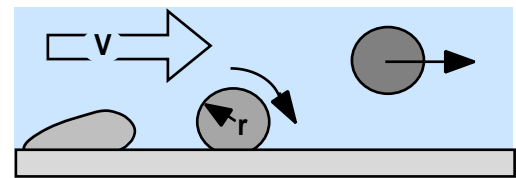
Zur Darstellung der kontraktilen Kräfte, die sich ausstreckende Zellen auf die Unterlage übertragen, läßt man die Zelle auf einer dünnen Silikonfolie wachsen, deren Elastizitätsmodul gut bekannt ist [70] (Abb. 3.5).

Auch durch leichtes Schütteln einer Zellkulturschale kann man sehr einfach die Adhäsionskräfte schwach adhärerter Zellen unterscheiden.

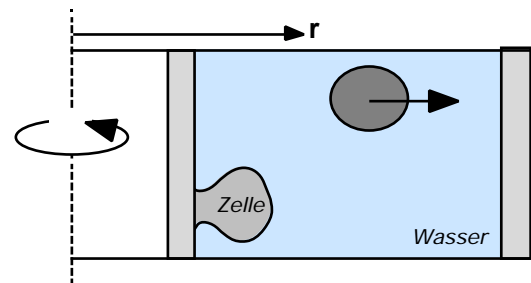
Die laterale Kraft, die dabei an der Zelle wirkt, addiert sich aus der Trägheit der Zelle und der Scherkraft der trägen Flüssigkeit. Eleganter kann man mit einstellbaren **Scherströmungen** [71] etwa die Situation an Blutgefäßwänden nachmodellieren [72].

Zur exakten Quantifizierung der scherenden Kraft  $F$  fehlt allerdings in der Regel die genaue Kenntnis des meist turbulenten Strömungsprofils ( $F \propto r \cdot v$ ).

Durch **Zentrifugation** kann die Adhäsionskraft bei genauer Kenntnis der Zelldichte relativ gut bestimmt werden ( $F \propto V_{\text{Zelle}} (\rho_{\text{Zelle}} - \rho_{\text{Wasser}}) r^2$ ). Dabei stellt sich jedoch heraus, daß sich die Zellen nicht alle bei einer bestimmten, sondern bei individuell sehr unterschiedlichen Beschleunigungen ablösen [73].



(Schema einer sich durch Scherströmung von der Oberfläche lösenden Zelle)



(Schema einer sich durch Rotation von der Oberfläche lösenden Zelle. Nach dem Experiment werden die Zellen auf beiden Seiten der Zentrifugenkammer ausgezählt)

Die **Elektronenmikroskopie** war lange eine der wichtigsten zellbiologischen Methoden für die Erkundung der Zellorganisation bis hinab in den makromolekularen Bereich. Viele Zellverbindungsstrukturen konnten mit dieser Technik entdeckt werden, wie die Desmosomen, Tight - und Gap- oder Adhärenzjunctionen (Abb. 3.6).

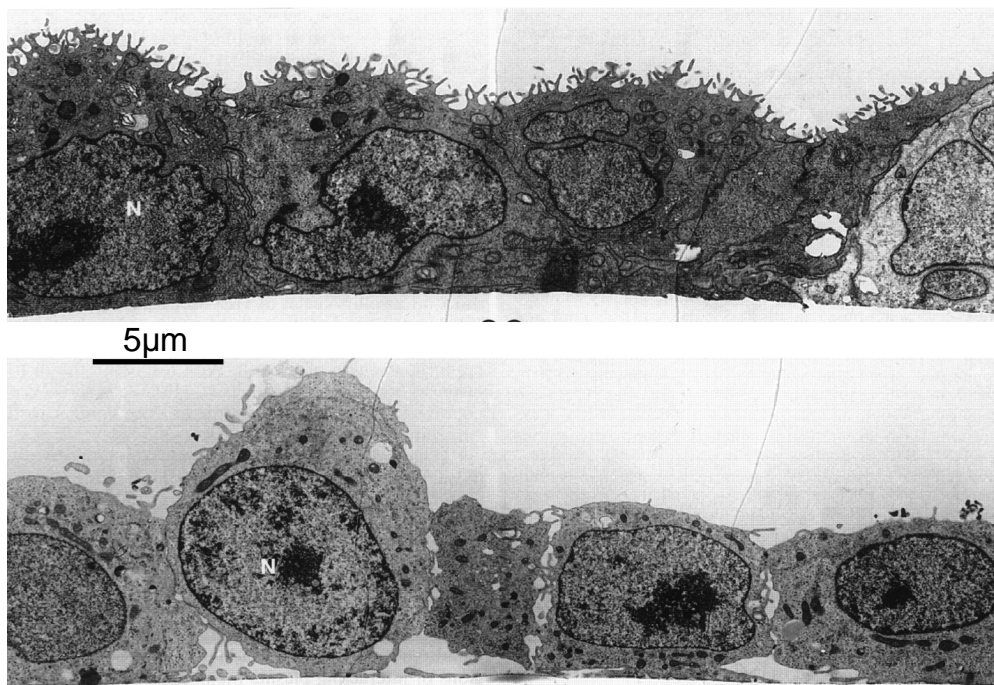


Abb. 3.6 oben: Stark verbundene Epithelzellen (HEC-1-a) sind lateral durch Adhäsionsmoleküle lückenlos aneinander geschmiegt. Die apikale Membran ist durch Mikrovilli stark strukturiert. Unten: lockerer Zellverband unpolarisierter Epithelzellen (RL95-2) mit großen Lücken zwischen den benachbarten Zellmembranen (N=Zellkern, TEM -Bilder von M.Thie, Essen).



Modernere Methoden manipulieren die Zellen direkt mit kraftsensitiven Apparaturen.

Die **Mikropipette** als klassisches Zellmanipulationswerkzeug ist sehr vielseitig durch die Option der elektrischen Signalübertragung oder der Mikroinjektion. Durch den Ansaugunterdruck  $p$  in der Pipette kann man, bei Kenntnis des Pipettenquerschnittes  $A$ , die Zugkraft einstellen [74], um beispielsweise eine Zelle von der Unterlage zu lösen ( $F = p/A$ ) (Abb. 3.7).

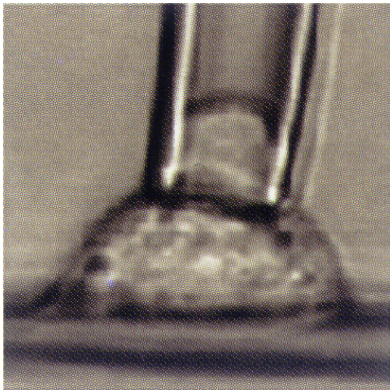


Abb. 3.7: Eine am Substrat adhärenzte Zelle wird mit einer Mikropipette angesaugt. Elastische Eigenschaften der Zelle können so bestimmt werden (aus [70]).

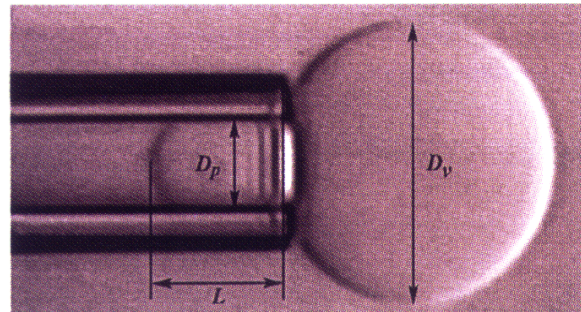


Abb. 3.8: Ein Lipidvesikel dient als Forcetransducer. Aus der Ansauglänge  $L$ , dem Durchmesser der Pipette  $D_p$  und dem Vesikeldurchmesser  $D_v$  bestimmt man die Membranspannung. Aus der Deformation bei Wechselwirkung mit der Probe erhält man sehr genau die dafür benötigte Kraft (aus [70]).

Bestimmt man die Kraft über die Vermittlung eines “**Bioforcetransducers**”, in Form eines Vesikels oder eines roten Blutkörperchens, die mit einem Präparat in Wechselwirkung gebracht werden, so erhöht man die Empfindlichkeit drastisch (Abb. 3.8). Die Membranspannung des Bioforcetransducers in der Pipette wird durch den Ansaugunterdruck eingestellt, während optisch die Deformation zur Bestimmung der Adhäsionskraft vermessen wird. Dadurch kann eine Kraftempfindlichkeit von nur wenigen pN erzielt werden [75]. Dies ermöglicht die Bestimmung von Adhäsionskräften auf dem molekularen Niveau.



Abb. 3.9: Eine Zelle wird auf ein Glasplättchen gebracht und mit einer Mikronadel aus Glas angedrückt. Nach einer gewissen Zeit ist die Zelle an beiden Glaskörpern fest adhärenzte und kann gedehnt werden (aus [70]).

Läßt man eine Zelle, die auf einem sehr dünnen Glasplättchen immobilisiert ist, seitlich an einer Mikropipette adhären, so kann man die Zelle dehnen und aus der Verbiegung  $z$  der Pipette die Gegenkraft der Zelle bis zum Abreißen vermessen (Abb. 3.9). Die Kraft gewinnt man dabei aus der Kenntnis der Federkonstanten  $k$  der Pipette ( $F = k \cdot z$ ).

Die feinste Methode zur Manipulation auf subzellulärer Ebene sind die **magnetische Pinzette** [76] und die **optische Pinzette** [77,78] (optical tweezers). Einzelne Zellorganelle können damit adressiert und Kräfte von Bruchteilen eines Piconewtons gemessen werden. Allerdings ist die Zugkraft in der Regel nicht mehr ausreichend um starke Bindungen, geschweige denn Zellen, voneinander zu trennen [79].

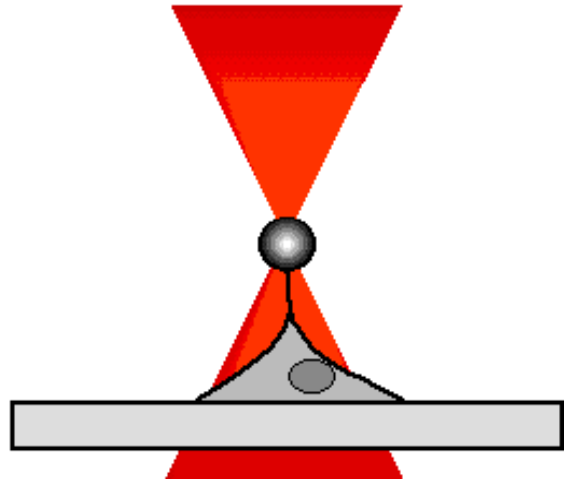


Abb. 3.10: Die optische Pinzette führt eine durchsichtige Kugel ( $r = 2 \mu\text{m}$ ) im Fokus eines Laserstrahls, während magnetische Pinzetten magnetisierbare Kugeln im inhomogenen Magnetfeld führen.

Die idealen Voraussetzungen des **Kraftmikroskopes** (AFM) zur Erforschung der Zelladhäsion wurden auch schon von anderen erfolgreich eingesetzt:

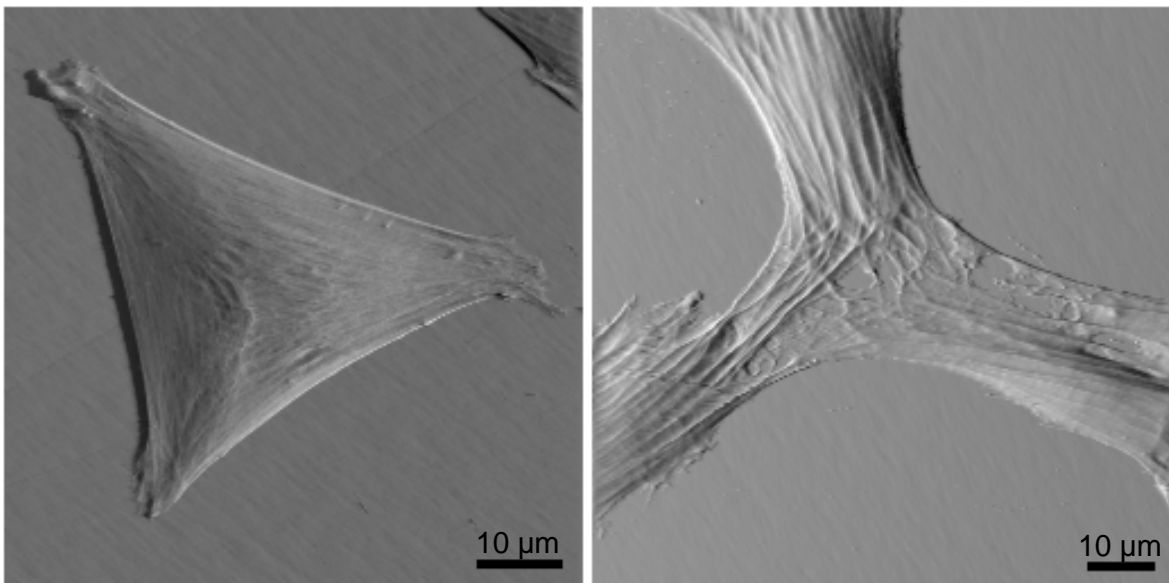
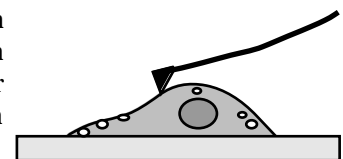


Abb. 3.11: AFM Bild einer Osteoblaste (SaOS2) und dreier Fibroblasten auf Glas. rechts ist der AFM-Sensor auf einer Zelle mit harten Aktinfilamentfaserbündeln skizziert, die von der Nadel unter der weichen Zellmembran ertastet werden wie die Mittelhandknochen unter der Handrückenhaut (J.Domke, LMU München).



Zur Quantifizierung der Adhäsivität -insbesondere von Knochenzellen- auf verschiedenen Substraten ist kürzlich eine Methode [52] entwickelt worden, die mit

einem Kraftmikroskop das Verhältnis von Zellvolumen zur Kontaktfläche mit dem Substrat ermittelt (Abb. 3.11).

Sehr elegant ist die von W. Dettmann verwirklichte Methode zur Erkennung einzelner Adhäsionsmoleküle auf Zelloberflächen durch das orts aufgelöste Vermessen der Adhäsionskraft mit dem **Kraftmikroskop** [54]:

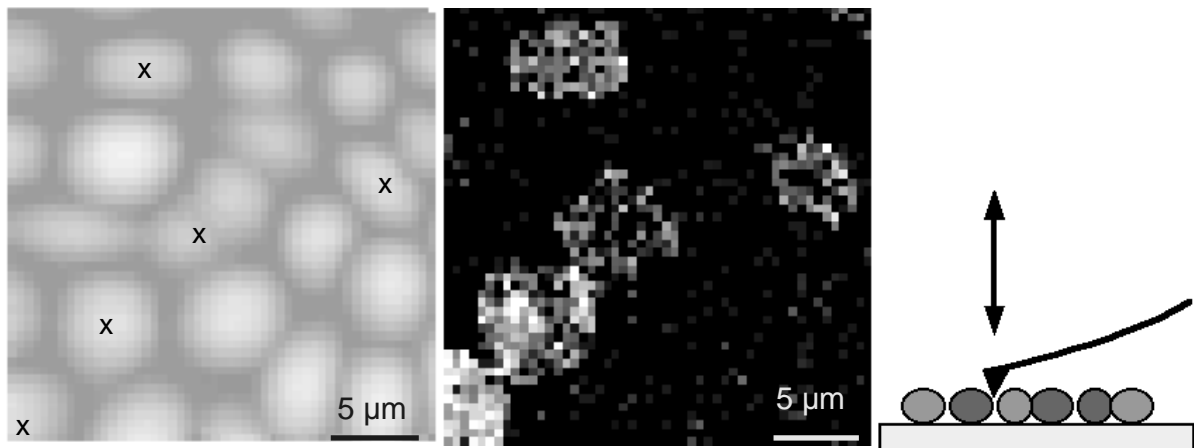
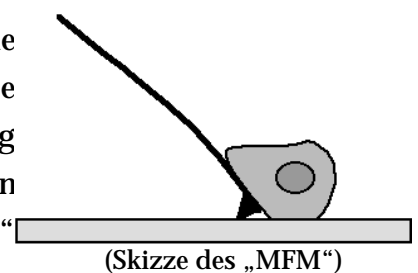


Abb. 3.12: Ein Gemisch aus roten Blutkörperchen zweier Blutgruppen kann mit einer speziell beschichteten Kraftsensortippe durch die unterschiedliche Adhäsion unterschieden werden (von W. Dettmann, LMU München; aus [80]).

Ein Molekül am Kraftsensor, dessen Bindungspartner auf der Zelle vermutet wird, nähert man vertikal bis zur Zelle an (Topographiemessung) und zieht es wieder zurück (Adhäsionsmessung). Nach einem Lateralschritt wiederholt man den Vorgang. Dabei werden die Zellhöhe und die Adhäsionskraft zu je einem Grauwertpixel verrechnet und zu einem Bild zusammengesetzt. Auf diese Weise können Zellen ohne die oft schädigenden Markierungssubstanzen *in vitro* unterschieden werden.

Das **Manipulation Force Microscope** (MFM), schiebt die Kraftsensorfeder unter eine Zelle um sie von der Unterlage abzuschälen [81]. Aus der Verbiegung des Sensors entlang der, zum Lösen der Zelle benötigten, Strecke  $s$  erhält man erstaunlich reproduzierbar eine „Adhäsionsenergie“ ( $E = F \cdot s$ ) der Zelle.



Es ist auch bereits gelungen einzelne Bakterien am Kraftsensor zu immobilisieren [82], um die Voraussetzungen zu schaffen deren Adhäsionskräfte auf unterschiedlichen Materialien messen zu können; allerdings wurden die Bakterien dazu mit Glutaraldehyd fixiert.

Um solche Messungen in für lebende Zellen verträglicher Umgebung zu realisieren, wurde das „Zelladhäsionskraftspektroskop“ konzipiert:

### 3.3 Das Zelladhäsionskraftspektroskop

Zur Vermessung von Zelladhäsion stehen viele Techniken zur Verfügung (Abschnitt 3.2). Das Kraftmikroskop ist unter den neu entwickelten Methoden dabei sehr stark vertreten. Der unmittelbare Vorteil des Kraftspektroskopes gegenüber anderen Methoden liegt in seiner Vielseitigkeit, der Ångström genauen Positionierbarkeit und der direkten Zugänglichkeit des Kraftsignals bei hoher Kraftauflösung. Der im folgenden beschriebene Aufbau ist für die Zelladhäsionsmessung optimiert worden.

#### 3.3.1 Aufbau

Da Zellen eine typische Ausdehnung von 10 bis 20  $\mu\text{m}$  besitzen und bereits durch geringe Kräfte stark verformbar sind, war es für die Untersuchung von Zelladhäsionskräften erforderlich den Stellweg des Kraftsensors in z-Richtung auf etwa 100  $\mu\text{m}$  zu erweitern. Abbildung (Abb. 3.13) zeigt den Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Zelladhäsionskraftspektroskopes.

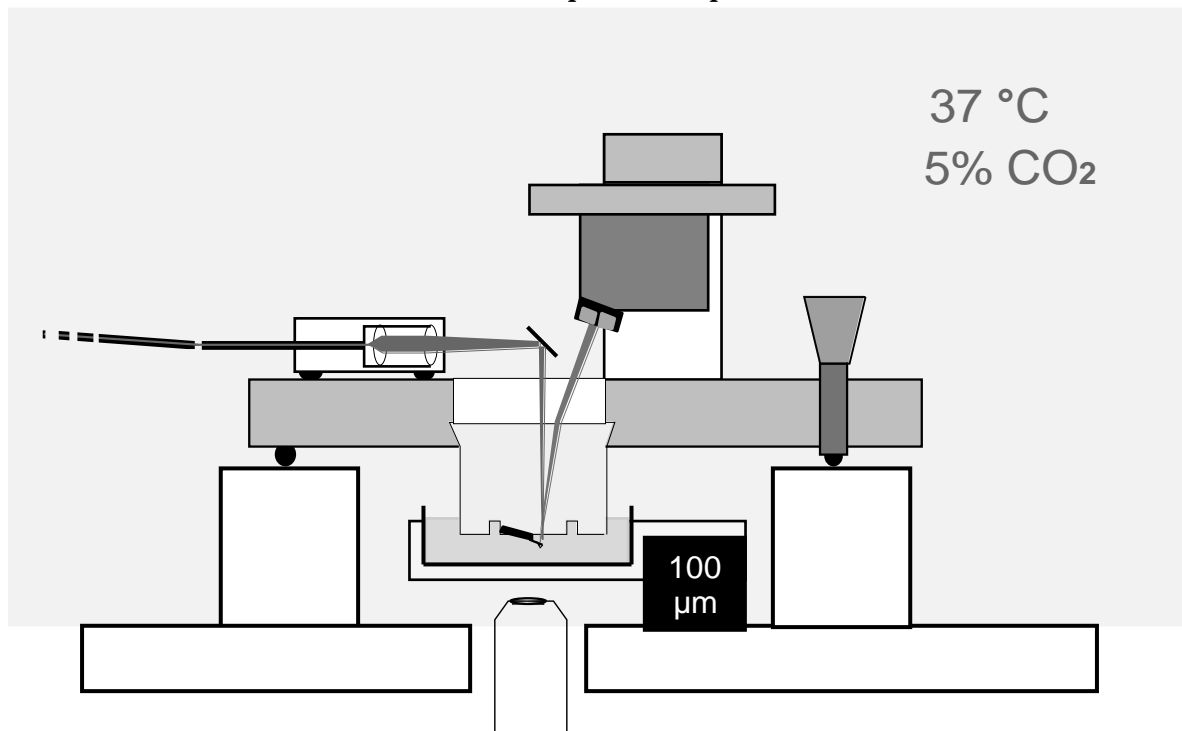


Abb. 3.13: Skizze des Zelladhäsionsspektroskopes: der Laserstrahl wird über eine Glasfaseroptik (von links) eingekoppelt. Der 100  $\mu\text{m}$  Piezo führt die Petrischale über dem Mikroskopobjektiv (von unten) an den Kraftsensor unter dem Plexiglasblock (mit freundlicher Genehmigung von W. Dettmann, LMU München).

Die Positionierung der Zellen in einer Zellkulturschale mit Nährmedium unter dem Kraftsensor geschieht manuell mit einem x-y-Kreuztisch an dem eine Petrischalenhalterung montiert ist. Dieser wiederum wird von dem 100  $\mu\text{m}$  Piezoelement in z-Richtung bewegt. Die Kontrolle der Position und des Zustandes der Zellen vor, während und nach dem Experiment geschieht optisch mit einem Lichtmikroskop von unten. Die Einheit aus Laserdiode, Kraftsensor und

Diodendetektor wird von oben auf die Anordnung plaziert. Der Plexiglasblock, an dessen Unterseite der Kraftsensor befestigt ist, taucht in die Petrischale ein, um einen definierten Übergang des Laserstrahls in das Zell-Medium zu vermitteln. Über eine elektrische Widerstandsheizung und CO<sub>2</sub>-Begasung kann das Kraftspektroskop unter Zellkulturbedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in einem keimreduzierten Plexiglaskasten betrieben werden.

### **3.3.2 Betriebsmodi**

Wie beim Kraftspektroskop wird der Sensor durch den Steuerpiezo mit der Probe bei der ausgewählten Geschwindigkeit in Kontakt gebracht. Dabei wird die Auslenkung des Sensors zu jedem (oder einer gemittelten Anzahl) der über einen Dehnmeßstreifen ausgelesenen Positionspunkte des Piezos registriert. Bei Vorwahl einer bestimmten Kontaktkraft hält die Piezosteuerung im Moment des Erreichens der entsprechenden Kraftsensorauslenkung an und hält diese Kraft über einen einstellbaren Zeitraum zwischen 1 ms und 50 min konstant, bevor der Sensor wieder von der Probe wegbewegt wird. Dabei wird die Adhäsionskraftkurve analog der Annäherung aufgezeichnet. Auf diese Weise können Kontakte über wählbare Zeiten stabil bei konstanter vorgegebener Kraft etabliert werden und deren Auswirkungen geschwindigkeitsabhängig als Adhäsionskraftkurve weiter ausgewertet werden.

Die Kraftsignale sind um so empfindlicher, je weicher die Federkonstante des Sensors ist, deren Bestimmung durch die Steuersoftware unterstützt wird (Abschnitt 3.4.2).

### **3.3.3 Kraftsensor Modifikationen**

Zum Befestigen einer Zelle am Kraftsensor ist die unspezifische Adhäsion von Zellen an vielen Festkörpern zunächst sehr praktisch, wobei sich nach einiger Zeit viele Zellen wieder vom Sensor ablösen. Im Anhang sind Strategien der Zellimmobilisierung an Oberflächen beschrieben. Außerdem ist die Sensorspitze für die Zelladhäsion im Vergleich zu glatten Flächen eher hinderlich. Kraftsensoren ohne Spitze sind zwar handelsüblich (Digital Instruments, Santa Barbara, Kalifornien, USA), haben aber eine zu große Federkonstante um hochauflösende Kraftexperimente an den sensiblen Zellen zu bewerkstelligen. Die derzeit auf dem Markt erhältlichen Kraftsensoren sind daher für den Gebrauch mit Zellen erst nach den folgenden einfachen Modifikationen geeignet:

### 3.3.3.1 Spitzen entfernen

Das Entfernen der Sensorspitze vom Federarm eines weichen Sensors (Park, Santa Clara, Kalifornien, USA) erleichtert das Adhären von Zellen am flachen Ende der Sensorfeder und schließt die Beteiligung der möglicherweise über die Zelle herausragenden Spitze bei der Interaktion mit anderen Zellen aus. Mit einer feinen modifizierten Pinzette kann man die Sensorspitze wegbrechen ohne die Funktionalität des Federarms für Zelladhäsionsmessungen zu beeinträchtigen (Anhang).

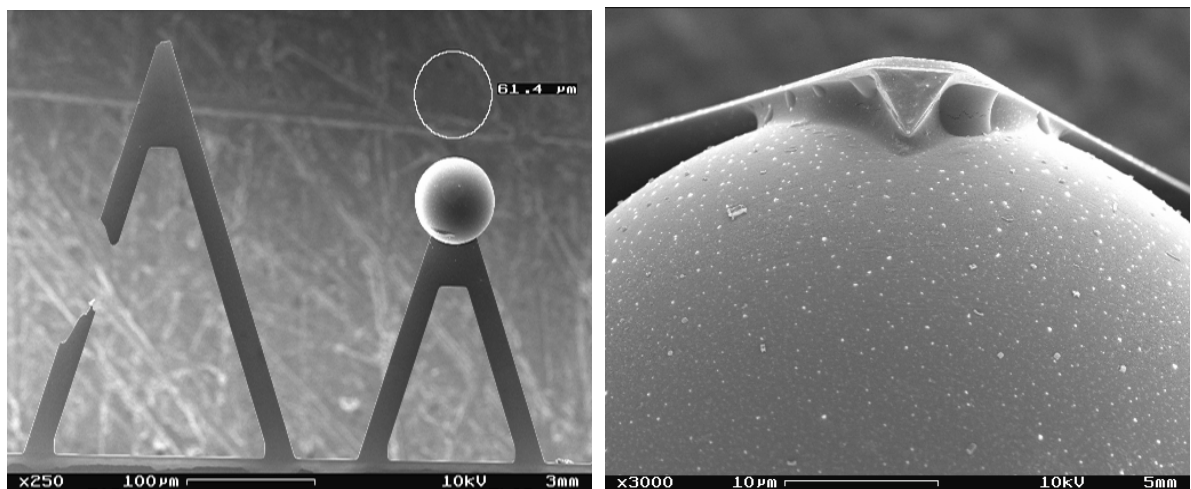


Abb. 3.14: REM Aufnahmen (Armin Kriele) von modifizierten Kraftsensoren: links: Federarm mit abgewinkelter Spitze und durchgezwickeltem Ärmchen, daneben ein Sensor mit angeklebter Kugel. Rechts: Vergrößerung der Klebestelle am Kraftsensor.

### 3.3.3.2 Erniedrigung der Federkonstante

Analog geht man vor, wenn ein Arm des Kraftsensors durchgezwickelt wird, wodurch sich die Federkonstante zur Erhöhung der Kraftempfindlichkeit halbiert. Die dabei entstehende paddelartige Struktur (Abb. 3.14) erhöht allerdings auch die Empfindlichkeit des Sensors gegen hydrodynamische Einflüsse bei schnellen Bewegungen.

### 3.3.3.3 Kugeln kleben

Eine weitere Modifikation, die 1997 von dem Biologen R. Röspe (MdB) [83] entwickelt wurde, um flächige Zellverbände am Kraftsensor zu befestigen, besteht im Ankleben von Kugeln auf den Kraftsensor (Abb. 3.14 und Anhang).

## 3.4 Wechselwirkungen in fluiden Medien

Das Zelladhäsionskraftspektroskop wird typischerweise in Zellkulturmedien (Anhang) betrieben, da fast alle Zellen in flüssiger Umgebung leben. Durch Eigen-

schaften der Flüssigkeit, wie z.B. deren Ionengehalt, werden einige Kraftwechselwirkungen beeinflusst.

### 3.4.1 Statische Nahkräfte

Noch bevor der Kraftsensor bei Annäherung an das Substrat mit der Oberfläche in Kontakt kommt, wirken dieselben Kräfte auf ihn, die bereits bei den nichtkovalenten Bindungen (Abschnitt 2.2.2) erwähnt wurden. Die wichtigsten statischen Kräfte in ionenhaltigen Flüssigkeiten sind die elektrostatische, die van-der-Waals und die hydrophil-hydrophobe Wechselwirkung:

$$F(z) = F_{elstat}(z) + F_{vdW}(z) + F_{hydroph}(z) \quad (3-2)$$

Die Kräfte  $F$  einer mit  $q_s$  geladenen ebenen Oberfläche im Abstand  $z$  auf eine mit  $q_t$  geladenen Kugel vom Radius  $R$  ( $R = 20$  nm für eine Sensorspitze) in Salzlösung beträgt gemäß der DLVO - Theorie [40]:

$$F_{elstat}(z) = R \frac{q_t q_s}{4 \pi \epsilon_0 \epsilon_D} e^{-\frac{z}{D}}$$

$$F_{vdW}(z) = -\frac{HR_t}{6z^2} \quad (3-3)$$

Dabei ist  $H$  die Hamaker Konstante und  $D$  die Debye-Länge, die ein Maß für die Reichweite der Wechselwirkung ist [84]. In Medien mit physiologischen Ionenkonzentrationen liegt sie unter 1 nm. Sie errechnet sich aus den Konzentrationen  $c_i$  der Ionen in der Lösung und deren Wertigkeit  $q_i$ , wobei  $e$  die Elementarladung,  $\epsilon_0$  und  $\epsilon_D$  die Dielektrizitätskonstanten bezeichnen:

$$D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 kT}{e^2 \sum_i c_i q_i^2}} \quad (3-4)$$

Die hydrophil-hydrophobe-Wechselwirkung  $F_{hydroph}(z)$  repräsentiert entropische Lösungsmittelleffekte im Nahfeld der Bindungspartner. Sie tritt bei Messungen an Luft wesentlich stärker in Erscheinung und beruht hauptsächlich auf dem Phänomen der Oberflächenspannung eines, wegen der natürlichen Luftfeuchtigkeit auf hydrophilen Oberflächen immer vorhandenen, dünnen Wasserfilms.

Durch gezielte Variation des Ionengehaltes des Meßmediums kann man die lokalen Kräfte zwischen der Abtastnadel eines Kraftmikroskopes und der Probe geschickt ausbalancieren, um höchste Auflösung an Biomolekülen zu erreichen [55]. Bei der Untersuchung lebendiger Zellen legen allerdings deren Vitalitätsgrenzen die Ionenzusammensetzung des Mediums fest. Daher können die an der Adhäsion beteiligten elektrostatischen Kräfte nur begrenzt durch Variation der Ionenkonzentrationen charakterisiert werden.

### 3.4.2 Dynamische Kräfte

Ein kräftefreier Sensor zeigt, je nach Temperatur und Federkonstante, statistische Auslenkungen von etwa 0,01 bis 3 nm. Bei guter Unterdrückung des elektronischen und akustischen Rauschens und Vernachlässigen des "Shotnoise" durch den detektierenden Laserstrahl ist das thermische Rauschen des feinen Kraftsensors die Ursache dieser Auslenkungen [85]. Die Amplituden sind in den Resonanzen des Sensors am größten und können zum Bestimmen der Federkonstante des Sensors verwendet werden [58]. Durch die Dämpfung in Flüssigkeit werden die Resonanzfrequenzen zu tieferen Frequenzen verschoben.

Bei Annäherung an eine Oberfläche verringert sich, durch die Einengung des fluiden Raumes auf einen Halbraum, die Amplitude der thermischen Sensorbewegung bis zum Kontakt auf das Maß, mit dem die Oberfläche oszilliert.

Durch das Hin- und Zurückbewegen des Sensors während eines Kraftexperiments zur bzw. weg von der Probe, bietet das umströmende Medium einen hydrodynamischen Widerstand. Er ist als „entgegen der Bewegungsrichtung wirkende“ Kraft meßbar und sowohl proportional zur Geschwindigkeit als auch zum reziproken des Abstandes von der Oberfläche (Abb. 3.15). Besteht keine Attraktion zwischen Sensor und Oberfläche, so eliminiert man diese Scheinkraft typischerweise durch Mittelwertbildung aus Annäherungs- und Rückzugskraftkurve. Die Auswahl der optimalen Geschwindigkeit (zwischen 1 und 7  $\mu\text{m/s}$ ) ist, abhängig von der Federkonstante, ein Balanceakt zwischen (bei Zellmessungen erheblichen) Driteffekten und hydrodynamischen Einflüssen.

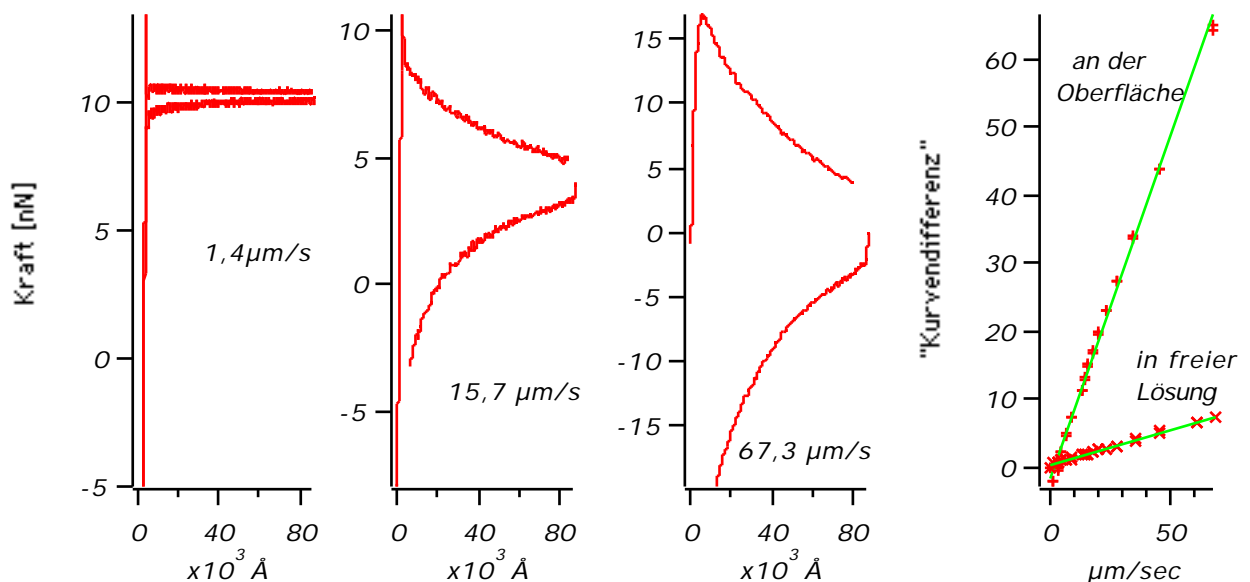


Abb. 3.15: Kraftkurven (unten: Annäherung; oben: Entfernung von der Oberfläche) mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Das thermische Rauschen ist besonders in der ersten Kraftkurve zu erkennen; Federkonstante: 4  $\text{nN/m}$ . Der Einfluß der Hydrodynamik (Differenz der Kurvenintegrale) steigt linear mit der Geschwindigkeit (Grafik ganz rechts).



## 3.5 Adhäsionskraftmessungen an Zellen

Zur Charakterisierung der Adhäsion aus der Form der Kraftkurve gibt es verschiedene Ansätze:

### 3.5.1 Quantifizierung der Adhäsion

Intuitiv ist die Maximalkraft  $F_{max}$  ein vernünftiges Maß für die Adhäsionsstärke. Um die Form der Kurve stärker zu berücksichtigen, könnte man rein mechanistisch die Bindungsenergie aus dem Integral unter der Kraft-Dehnungs-Kurve ermitteln [81]. Wegen der Irreversibilität des dissipativen Zelltrennungsvorganges ist die dabei in Kauf genommene Vernachlässigung der Reibungsverluste, der Zelldeformation und der Sprungstellen an Abrissen sicherlich unzulässig. Auch die Dehnungslänge bis zur vollständigen Zelltrennung gibt wegen obiger Einschränkung nur bedingt Auskunft über die Adhäsionsstärke. Im Kapitel 4 werden verschiedene adhäsionsbeeinflussende Faktoren und deren Auswirkungen auf die Kurvenform analysiert.

### 3.5.2 Schwierigkeiten und Artefakte

Alle Arten von Störungen des detektierenden Laserstrahls erzeugen im Detektor Signale, die vom Rechner als Sensorauslenkungen interpretiert werden. Oft können sie aber beim Auswerten augenscheinlich erkannt und meist eliminiert werden. Beispielsweise können, von Zellen ausgesonderte, Schwebeteilchen in der Lösung, solche Störungen verursachen.

Zellen, die sich auf, oder sogar unter dem Kraftsensor in der Nähe des Laserreflexpunktes befinden, können den Strahlengang defokussieren oder partiell verdunkeln, wenn sie sich bewegen oder sich innerlich umstrukturieren. Dabei „verwackeln“ die Kraftkurven meist (Kapitel 5), können aber auch völlig unbrauchbar werden. Solche Einflüsse sind zwar identifizierbar, aber selten ist das tatsächliche Kraftsignal rekonstruierbar.

Einen wichtigen Einfluß auf die Sensorauslenkung haben Temperaturschwankungen, da der Sensor aus goldbedampftem Silizium-Nitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) als Zweischichtsystem mit unterschiedlichen Wärmeausdehnungskoeffizienten bimetallische Eigenschaften aufweist. Dieses Driftartefakt ist besonders nach dem Einbau eines neuen Sensors oder beim Wechsel der Meßflüssigkeit spürbar und verschwindet nach Erreichen des thermischen Gleichgewichtes zwischen Sensor und Umgebung. Ähnliche Einflüsse können starke Schwankungen der Raumlichtintensität, besonders während langer Zellkontakte von bis zu 40 min, haben.

## 4 Zellinteraktionen mit Oberflächen

Die Reaktionen von Zellen auf Festkörperoberflächen sind von der Beschaffenheit der Oberfläche, dem umgebenden Medium und dem Zelltyp abhängig. Besonders für die Transplantatforschung ist es wichtig, zellverträgliche Oberflächen zu schaffen.

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben reichen die Methoden zur Untersuchung der Substrathaftung von Zellen vom mikroskopischen Augenschein der Zellform über Scherströmungsbeständigkeit [72,86] der Zellhaftung und Zentrifugationsmessungen [73] bis hin zu mikromanipulatorischen Experimenten.

Eine anfänglich adhäsive Oberfläche kann nach einigen Tagen von der Zelle wieder abgestoßen werden. Daher ist die Zeitskala auf der Zelladhäsionen betrachtet werden von entscheidender Bedeutung.

### 4.1 Kraftmessungen unspezifischer Adhäsionen

Mit dem hier verwendeten Kraftspektroskop sind Kontaktzeiten zwischen Zellen und Oberflächen von einigen Millisekunden bis zu einer Stunde sinnvoll meßbar.

Auf diesen Zeitskalen sind direkte Wechselwirkungen der Oberflächenmoleküle von Zellen aber auch erste zellulär gesteuerte Reaktionen auf die fremde Oberfläche beobachtbar.

Erfahrungsgemäß reagieren die meisten Zellen auf Festkörperoberflächen adhäsiv, da Proteine generell auf Grund von Ladungseffekten oder aus entropischen Gründen an solchen Oberflächen adhäreren oder gar denaturieren. Daher werden vielen Zellkulturmedien aus Rindern gewonnene BSA- oder FCS-Moleküle beigemischt, die unspezifisch an Festkörperoberflächen adhäreren, um unspezifische Zellreaktionen mit fremden Oberflächen (Petrischalen, Glaspipetten etc.) zu unterdrücken. Auf diese Weise wirken viele Oberflächen zellfreundlich oder zumindest neutral für Zellen. Andererseits kann man sie auch gezielt zelladhäsiv beschichten. Etablierte Methoden sind, je nach Zelltyp, Beschichtungen mit Lysinen oder Bestandteilen der ECM (Abb. 2.5) wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin (Anhang).

Da der Kraftsensor selbst eine Festkörperoberfläche darstellt, lag es nahe mit verschieden beschichteten Kraftsensoren kraftspektroskopische Messungen auf Zellen durchzuführen. Dabei stellte sich allerdings heraus, daß zum einen die pyramidale Struktur der Sensorspitze keine vernünftige Abschätzung der Kontaktfläche auf den zum Teil stark strukturierten und sehr weichen Zelloberflächen zulässt, und zum anderen mit oder ohne Beschichtungen der Einfluß der unspezifischen Festkörperwechselwirkung der negativ geladenen  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Spitze überwiegt. Mit einem BSA-beschichteten Kraftsensor, dessen wechselwirkende

Oberfläche durch eine angeklebte Kugel besser abgeschätzt werden kann, sollte die unspezifische Zellhaftung deutlich reduziert und besser spezifiziert werden können (Abb. 4.1).

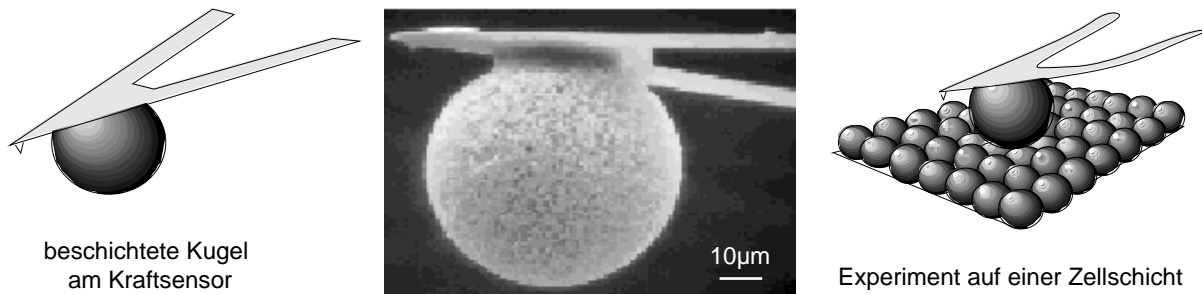


Abb. 4.1: Modifikation des Kraftsensors und Skizze des Adhäsionsexperimentes einer Kugel auf einem Zellrasen.

Die folgenden Zelladhäsionskraftmessungen sind mit dem in Abschnitt 3.3 beschriebenen Zelladhäsionskraftspektroskop unter Zellkulturbedingungen (35°C; 5% CO<sub>2</sub>) durchgeführt worden. Die Adhäsion von BSA-beschichteten Kugeln an Epithelzellen<sup>4</sup> (HEC-1-a, RL95-2), die eigentlich als schwach vermutet wird, erscheint im Kraftspektroskop als nicht unerheblich, wenn man sie im Vergleich zur, als stark angesehenen, Fibronektin (FN) Adhäsion betrachtet (Abb. 4.2).

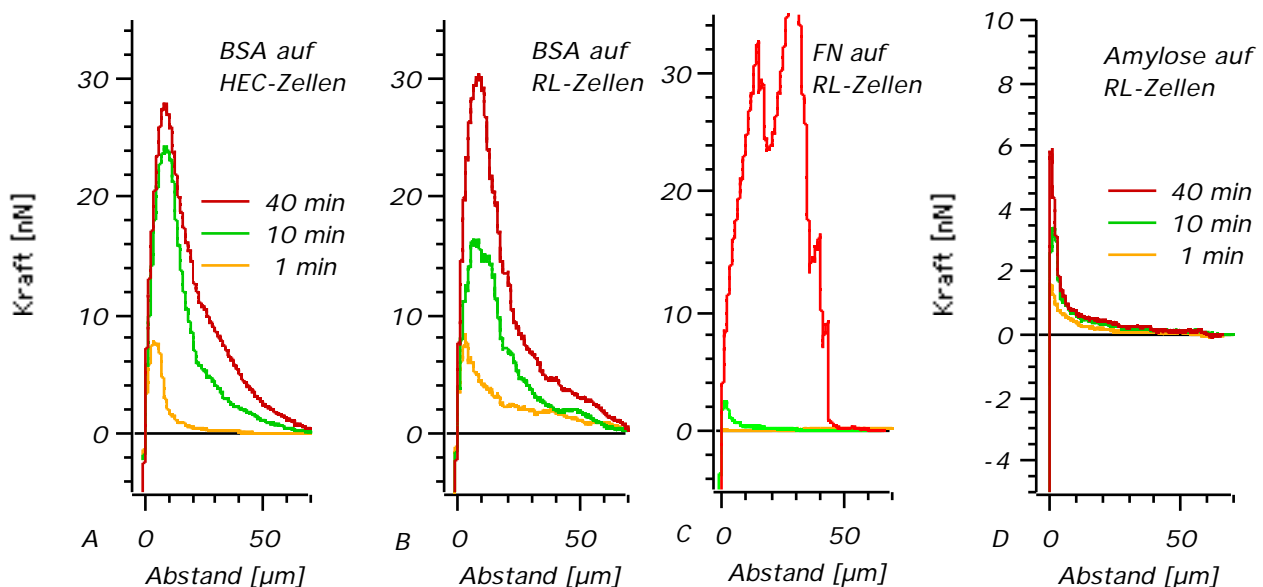


Abb. 4.2: Kraftkurven verschieden beschichteter Kugeln auf Epithelzellen (HEC und RL) nach Kontaktzeiten von 1, 10 und 40 min bei Kontaktkräften von 5 nN.

Die Vermutung liegt nahe, daß die Neutralisation durch BSA-Beschichtung von der unspezifischen Festkörperwechselwirkung überwogen wird, die unspezifisch

<sup>4</sup> Die hier verwendeten Epithelzellen werden im Abschnitt 5.1.3 und im Anhang eingehend beschrieben.

adhärierenden BSA-Moleküle durch die zellulären Moleküle diffusiv verdrängt werden (Vroman Effekt [87]), oder die BSA-Moleküle gar adhäsiv mit diesen Zellen interagieren. Überzeugender konnte die unspezifische Zelladhäsion an Festkörpern durch Verwendung der kovalent angekoppelten Carboxymethylamylose (Anhang) am Kraftsensor unterdrückt werden (Abb. 4.2 D). Die Fibronectinbeschichtung wurde kovalent an die Amylose angekoppelt (Anhang). Der Verlauf der Fibronectin-Adhäsionskraftkurve (Abb. 4.2 C) weicht als einziger von der etwa glockenförmigen Gestalt der Kraftkurven aller anderen Festkörper – Zellwechselwirkungsmessungen ab. Darum soll er aus der formellen Behandlung in diesem Kapitel ausgeklammert und erst im Kapitel 5.1.6 eingehend diskutiert werden. Die kraftspektroskopischen Daten sind nur aus Adhäsionen auf der Sekunden bis Minuten Skala rekrutiert, zum Teil bei Kontaktkräften von einigen Nanonewton, die unter Zellkulturbedingungen gewöhnlich nicht auftreten. Daher sind sie nur bedingt mit Adhäsionsabschätzungen aus Langzeitzellkulturexperimenten vergleichbar.

Bei den Adhäsionsmessungen mit verschiedenen funktionalisierten Kugeln von etwa 70 µm Durchmesser auf einem Zellrasen sind in der Regel mehrere Zellen mit einer sehr großen Zahl von Molekülen beteiligt. Die Zellen lassen sich bei starker Adhäsion oft über 10 µm hinaus dehnen (fast linearer Kraftanstieg bis zur maximalen Adhäsionskraft), bis die Belastung für die Bindungen zu groß wird, diese aufgehen und dadurch die Haltekraft der Zelle wieder nachläßt.

Die Stärke der Adhäsion hängt unter anderem stark von der Kontaktfläche  $K$  ab, die aus der Eindrückung  $z$  und dem Kugelradius  $R$  geometrisch bestimmt werden kann:

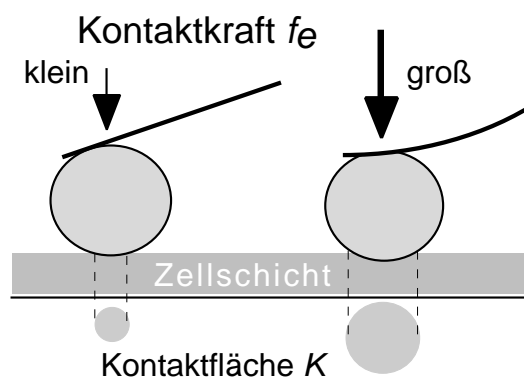


Abb. 4.3: Vergrößerung der Kontaktfläche durch die Kontaktkraft.

Aus geometrischen Gründen gilt:

$$K = \pi \cdot (2R \cdot z - z^2) \quad (4-1)$$

Für die hier verwendeten Kugeln vom Radius  $35 \pm 5 \mu\text{m}$  beträgt die Kontaktfläche bei einer Kontaktkraft von  $3 \pm 1 \text{ nN}$  mit einer Eindrücktiefe von etwas über  $2 \pm 0,5 \mu\text{m}$  ungefähr  $500 \pm 180 \mu\text{m}^2$ .

Die Form der Kraftkurve hängt neben der Anzahl und der Stärke der Bindungen auch von den viskosen und elastischen Eigenschaften der Zelle ab. Um diese in einem ersten Schritt zu erforschen, bietet das Kraftspektroskop ideale Voraussetzungen.

## 4.2 Elastizitätsmessungen

Durch die Vermessung des Eindrückverhaltens einer Kugel am Kraftsensor auf Zelloberflächen kann man deren visko-elastische Eigenschaften kraftspektroskopisch vermessen.

Das klassische statische Modell zur Beschreibung von aufeinanderdrückenden isotropen Körpern mit sphärischen Oberflächen ist vor über 100 Jahren von H. Hertz entwickelt worden [88].

Für den speziellen Fall einer Kugel vom Radius  $R$ , die auf eine Ebene drückt, gilt:

$$f_e = \sqrt{\frac{16 R E^2}{9 (1 - \nu^2)^2}} z^3 \quad (4-2)$$

$E$  bezeichnet den Elastizitätsmodul des Materials des Halbraumes. Das Poissonverhältnis  $\nu$  ist, unter der idealisierten Annahme von Volumenerhaltung - also reiner Gummielastizität, 0,5. Das gilt aber nur für kurzzeitige Belastung der Zelle (hier ca. 50 ms), bei der viskose Effekte nicht zum Tragen kommen.

Als typische Werte für Epithelzellen erhält man Elastizitäten von etwa 500 bis 4000 Pa.

HEC:	E	$2,3 \pm 1,5$ kPa
RL:	E	$3,1 \pm 2,0$ kPa
JAR:	E	$1,9 \pm 1,3$ kPa

Tabelle 4.1

Solange die eindrückende Bewegung so schnell und gering ist, daß Viskositäten nicht zum Tragen kommen, ist deren Vernachlässigung vernünftig.

Das Zell-Kraftspektroskop kann zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der verschiedenen Zellen im "visko-elastic-response-mode" verwendet werden. In diesem Modus wird die Kraftantwort der Zelle auf ein Dehnungsmuster mit einem adhäsiven Kraftsensor über einen bestimmten Zeitraum aufgezeichnet:

## 4.3 Viskositätsmessungen

Die viskoelastischen Eigenschaften einer Zelle werden wesentlich durch ihr Zytoskelett bestimmt. Aus rheometrischen Messungen [76,89] sind viskoelastische Daten zu Bestandteilen des Zytoskelettes bekannt. Die erste Bestimmung der

Zellelastizität über die Verbiegung einer Feder beim Drücken auf eine Zelle analog dem Kraftmikroskop [90,91] erfolgte 1932<sup>5</sup> [92]. Neuere Arbeiten drücken [74] und dehnen [70,93] die Zelle mit Mikropipetten ähnlich der hier entwickelten Technik:

Mit einer fibronektinbeschichteten Sphacrylkugel am Kraftsensor wird nach Kontaktzeiten von etwa 20 Minuten bei Kontaktkräften um 3 nN eine starke Adhäsion zu den hier verwendeten Epithelzellen aufgebaut (Abb. 4.2 C). Anschließend wird vom z-Piezo ein „Rechteckmuster“ durchlaufen, wie in Abb. 4.4 dargestellt: Die Zellen werden etwa 3  $\mu\text{m}$  gedehnt, die Position wird etwa 30 Sekunden gehalten bevor die Ausgangsposition wieder angefahren wird und bis zu Beginn des nächsten Zyklus für ebenfalls 30 Sekunden gehalten wird. Um die Viskoelastizität der Zelle ohne den Einfluß sich lösender Bindungen zu erhalten, beschränkt man die Dehnung  $z$  auf Auslenkungen unter 5  $\mu\text{m}$ . So wird die Zelle noch nicht so stark gedehnt, daß sich merklich Bindungen lösen können.

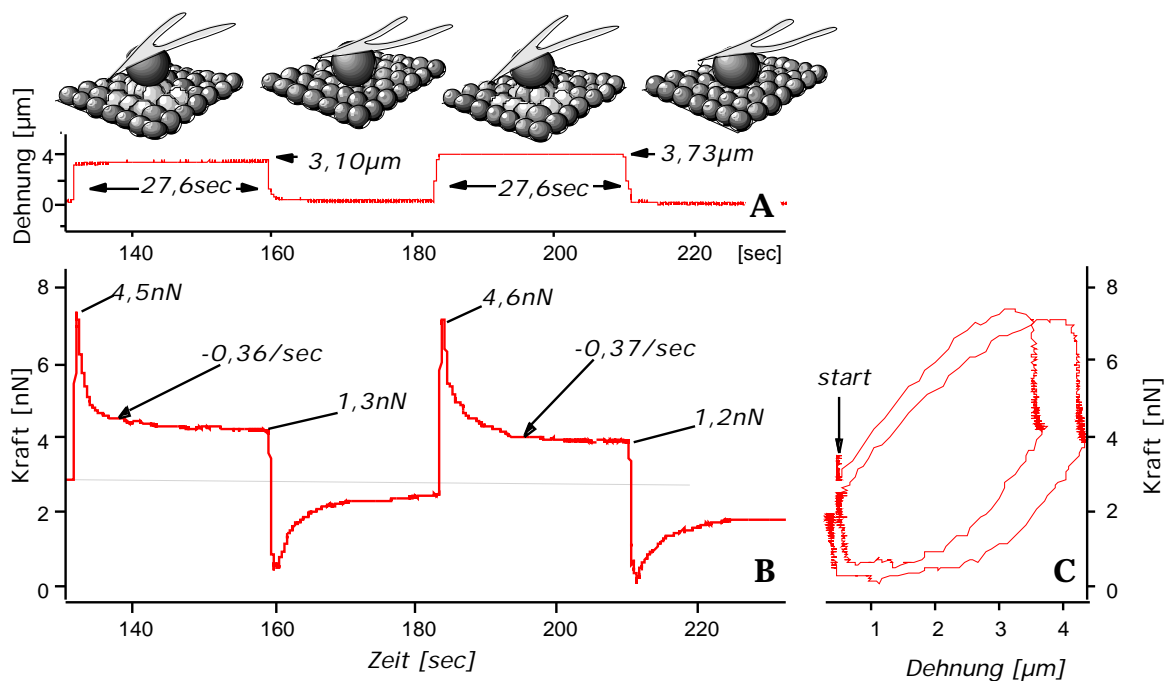


Abb. 4.4: Ein Rechteckdehnungsmuster (A), vermittelt durch eine FN-beschichtete Kugel am Kraftsensor, ruft eine charakteristische Kraftantwort einer RL-Zellschicht hervor. Sie kann gegen die Zeit (B) und gegen die Dehnung (C) aufgetragen werden.

Die Rechteckdehnung wurde ausgewählt, da für die gängigen Festkörpermodelle (Maxwell-, Voigt- und Kelvin- Körper) analytische Lösungen in Form von sogenannten Kriechfunktionen existieren [94].

Da die Messungen am besten mit dem Kelvin- Modell übereinstimmen, wird es zur weiteren Auswertung herangezogen. Es besteht aus einer Feder  $\mu$  und einer Viskosität  $\eta$  in Serie, denen eine zweite Feder  $\mu_0$  parallelgeschaltet ist (Abb. 4.1).

<sup>5</sup> Das war vermutlich der Großvater des Zelladhäsionskraftspektroskopes.

Beim Einschalten ( $t=0$ ) der Rechteckdehnung wird angenommen, daß die Viskosität  $\mu_1 \cdot \dot{z}_1$  vernachlässigt werden kann ( $\dot{z}_1 \ll \dot{z}$ ). Somit erhält man idealisiert ein rein federartiges Verhalten der Gesamtkraft ( $F=(\mu_0+\mu_1) \cdot z$ ). Nach genügender Haltezeit ( $t \gg \tau_1/\mu_1$ ) sind die viskosen Anteile der Zelle relaxiert, und die Endkraft gibt den Wert für einen federartigen Zustand  $\mu_0$ .

Aus dem exponentiell abklingenden Kraftverlauf ( $F(t) = e^{-\frac{\mu_1}{\tau_1} t}$ ) bei fester Piezoauslenkung, erhält man  $\tau_1$  aus dem Exponentialfit im relaxierenden Teil der Kraftkurve. In Abb. 4.5 sind die einzelnen Schritte noch einmal verdeutlicht.

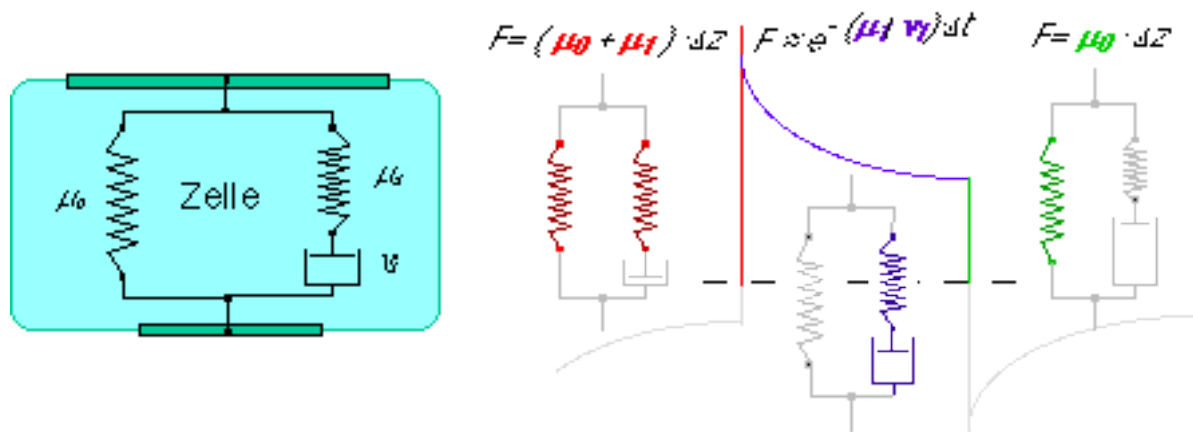


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Gewinnung der Kelvin-Elemente aus der Kriechfunktion.

Die verwendeten Zelltypen (HEC-1-A; RL-95-2; JAR; Abschnitt 5.1.3) unterscheiden sich demnach in ihren viskoelastischen Eigenschaften folgendermaßen:

	$\mu_0 =$	$\mu_1 =$	$\tau_1 =$
<b>HEC:</b>	<b>0,8 ± 0,6</b>	<b>1,5 ± 0,9</b>	<b>7,9 ± 3,8</b>
<b>RL :</b>	<b>1,6 ± 0,4</b>	<b>3,1 ± 0,8</b>	<b>13,0 ± 4,7</b>
<b>JAR:</b>	<b>1,1 ± 0,5</b>	<b>3,5 ± 1,1</b>	<b>16,5 ± 5,2</b>
	<b>nN/µm</b>	<b>nN/µm</b>	<b>nN·s/µm</b>

Tabelle 4.2

Zur Bestimmung dieser Werte wurden etwa 30 Kriechfunktionen pro Zelltyp ausgewertet. Auf diese Weise können charakteristische Daten über Zug- und Drucklastverhalten des Zytoskeletts gewonnen werden [94,95].

Beim Trennen der Zellen mit konstanter Zuggeschwindigkeit ist nicht zu unterscheiden, ob die Bindungen aufgrund der Zeitdauer der Belastung, oder durch die zunehmende Stärke der Belastung aufgehen. Daher wurden diese Viskoelastizitätsmessungen auch in einem Bereich durchgeführt, in dem die Zellen schon sehr weit gedehnt waren. In der Relaxationsphase sollten eventuell sich öffnende Bindungen beobachtbar sein.

Viele Bindungen gehen durch das Aufbauen der Belastung an der Rechtecksignalflanke auf, während in der Relaxationsphase keine Bindungstrennungstufen erkennbar sind. Bei Dehnungen über 20  $\mu\text{m}$  geht die Form der Kriechfunktion bei den HEC-Zellen in die des Maxwell-Körpers über. Dies entspricht dem Verlust der parallelen Elastizität  $\mu_0$ , sodaß die HEC-Zellen in diesem Bereich offenbar rein viskos ohne zytoskelettale Elastizität gedehnt werden. Die RL-Zellen weisen diesen Übergang ab etwa 40  $\mu\text{m}$  Dehnung auf. Bei Messungen mit lektinbeschichteten Kugeln konnten in der Relaxationsphase einige Abrißstufen beobachtet werden, was eine geringere Belastbarkeit der Zell-Lektinbindung bedeuten könnte.

Langsam und in kleinen Stufen, bis in den weit gedehnten Bereich durchgeführte Dehnungsexperimente bewirken eine stete plastische Deformierung der Zelle durch Reorganisationsvorgänge des Zytoskeletts. Dadurch verschiebt sich der theoretische Kontaktpunkt unkontrollierbar, und beim Auftreten von Drift ist die Bestimmung des Kraftnullpunktes nur noch schätzungsweise möglich. Solche Umordnungsprozesse im Zytoskelett wurden vornehmlich an den sehr weichen JAR-Zellen und den RL-Zellen beobachtet, während der elastische Beitrag des Zytoskelettes bei den HEC-Zellen mit zunehmender Dehnung immer weiter zurückgeht. Außerdem halten die Bindungen der RL- und JAR-Zellen zur Fibronektinkugel selbst nach Dehnungen von über 10  $\mu\text{m}$  Entfernung vom Kontaktpunkt den dabei auftretenden hohen Kräften stand. Für die HEC-Zellen war dies nur annähernd in Bereichen von unter 5  $\mu\text{m}$  und kleinen Kräften weit vor dem Erreichen der Maximalkraft der Fall, was darauf hindeutet, daß die Bindung an das Fibronektin oder die zytoskelettalen Verankerungen bei diesen Zellen weniger ausgeprägt sind.

#### 4.4 Das Zell-Tether-Modell

Mit den beschriebenen Daten aus Viskoelastizitäts- und Adhäsionsmessungen, sowie mit einigen vereinfachenden Annahmen und ergänzenden Meßdaten, kann nun ein Modell zur Beschreibung der Trennungskraftkurven (Abb. 4.2) nach Kontakten mit Zellschichten erstellt werden.

Die Adhäsionsantwort der Zellschicht - in Form einer Kraftkurve - auf unterschiedliche Kontaktzeiten und -kräfte dient dabei der Gewinnung und Überprüfung der erforderlichen Hypothesen um den Vorgang computergestützt nachmodellieren zu können. Das Zytoskelett und andere zur Festigkeit der Zelle beitragende, zytosolische Bestandteile werden dabei durch das Kelvin-Modell (Abschnitt 4.3) repräsentiert.



### 4.4.1 Bindungsbildung

Zu Beginn des Experimentes wird eine funktionalisierte Kugel am Kraftsensor mit einer Zellschicht bei einer bestimmten Kraft und für eine bestimmte Zeit in Kontakt gebracht. Ab der Berührung zwischen Zellen und Kraftsensor können sich Bindungen ausbilden. Sei es durch unspezifische Wechselwirkungen, wie Elektrostatik, Van-der-Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben oder hydrophilen Wechselwirkungen zwischen zufällig aneinander geratenden Molekülen, oder eben durch gezieltes Sichfinden von spezifischen Rezeptor-Ligand-Paaren. Teils sind die Bindungspartner in der Zellmembran schon vorhanden, teils werden sie möglicherweise erst durch das Kontaktsignal von der Zelle synthetisiert oder aktiviert (Abb. 4.6).

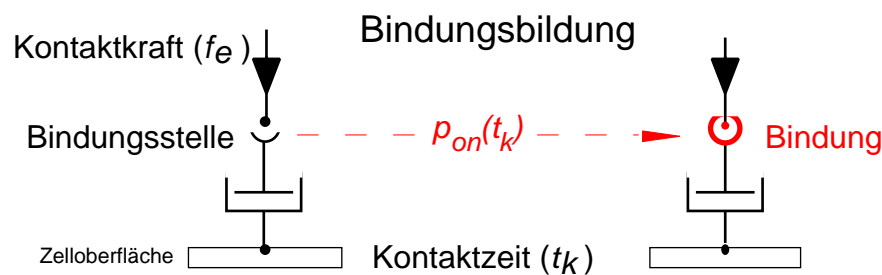


Abb. 4.6: Die Bindungsbildung an einer potentiellen Bindungsstelle ist abhängig von der Kontaktkraft und der Kontaktzeit.

Die Gesamtzahl der möglichen Bindungen  $b_{max}$  im Kontaktbereich  $K$  der Zellwechselwirkung ist durch die Dichte der Adhäsionsmoleküle  $d$  auf der Zelloberfläche begrenzt. Ihr Wert ist in verschiedenen Veröffentlichungen mit bis zu  $1000/\mu\text{m}^2$  [96] angegeben.

$$b_{max} = d \cdot K \quad (4-3)$$

Es wird angenommen, daß die Bindungsstärke aller Adhäsionsmoleküle gleich groß sei, wobei die Wahrscheinlichkeit zum Binden  $p_{on}$  und die zum Lösen  $p_{off}$  sei. Abhängig von der Dauer der Kontaktzeit  $t_k$  können sich Bindungen bis zur maximal möglichen Zahl  $b_{max}$  finden. Die Wahrscheinlichkeit zur Bildung neuer Adhäsionen nimmt mit der Anzahl der geschlossenen Bindungen ab, da immer weniger freie Partner zur Verfügung stehen.

$$b(t_k) = b_{max} \cdot (1 - e^{-t_k}) \quad (4-4)$$

Die Werte der stärksten Adhäsion  $F_{max}$  verschiedener Adhäsionskraftkurven nähern sich mit zunehmender Kontaktzeit einem Sättigungswert (Abb. 4.7). Unter der Annahme eines exponentiellen Verhaltens von  $F_{max}$  kann der Exponent (4-4) ermittelt werden, der mit der Bindungswahrscheinlichkeit  $p_{on}$  korreliert.

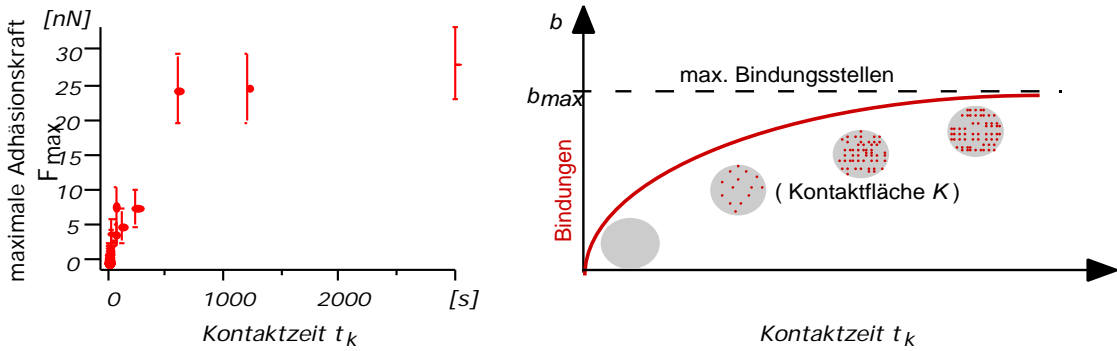


Abb. 4.7: Die Kontaktzeitabhängigkeit des Adhäsionsmaximums einer JAR-Kugel auf HEC-Zellen (links) dient der Gewinnung des Exponentialkoeffizienten  $\lambda$ . Die zunehmende Belegung der Kontaktfläche  $K$  durch geschlossene Bindungen bis zur maximal möglichen Anzahl  $b_{max}$  ist rechts dargestellt.

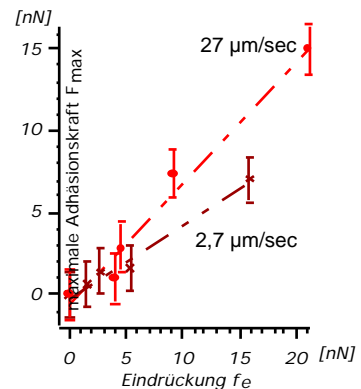
Je mehr Kraft auf die Zellkontaktstelle ausgeübt wird, desto größer wird die Kontaktfläche  $K$  und folglich auch die Zahl der zu Verfügung stehenden Bindungsstellen (Abb. 4.3).

Mit dem Hertzmodell [88] läßt sich der Zusammenhang zwischen der Eindrückung  $z$  einer Halbkugel (Radius  $R \gg z$ ) in einen ebenen Halbraum und der dafür benötigten Kraft  $f_e$  beschreiben (4-2). Einsetzen von (4-1) in (4-2) aus Abschnitt 4.4 ergibt als Zusammenhang zwischen  $K$  und  $f_e$ :

$$K = \sqrt[3]{\frac{9}{16} \frac{(1 - \nu^2)^2}{E^2} R^2 f_e^2} \tag{4-5}$$

Adhäsionsexperimente mit verschiedenen Kontaktkräften (Abb. 4.8) zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der maximalen Zelladhäsionskraft und Kontaktkraft des Kraftsensors während eines einminütigen Kontaktes.

Abb. 4.8: Abhängigkeit der maximalen Adhäsionskraft  $F_{max}$  von der Kontaktkraft (zwischen JAR-Kugeln und HEC-Zellen nach Kontakten von 1 min bei verschiedenen Separations-geschwindigkeiten).



Der Einfachheit halber wird daher ein linearer Zusammenhang zwischen der Kontaktkraft  $f_e$  und der Kontaktfläche  $K$  konstruiert, dessen Proportionalitätskonstante  $K$  experimentell oder durch Berechnen des Quotienten  $(4-1)/(4-2)$  ermittelt werden kann:

$$\frac{d(f_{max})}{d f_e} \text{ konstant} \quad K \quad f_e \tag{4-6}$$

Für alle Zelltypen beträgt etwa  $140 \pm 40 \mu\text{m}^2 / \text{nN}$ , und als Formel für die Anzahl der geschlossenen Bindungen  $N$  pro Flächeneinheit in Abhängigkeit von der Kontaktzeit  $t_k$  bei der Kontaktkraft  $f_e$  ergibt sich:

$$N := b(t_k) = f_e d (1 - e^{-t_k}) \quad (4-7)$$

$N$  ist also die Anzahl der Bindungen nach einem Zellkontakt bestimmter Stärke und Dauer, die beim Zurückziehen des Kraftsensors wieder gelöst werden müssen.

#### 4.4.2 Die Bindungstrennung

Im nächsten Schritt werden die Eigenschaften der Bindungstrennung in das Modell eingearbeitet. Die Zelladhäsionskraftkurven sind dafür wieder die Grundlage und können grob in drei Bereiche geteilt werden:

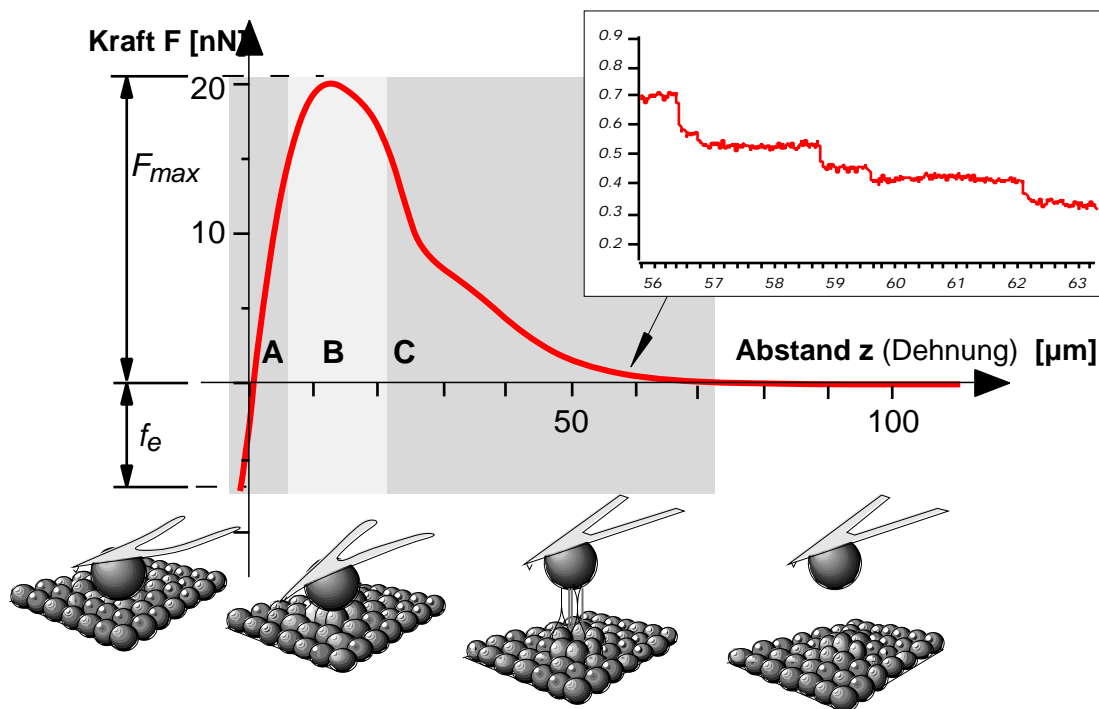


Abb. 4.9: Schema einer typischen Kraftkurve mit den Abschnitten A,B und C.

- A: Der annähernd linear ansteigende hooke'sche Bereich vor dem Maximum der Kraft gibt Auskunft über die Zellelastizität unter Zugbeanspruchung.
- B: Im Bereich um das Maximum ist die Zelle "bis zum Zerreißen" gedehnt und ein Großteil der Bindungen muß dieser maximalen Belastung nachgeben.
- C: Im abklingenden Bereich nach dem Maximum, reißen nach und nach alle übrigen Bindungen in gut erkennbaren einzelnen Stufen vollständig ab.

Für das Modell werden diesen drei Abschnitten zwei Mechanismen zugeordnet, wobei der zweite Abschnitt (B) mit dem Kraftmaximum den Übergangsbereich zwischen diesen beiden Mechanismen darstellt:

#### 1. Dehnung des Zytoskelettes

Im hooke'schen Bereich sind noch so viele Bindungen aktiv, daß die Zelle als Ganzes, somit vornehmlich das Zytoskelett, wie eine Feder gedehnt wird. In diesem Bereich sind auch die Viskoelastizitätsdaten ermittelt worden (Abschnitt 4.3). Im Übergangsbereich können die Bindungen der zunehmenden Zugspannung des elastisch gedehnten Zytoskelettes nicht mehr standhalten. Aus den Kraftkurven ist jedoch weiterhin eine extreme Dehnung der Zellen bei abnehmender Kraft erkennbar. Allerdings kann die Zelle die Verbindung zum Kraftsensor nur noch über Bindungen aufrecht halten, die vermutlich gar nicht oder nur schwach mit dem Zytoskelett verankert sind.

#### 2. Tetherbildung

Dieser zweite Mechanismus der Zelldehnung erfolgt über schlauchartige Membranausstülpungen (Tether)<sup>6</sup>, deren Längen den Zelldurchmesser je nach Zelltyp um knapp zwei Größenordnungen übersteigen können [97].

##### 4.4.2.1 Die Tetherbildung

Während die Zelldehnung mit dem vorgestellten Kelvin-Modell gut beschrieben werden kann, wird nun auf den abklingenden Bereich der Trennungskraftkurve (Abb. 4.9) näher eingegangen. Hier existiert eine Verbindung zwischen Zelle und Kraftsensor, obwohl die Zelle schon „maximal“ gedehnt zerreißen müsste.

Aus der detaillierten Betrachtung dieses Bereiches von Kraftkurven der Trennungen zwischen BSA beschichteten Kugeln von HEC- oder RL- Zellen erhält man Anzeichen für eine überwiegend viskose Ankopplung der Bindungsproteine an die Zelle (Kelvin-Körper): Die Kurven zeigen, abhängig von der Zuggeschwindigkeit, „Treppenstufen“ verschiedener Höhe im Kraftverlauf. Im hier gezeigten Beispiel von  $\dot{z} = 7 \mu\text{m}/\text{s}$  liegen die Stufenhöhen zwischen 20 und 140pN (Abb. 4.10). Die Stufenhöhen häufen sich im Mittel bei etwa 50 pN. Sie sind nicht durch einen Kraftanstieg vor dem Abriß gekennzeichnet, wie es von einer rein federartigen Ankopplung zu erwarten wäre. (Bei den RL-Zellen sind ab und zu noch Stufen mit vorausgehender Steigung zu erkennen, was vereinzelte Verbindungen zu Aktinnetzwerkbruchstücken vermuten läßt.)

---

<sup>6</sup> Tether sind am anschaulichsten mit den Fäden vergleichbar, die ein außer Kontrolle geratener Kaugummi zwischen den Fingern zieht. Ihre Kraftwirkung ist nur während zusätzlicher Dehnung spürbar.

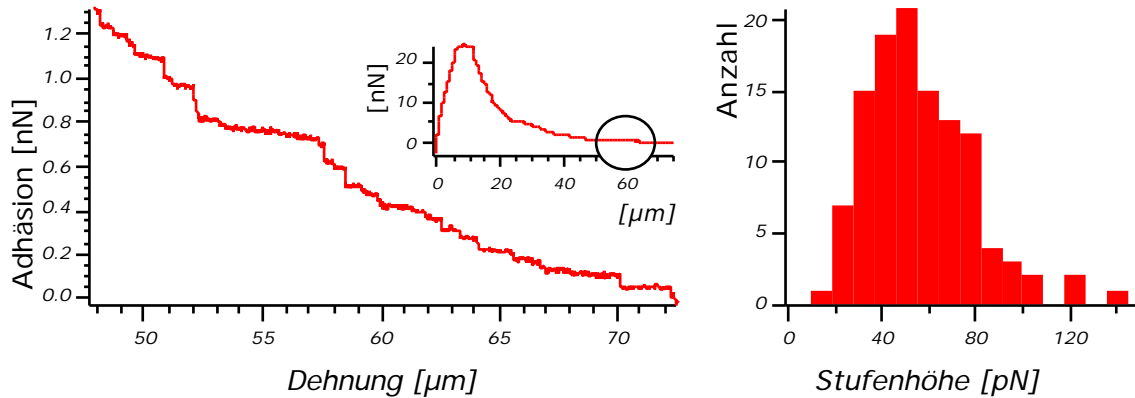


Abb. 4.10: Vermessung der Kraftstufen bei der Trennung einer BSA-Kugel von HEC-Zellen. Die häufigste Stufenhöhe liegt bei etwa 50 pN.

In der Literatur [77,98] sind solche Tetherphänomene bekannt, und ihre viskosen Reibungen sind z.B. bei Experimenten mit Erythrozyten  $3 \text{ pN} \cdot \text{s}/\mu\text{m}$  bei Zuggeschwindigkeiten von  $0,5$  bis  $2 \text{ } \mu\text{m}/\text{s}$  vermessen worden [97].

Die Bindungsstellen an der Zelloberfläche werden folglich für das Modell durch je ein viskoses Element mit dem Zytoskelett verbunden (Abb. 4.6 und Abb. 4.11).

Dies geschieht auch im Einklang mit den im „visko-elastic-response-mode“-Messungen in einiger Entfernung ( $>40 \text{ } \mu\text{m}$ ) vom Kontaktpunkt (Abschnitt 4.3), da sich die Zellen in diesem Tetherbereich eher viskos verhalten.

#### 4.4.2.2 Das Modell

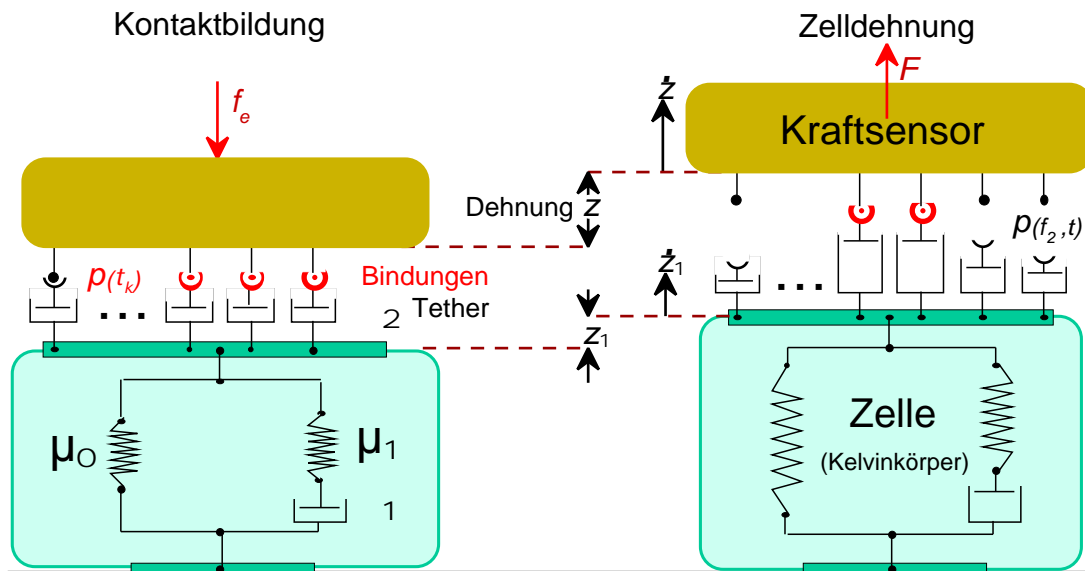


Abb. 4.11: Darstellung des Zell-Tether-Modells.

Das Dehnungsverhalten der Zelle läßt sich folglich, wie in Abb. 4.11 skizziert, mit den zytosolischen Elastizitäten und Viskositäten des Zellkörpers (Zytoskelett) und mit einer zusätzlichen membranvermittelten viskosen Ankopplung der extrazellulären Bindungsstellen beschreiben. Der Kelvin-Körper aus einer Feder ( $\mu_1$ ) und einer Viskosität in Serie ( $\eta_1$ ), denen eine Feder ( $\mu_0$ ) parallel geschaltet ist,

repräsentiert den zytosolischen Teil, der durch die Eigenschaften des Zytoskelettes dominiert ist. Daran in Serie sind alle Adhäsionsmoleküle individuell über Viskositäten ( $\mu_1$ ) angekoppelt, um die Tetherbildung zu beschreiben<sup>7</sup>. Zunächst werden Zelldehnung und Tetherbildung isoliert betrachtet. Dies ist möglich, da die beiden Komponenten wie Federn in Reihe geschaltet sind. Zur Unterscheidung werden alle Größen, die mit der Zelldehnung zusammenhängen mit „1“ (und „0“) indiziert während mit „2“ die Variablen der Tetherdehnung gekennzeichnet sind. Aus dem Kelvin-Modell leitet sich die Kraftantwort der Zelle (1) auf eine zeitlich veränderliche Dehnung  $z_1(t_r)$  unter Berücksichtigung der Viskosität  $\mu_1$  und der Federn  $\mu_0$  und  $\mu_1$  folgendermaßen ab:

$$F_1 = \frac{1}{\mu_1} \dot{z}_1 + \frac{1}{\mu_0} z_1 = (t_r z_1; \dot{z}_1) \quad (4-8)$$

Für  $z_\mu$  und  $z$  gilt dabei:

$$z_\nu(t_r) + z_\mu(t_r) = z_1(t_r) \quad (4-9)$$

Für alle N Tether ist die Kraft  $f_2$  auf die j-te Bindungsstelle:

$$f_2^{(j)} = \dot{z}_2^{(j)} \quad (4-10)$$

Die Gesamtkraft  $F_2$  verteilt sich wegen der Parallelschaltung aller Bindungsviskositäten  $\mu_2^{(j)}$  gemäß

$$F_2 = \dot{z}_2 \sum_{j=1}^N \mu_2^{(j)} = N \dot{z}_2 \mu_2 = N f_2 \quad \mu_2^{(j)} = \mu_2; 1 \leq j \leq N \quad (4-11)$$

auf die insgesamt N identisch mit  $\mu_2^{(j)} = \mu_2$  angekoppelten Bindungen. Wird der Kraftsensor mit der konstanten Geschwindigkeit  $\dot{z}$  zurückgezogen, dehnen sich sowohl die Zelle (1) mit  $\dot{z}_1$  als auch die einzelnen Viskositäten (Tether) an den Bindungen (2) mit  $\dot{z}_2$ . Dabei gilt allgemein

$$\dot{z} = \dot{z}_1 + \dot{z}_2 = const \quad (4-12)$$

und

$$z = z_1 + z_2 \quad (4-13)$$

Die Kraft, die dabei am Kraftsensor gemessen wird, ist wegen der Serienschaltung der Zelle (1) und der Tether (2) dieselbe, die am Kelvin-Element (1) zieht, und auf die Gesamtzahl der viskos gekoppelten Bindungen (2) wirkt:

$$F = F_1 = F_2 \quad (4-14)$$

Die Bruchwahrscheinlichkeit für eine belastete Bindung ist abhängig von der Stärke  $f_2$  und der Dauer  $t_r$  der Zugbelastung der Bindungsstelle [99].

<sup>7</sup> Im Gegensatz zur molekular beschichteten Kugel sind im Falle der mit JAR-Zellen bewachsenen Kugel am Kraftsensor entsprechend zwei solcher Zell-Tether-Modelle in Serie zu betrachten.

$P$  ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Bindung nach der Belastungszeit  $t_r$  noch vorhanden ist:

$$P(t_r) = e^{-\frac{f_2}{l_0} t_r} \quad (4-15)$$

$l_0$  sei dabei ein Maß für die mittlere Belastbarkeit der Bindung. („Wie lange kann im Mittel welche Last ausgehalten werden?“ vgl.: (2-5))

Da (4-6) die Anzahl aller geschlossenen Bindungen zur Zeit  $t_r=0$  beschreibt ergibt sich die Anzahl der nach der Zugzeit  $t_r$  vorhandenen Bindungen  $N(t_r)$  zu:

$$N(t_r) = b(t_k) e^{-\frac{f_2}{l_0} t_r} \quad (4-16)$$

Aus der Summe der noch vorhandenen Bindungen  $N(t_r)$  nach der Zugzeit  $t_r$  und Gleichung (4-11) ergibt sich dann die Gesamtkraft  $F = F_2$ :

$$F_2 = N(t_r) \dot{z}_2 \quad (4-17)$$

Damit und unter Verwendung von (4-16) und (4-14), wobei die Kelvin-Formel (4-8) mit abgekürzt wurde, erhält man schließlich eine verschränkte Formel für den Verlauf der gemessenen Kraft  $f_2$  auf die Einzelbindung:

$$f_2 = \dot{z}_2 = \frac{F}{N(t_r)} = \frac{(t_r; z_1; \dot{z}_1)}{b(t_k) e^{-\frac{f_2}{l_0} t_r}} \quad (4-18)$$

Die Nebenbedingungen (4-12) und (4-13) reichen nicht aus um das System analytisch vollständig zu lösen, da schon nicht allgemein lösbar ist. Eine computergestützte Näherungslösung wird wegen der Serienschaltung der beiden Komponenten Zelle (1) und Bindungen (2) wiederum getrennt behandelt:

Um die Zugkraft der Zelle für die kontinuierliche Dehnung  $z_1$  mit der nicht konstanten Geschwindigkeit  $\dot{z}_1$  zu ermitteln, wird sie iterativ bestimmt und während jedes Zeitschrittes  $t$  wird die Dehnung als konstant betrachtet. Die aktuelle Auslenkung der Zelle beträgt folglich nach dem  $i$ -ten Schritt:

$$z_1^{(i)} = \sum_{k=0}^i t \dot{z}_1^{(k)} \quad (4-19)$$

Die Kriechfunktion der Zelle besitzt für eine konstante Dehnung und identische Zeitschritte  $t$  eine analytische Lösung mit konstantem  $\sigma$ :

$$F_1 = \mu_0 \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad z_1 = z_0 + z_1; \quad \tau := \frac{1}{\mu_0} \left( 1 + \frac{\mu_0}{\mu_1} \right); \quad \tau := \frac{1}{\mu_1} \quad (4-20)$$

Für eine Rechnersimulation löst man (4-20) für jede Dehnstufe  $z_1 = z_1^{(i-1)} + \dot{z}_1^{(i)} t$  während des Zeitintervalls  $t$  und ermittelt für jeden Schritt  $i$  die Kraft  $F_1^{(i)}$  aus der Kriechfunktion:

$$F_1^{(i)} = \int_0^t \left( z_1^{(i-1)} + \dot{z}_1^{(i)} \right) dt \quad (4-21)$$

Analog findet die Dehnung der Tether (2) in den gleichen Zeitschritten statt:

$$z_2^{(i)} = \int_{k=0}^i \dot{z}_2^{(k)} dt \quad (4-22)$$

Wobei die Kraft  $f_2$  auf die einzelne Bindung gemäß (4-17) aus  $F_2$  hervorgeht:

$$f_2^{(i)} = \frac{F_2^{(i)}}{N^{(i)}} = \int_2 \dot{z}_2^{(i)} \quad (4-23)$$

Mit der Bedingung (4-14) folgt die Verbindung zwischen den Komponenten Zelle (1) und Tethern (2):

$$F_1^{(i)} = \int_0 \left( z_1^{(i-1)} + \dot{z}_1^{(i)} \right) dt = N^{(i-1)} \int_2 \dot{z}_2^{(i)} = F_2^{(i)} \quad (4-24)$$

Da  $N$  explizit von  $F$  abhängt, wird für  $N$  der Wert des vorangegangenen Iterationsschrittes eingesetzt.

Durch Einsetzen der Bedingung (4-12) erhält man daraus schließlich die zur Bestimmung von  $F_2$  nötige Gleichung für die Dehnungsgeschwindigkeit  $\dot{z}_2^{(i)}$  der Tether:

$$\dot{z}_2^{(i)} = \frac{\int_0 \left( z_1^{(i-1)} + \dot{z}_1^{(i)} \right) dt}{N^{(i-1)} \int_2 + \int_0 t} \quad (4-25)$$

Aus  $f_2$  kann nun erst die Zahl der noch nicht gerissenen Bindungstellen  $N$  für den nächsten Iterationsschritt gemäß (4-16) neu bestimmt werden:

$$N^{(i)} = N^{(i-1)} e^{-\frac{f_2}{l_0} t} \quad (4-26)$$

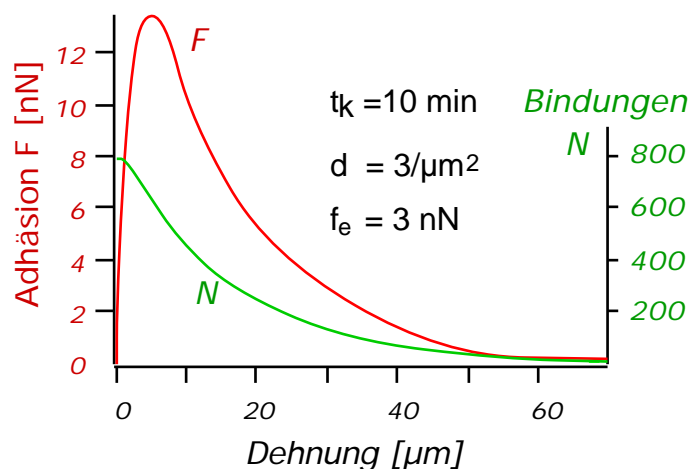


Abb. 4.12: Rechnersimulation für 3 Bindungen/  $\mu\text{m}^2$  der Belastbarkeit 50 pN-s für einen 10 minütigen Zellkontakt und die Anzahl der noch vorhandenen Bindungen.



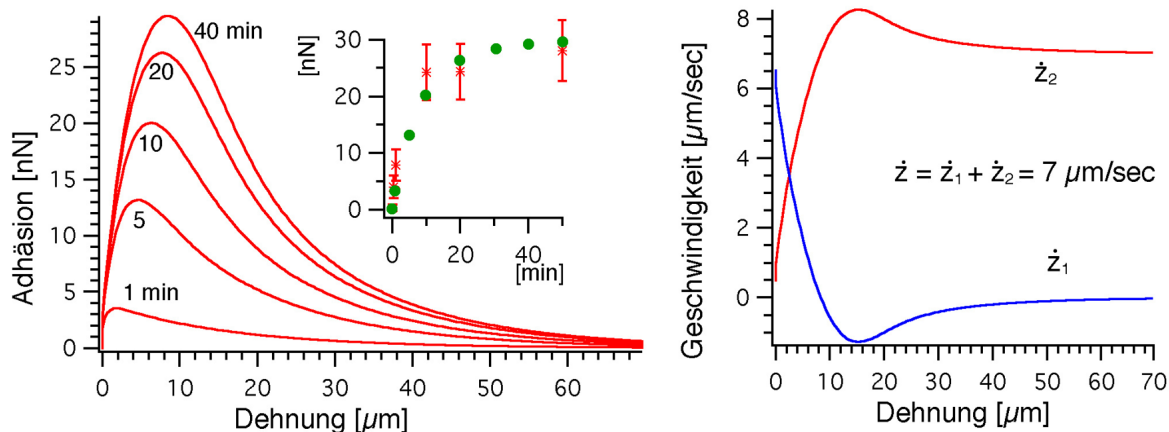


Abb. 4.13: Die Ergebnisse der Rechnersimulation für 3 Bindungen/ $\mu\text{m}^2$  der Belastbarkeit 50 pN·s sind links als Kraftkurven dargestellt. Das Verhalten der simulierten Adhäsionsmaxima (Punkte) und der gemessenen (Fehlerbalken) ist klein darübersetzt. Rechts der Verlauf der Geschwindigkeiten der Zelloberfläche  $\dot{z}_1$  und der Tether  $\dot{z}_2$ .

Der Verlauf der simulierten kontaktzeitabhängigen Kraftkurvenscharen entspricht sehr gut den gemessenen Daten aus Abschnitt 4.1; ebenso auch das Verhalten der Adhäsionsmaxima.

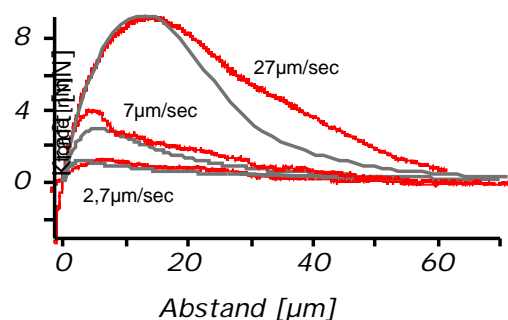
Die meisten Variablen ( $t_k$ ;  $f_e$ ;  $z$ ;  $\dot{z}$ ;  $t_r$ ) sind direkt durch das Experiment wählbar und dadurch gut bestimmt, während die Kontaktfläche  $K$  damit nur mittelbar zusammenhängt und dadurch mit weniger Genauigkeit bestimmt ist. Andere Konstanten sind durch Zusatzmessungen bestimmbar: die Zelleigenschaften, repräsentiert durch  $\mu_0$ , aus den Viskoelastizitätsmessungen, oder die Konstanten  $\mu_1$  und  $\mu_2$  durch Auswertung der Adhäsionskraftkurven bei verschiedenen Kontaktkräften und Kontaktzeiten. Die potentielle Bindungsdichte  $d$  und der Viskositätsanteil  $\mu_2$  der Tether sind nur grob im Rahmen der bereits bekannten Daten [96] abschätzbar. Die folgende Tabelle 4.3 faßt noch einmal alle Größen und deren Werte, die in das Zell-Tether-Modell eingearbeitet wurden zusammen:

$t_k$ :	Kontaktzeit	einstellbar	( 0 sec....40 min )
$f_e$ :	Kontaktkraft	einstellbar	( 1 nN.....20 nN )
$K$ :	Kontaktfläche	gemessen	( 500 ±140 $\mu\text{m}^2$ )
$\alpha$ :	Linearisierungsfaktor	experimentell bestimmt	( ca.140 $\mu\text{m}^2 / \text{nN}$ )
$\beta$ :	Abklingkonstante	experimentell bestimmt	( 0,05/min )
$d$ :	potentielle Bindungsdichte	<b>simuliert</b>	? 0-10/ $\mu\text{m}^2$ ?
$z$ :	gezogene Strecke	direkt gemessen	( 60-90 $\mu\text{m}$ )
$\dot{z}$ :	Zuggeschwindigkeit	einstellbar:	( 1...30 $\mu\text{m} / \text{sec}$ )
$t_r$ :	Dauer der Zugbelastung	direkt gemessen	( 1 sec -100 sec )
$l_0$ :	Belastbarkeit einer Bindung	<b>abgeschätzt</b>	? 50 ±30 pN·sec ?
$\mu_0$ :	Kelvin-Elemente ( $\mu_0, \mu_1, \mu_2$ )	experimentell bestimmt	( Tabelle 4.2 )
$\mu_2$ :	viskoses Element	<b>unbekannt</b> (Literatur.)	? 3 ±2 pN·sec/ $\mu\text{m}$ ?

Tabelle 4.3

Die Belastbarkeit der Einzelbindung  $l_0$  ist mit 50 pN·s aus den Kraftstufen (Abb. 4.10) möglicherweise zu hoch angesetzt, da die Belastung der Bindungen mit der tatsächlichen Abrißkraft, deren Wert hier eingesetzt wurde, vermutlich unter einer Sekunde liegt. Die unbekannt Parameter  $d$ ,  $l_0$  und  $\tau_2$  können jedoch durch sinnvolles Probieren mit dem Modell selbstkonsistent angenähert werden, wobei  $\tau_2$  mit den Messungen von Hochmuth und Evans [97] übereinstimmt. Dabei stellen sich mit den oben angegebenen Werten maximale Bindungsdichten von  $4/\mu\text{m}^2$  für die unspezifische BSA-Wechselwirkung und nur  $0,8/\mu\text{m}^2$  für die Adhäsion an Amylose. Im Vergleich zu den Abschätzungen anderer Autoren von bis zu  $1000/\mu\text{m}^2$  [96] erscheint die Bindungszahl sehr gering. Allerdings sind in das Modell nur „starke“ Bindungen von  $l_0 = 50$  pN·s eingegangen, die aus den Tetherstufen abgeleitet sind, viele kleinere Wechselwirkungen, die vermutlich am Anfang der Zelltrennung in großer Anzahl vorhanden sind, werden dadurch außer Acht gelassen. Daher gibt das Modell eher die Zahl der Tether wieder, während die tatsächliche Zahl der Bindungen möglicherweise um eine Größenordnung höher liegt.

Abb. 4.14: Simulierte Daten (dünnere Linie) und experimentelle Daten bei verschiedenen Zuggeschwindigkeiten.



Außerdem ist das Modell in der Lage die Abhängigkeit der Trennungskraftkurven von der Zuggeschwindigkeit für die hier verwendeten Zelltypen den Experimenten entsprechend wiederzugeben. Je langsamer die Zuggeschwindigkeit ist, desto niedriger wird die maximale Abrißkraft (Abb. 4.14). Das bedeutet, daß die Belastungskonstante  $l_0$  für die Bindung offenbar doch gut gewählt wurde, da sie im Modell nicht nur die Bindungsbruchlast, sondern auch die Belastungszeit bestimmt, die bei langsameren Geschwindigkeiten entsprechend länger ist. Dieses Modell ist in der Lage die Kraft-Dehnungskurvenscharen für unabhängige membranproteinvermittelte Zellbindungen zu beschreiben. Für die verschiedenen Zelltypen (HEC-1-a, RL95-5) liefert das Modell, wie auch das Experiment, kaum unterschiedliche Kurvenverläufe wegen der ähnlichen viskoelastischen Eigenschaften. Schließlich bietet es eine physikalisch diskutabile Grundlage zum Verständnis der wichtigen Parameter zur Bindungsbildung zwischen Zellen und zum Verlauf der Kräfte sowie zwei wesentlichen Subprozessen während der Zelltrennung.

Für nicht unabhängige Bindungen, die sich kooperativ miteinander vernetzen können und starke zytoskelettal verankerte Inseln ausbilden (2.2.3) kann dieses Modell unabhängiger Bindungen nicht mehr angewendet werden.

## 4.5 Zellen am Kraftsensor

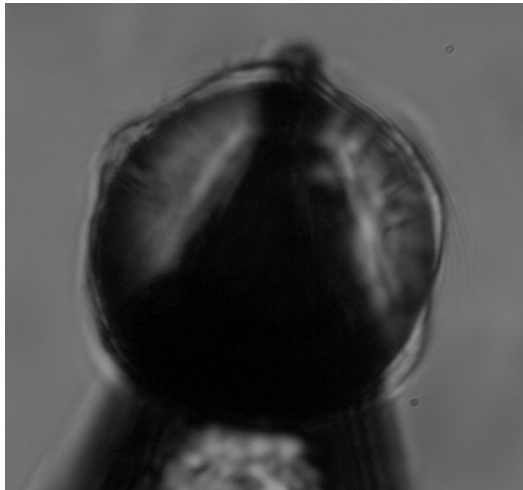


Abb. 4.15: Bild eines knochenzellenbewachsenen Zellsensors. Die Zellen spannen einen dünnen Rasen auf die Kugel. Nur die Gegend des Zellkerns hebt sich etwas von der Kugel ab.

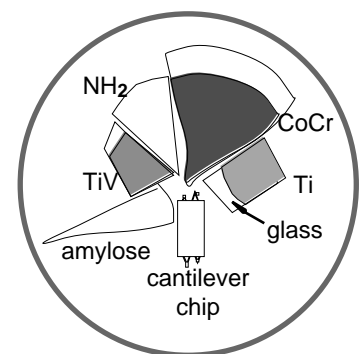


Abb. 4.16: Skizze der Petrischale mit Scherben bedampfter oder funktionalisierter Deckgläschen.

Genauso, wie man mit einem funktionalisierten Kraftsensor unterschiedliche Zellen adressieren kann, kann man anders herum auch versuchen mit einem zellbeschichteten Kraftsensor unterschiedliche Oberflächen zu adressieren. Auf fibronectinbeschichteten Kugeln an einem Kraftsensor konnten nach der Methode von R. Röspel [83] erfolgreich Osteoblasten (Knochenzellen SaOS) kultiviert werden (siehe Anhang).

Mit solchen Zell-Sensoren (Abb. 4.15) wurden verschieden präparierte Substrate (Abb. 4.16) in derselben Kulturschale adressiert und deren Adhäsionseigenschaften am Zellrasen auf der Kugel vermessen. Dabei wurden die Zellen mit etwa 200 pN auf das jeweilige Substrat gedrückt und sofort oder nach 10 Minuten wieder zurückgezogen.

Der eigentliche Zweck, herauszufinden welche der untersuchten Metalle, aufgrund der Adhäsion mit diesen Zellen, für Knochenimplantate am geeignetsten seien, konnte nicht befriedigend erfüllt werden. Die Charakterisierung der Wechselwirkung erfolgte allerdings nur durch Vermessung der maximalen Adhäsionskräfte. Knochenzellen auf Glas ( $\text{SiO}_2$ ) zeigen nach kurzen Kontakten keine deutlichen Unterschiede zu den Experimenten auf Chrom (Cr), Kobalt-Chrom (CoCr) oder Titan (Ti) bzw. Titan-Vanadium (TiV) (Abb. 4.17).

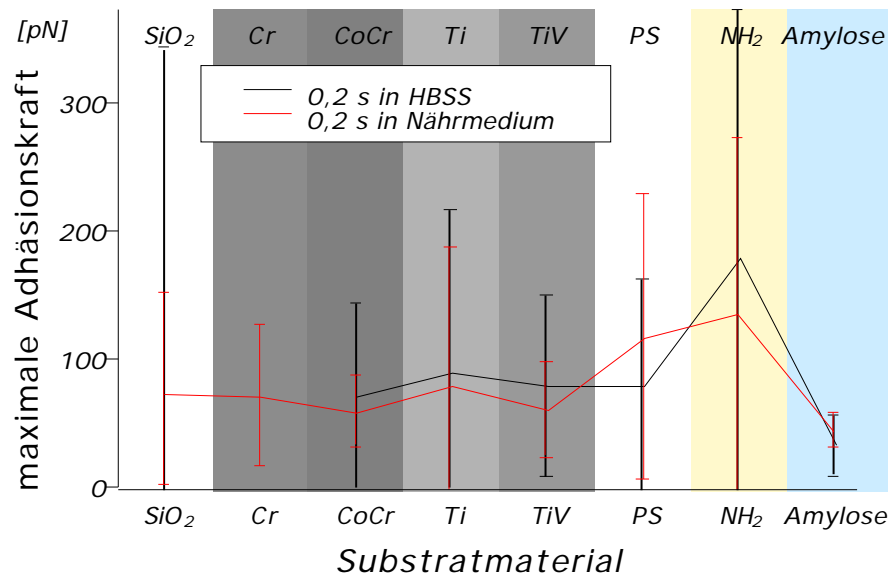


Abb. 4.17: Maximale Adhäsionskräfte nach kurzen Zellkontakten (0,2s) auf verschiedenen Proben in Zellmedium oder in Salzlösung (HBSS). (Die Balken geben die Streuung der Meßwerte wieder)

Es stellt sich jedoch heraus, daß die Oberflächenneutralisierung durch Amylose wiederum signifikant - wenn auch nicht perfekt - ist, und Aminogruppen (NH<sub>2</sub>) für Zelloberflächen sehr attraktiv sind. Leider hebt sich der Unterschied zwischen den Messungen mit und ohne Medium nicht deutlich von den Streuungen der 5 bis 20 Meßwerte pro Punkt ab. Dennoch ist tendenziell die Adhäsion mit Nährmedium abgeschwächt, außer im Fall der Adhäsion auf Petrischale (PS).

Die Adhäsionen nach 10-minütigen Kontakten der knochen-zellbewachsenen Kugel am Kraftsensor scheinen die Tendenzen der kurzzeitigen Kontakte noch zu verstärken. Der Einfluß der Zusätze für Zellmedien, die jahrzehntelang immer besser und zellspezifischer ausdifferenziert wurden, kann aus dem Vergleich von reiner Salzlösung HBSS und vollständigem SaOS-Medium (Anhang) zumindest tendenziell verdeutlicht werden. Offenbar ist die Mediumzusammensetzung für den Einsatz in Petrischalen und Plexiglasflaschen optimiert, da die Adhäsion auf Plexiglas durch Mediumzusätze stark ansteigt, während die Adhäsionen der anderen Materialien sich eher nivellieren: die unadhäsive Amylose wird durch sich anlagernde Mediumzusätze kaum adhäsiver während die stark adhäsiven Aminogruppen sich mit Proteinen aus der Lösung absättigen und Adhäsion verlieren (Abb. 4.17 und Abb. 4.18).

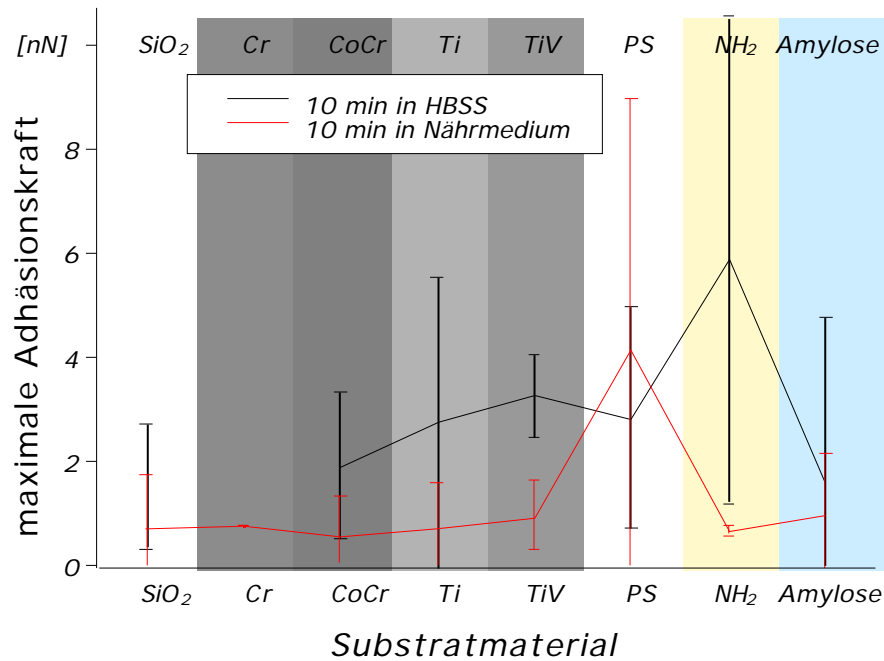


Abb. 4.18: Maximale Adhäsionskräfte nach 10-minütigen Zellkontakten auf verschiedenen Proben in Zellmedium oder in Salzlösung (HBSS). (Die Balken geben die Streuung der Meßwerte wieder)

Analog scheinen die Mediumzusätze die Adhäsion auf unbehandelten Metalloberflächen zu beeinflussen. Allerdings ist die Adhäsion an Metallen vermutlich durch die Kontaktkraft provoziert, indem Membranproteine unnatürlich nahe an die Oberfläche kommen, dort Ladungswchselwirkungen aufbauen oder denaturiert werden und unspezifisch adhären. Wenn man nach diesen Messungen geht, sind Titan und Titan-Vanadium möglicherweise die besseren Kandidaten für Implantatbeschichtungen. Messungen von J. Domke nach der in Abb. 3.11 beschriebenen Methode am selben System in Zellmedium nach zweitägiger Adhäsion der Zellen zeigen eine eventuell mit der Oberflächenrauigkeit korrelierte Präferenz der Zellen für Ti und PS. Allerdings kann die medizinisch interessantere Situation nach monatelangem Kontakt der Zellen mit einem Material sich auf vielfältige Weise wandeln. Für solche Aussagen ist das Zelladhäsionskraftspektroskop gegenwärtig nicht richtig spezifiziert.

---

---

## 5 Interaktionen zwischen Zellverbänden

In höheren Organismen gibt es nur wenige eigenständige Zellen, die nicht im Zellverband existieren (z.B. Lymphozyten). Die meisten Zellen schließen sich zu Organen zusammen, die sich nach außen mit einer Epithelzellschicht abgrenzen. Solche Zellen können in Zellkultur im allgemeinen -selbst unter optimalen Bedingungen- nicht länger als einige Stunden außerhalb eines Zellverbandes isoliert existieren. Die Möglichkeit mit dem Kraftmikroskop unter physiologischen Bedingungen Zellverbandadhäsionen zu untersuchen wurde durch die Kooperation mit Zellbiologen des Universitätsklinikums in Essen möglich [83]. Diese Untersuchungen galten dem Aufbau von interzellulären Kontakten zwischen Epithelzellschichten im Vergleich zu Kontakten mit beschichteten Kugeln, die eine der Zellschichten ersetzen (Abschnitt 4.2). Das Zell-Tether-Modell (Abschnitt 4.4) entstand dabei aus dem Bedürfnis trotz der Komplexität dieser Experimente zu quantitativen Aussagen zu kommen.

### 5.1 Uterus und Trophoblastzellen als Modellsystem

Vielfältige experimentelle Arbeiten zu interzellulären Wechselwirkungen geben einen Einblick in die dafür erforderlichen Vorgänge auf zellulärer [100-102] und molekularer Ebene [47,71]. Grundlegende Mechanismen, wie die Ausbildung von Kontaktinseln (molekular clusters) [49], Abhängigkeiten von der Kontaktzeit im Adhäsionsverhalten [73] und der ausgelösten innerzellulären Aktivität [102-104] wurden bereits mit verschiedenen Methoden an unterschiedlichen Zellsystemen untersucht.

Auch zur im Folgenden untersuchten Zelladhäsion zwischen Uteruszellen und Trophoblastzellen wurden bereits Zentrifugationsexperimente mit Zellspheroiden [73] zur qualitativen Analyse des Adhäsionsverhaltens durchgeführt.

#### 5.1.1 Der Uterus<sup>8</sup>

Im Uterus -der Gebärmutter- gibt es Raum für die Entstehung neuen menschlichen Lebens. Dorthin gelangt die befruchtete Eizelle durch den Eileiter. Währenddessen bildet sich eine Hülle aus Trophoblastzellen (Blastozyste) um die Embryozellen. Diese nistet sich in der rezeptiven (empfänglichen) Gebärmutter im Endometrium ein (Abb. 5.1). Die Trophoblastzellen, die nach der Einnistung die Plazenta (Fruchtblase) ausbilden, entwickeln sich nach den ersten acht Zellteilungsschritten

---

<sup>8</sup> komisch, daß selbst für die allerweiblichsten Organe oft maskuline Bezeichnungen gewählt werden...

der befruchteten Eizelle als Zellhülle um die Embryoblastzellen, aus denen sich der Embryo entwickeln wird.

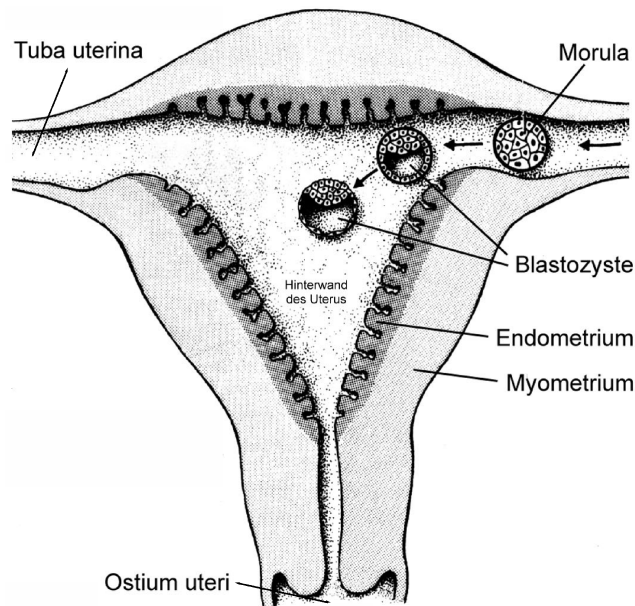


Abb. 5.1: Abbildung der Gebärmutter mit befruchteter Eizelle nach 8 Teilungsschritten (Morula - zur Verdeutlichung vergrößert). Anschließend bildet sich eine Hülle aus Trophoblastzellen (Blastozyste - vergrößert) um die Embryozellen. Diese nistet sich in der rezeptiven Gebärmutter im Endometrium ein (Verändert nach [105]).

Für die Einnistung ist die Kontaktaufnahme und Vernetzung der apikalen Zellmembran der Uterusepithelzellen mit der der Trophoblastzellen von essentieller Bedeutung. (Ein tieferes Verständnis dieses Prozesses könnte sowohl die Erfolgsrate bei künstlichen Embryoimplantationen -die derzeit weniger als 20% beträgt- erhöhen, als auch eine noch effizientere Empfängnisverhütung ermöglichen.)

Ungewöhnlich, und deshalb von biologischem Interesse daran ist, daß apikale Zellmembranen, die die Organe nach außen abschließen und Wechselwirkungen mit anderen Organen verhindern, hier miteinander verschmelzen. Nur in besonderen Situationen ist die apikale Adhäsivität von Epithelzellen zu beobachten. So sind bei Interaktionen von Leukozyten mit dem Gefäßwandepithel (Endothelzellen) an Entzündungsherden, bei der Metastasierung von Tumoren und bei verschiedenen Prozessen im Rahmen der Embryonalentwicklung adhäsive Epithelzellreaktionen notwendig. Im Falle des Uterusepithels ist die Änderung in den adhäsiven Zellzustand hormongesteuert und ein wesentliches Element der sogenannten Rezeptivität [106].

Offensichtlich befinden sich dabei Adhäsionsmoleküle und die damit verbundenen Signalwege, die für solche vermutlich zytoskelettalen Zellinteraktionen benötigt werden, nicht nur wie üblich an der basalen und lateralen, sondern auch an der apikalen Epithelzellmembran (2.1 und Abb. 2.1).

### 5.1.2 Experimenteller Aufbau

Die hier vorgestellten Messungen mit dem Zelladhäsionskraftspektroskop sind bei 35°C und in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in Nährmedium für JAR-Zellen (Anhang) durchgeführt worden. An den Kraftsensor ist eine PDL-beschichtete Kugel (ca. 70 µm) aus Sephacryl oder Glas, als Basis für aufwachsende Trophoblastzellen (JAR-Zellen) angeklebt worden (Abb. 5.2 und Abschnitt 3.3.3).

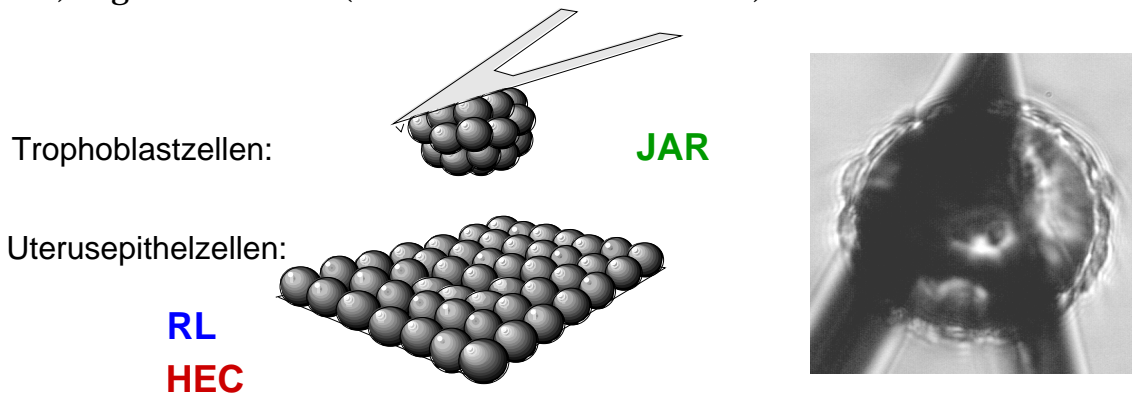


Abb. 5.2: Durch Kultivieren der Trophoblastzellen (JAR) auf einer Kugel kann eine künstliche Blastozyste für kraftspektroskopische Experimente auf Uterusepithelzellen (RL,HEC) nachgebildet werden.

Auf diese Weise werden blastozystenähnliche Trophoblastzellkugeln mit Uterusepithelzellschichten in Kontakt gebracht und so die Einnistung der befruchteten Eizelle in die Gebärmutter simuliert.

Analog den Experimenten in Kapitel 4 wird die Trophoblastzellkugel im Standardexperiment<sup>9</sup> mit 7 µm/sec an die Uteruszellschicht angenähert und bis zu einer Kraft von 3 nN eingedrückt. Während der zeitlich, von 0 Sekunden bis 40 Minuten (0, 1, 20 sec, 1, 4, 10, 20 oder 30, 40 min), variierten Kontakte wird die Kontaktkraft über einen Nachregelungsmechanismus konstant gehalten. Bei langen Kontaktzeiten war wegen thermischer Drift oder Störung des Laserstrahls durch Schwebeteilchen in der Meßlösung oder durch Zellen, die die reflektierende Kraftsensorrückseite überwuchsen, diese Kontrolle nicht immer gegeben. Das führte in einigen Fällen zu unkontrolliert höheren oder niedrigeren Kontaktkräften. Die Trennung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 4 mit 7 µm/s Ziehgeschwindigkeit und wurde als Adhäsions- oder Trennungskraftkurve aufgezeichnet.

### 5.1.3 Uterus Epithel- und Trophoblast- Zelllinien

Eine humane Trophoblastzelllinie (JAR) und zwei humane Uterus-Epithelzelllinien (HEC und RL), die reproduzierbar unterschiedliche apikale Adhäsionsmerkmale aufweisen, wurden für diese Experimente ausgewählt (Abb. 5.3).

<sup>9</sup> es wurden auch Experimente mit 2,7 und 27 µm/sec gefahren.



### 5.1.3.1 HEC-1-A Zellen

Diese Zelllinie ähnelt morphologisch stark dem natürlichen Uterusepithel. Wie die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, ist die freie (apikale) Oberfläche der polaren HEC-1-A-Zellen stark durch Mikrovilli strukturiert ( Abb. 5.3 oben). Die Glykokalyx ist besonders dick und kann als lockere, feinflockige Struktur aus vornehmlich Glykoproteinen charakterisiert werden. Die transmembranen Proteine, CD44, E-Cadherin und  $\alpha_6\beta_1$ - $\alpha_4$ -Integrin-Untereinheiten, die zytoskelettale Vernetzungen ausbilden können, werden von HEC-Zellen stark exprimiert, sind aber nicht in der apikalen Membran nachweisbar [83]. Die apikale Zelloberfläche der HEC-Zellen repräsentiert daher den Zustand einer nicht-rezeptiven Uterusepithelzelle.

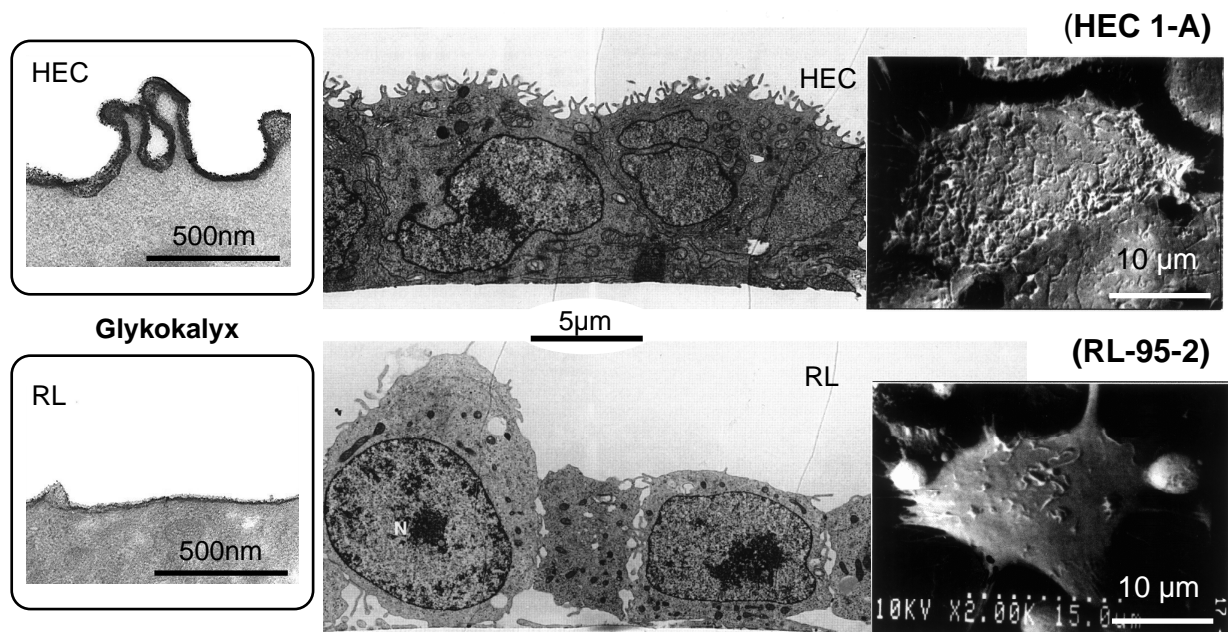


Abb. 5.3: EM-Aufnahmen der Uterus Epithelzellen HEC-1-a (oben) und RL95-2 (unten). Vergrößerungen der gefärbten Glykokalyx (links) aus TEM-Dünnschnitten (Mitte). REM-Bilder der apikalen Zelloberflächen (rechts) (Aufnahmen von M.Thie, Essen).

### 5.1.3.2 RL95-2 Zellen

Die wesentliche Veränderung der RL95-2-Zellen gegenüber normalen Uterusepithelzellen besteht im Verlust der apiko-basalen Zellpolarität. Die Zellorganelle sind gleichmäßig um den Zellkern verteilt und die molekulare Zusammensetzung der Zellmembran ist homogen. Die Oberfläche von RL95-2-Zellen ist glatt und weist nur einige Mikrovilli auf ( Abb. 5.3 unten). Auch die Glykokalyx dieser Zellen ist schwächer als bei HEC-1-A-Zellen ausgeprägt. Dagegen lassen sich CD44, E-Cadherin und  $\alpha_6\beta_1$ - $\alpha_4$ -Integrin-Untereinheiten wegen der Apolarität auf der gesamten Zelloberfläche - also auch in der apikalen Membran nachweisen [107]. Die  $\alpha_6\beta_4$  und  $\alpha_6\beta_1$  Integrine sind -soweit bekannt-

Fibronektinrezeptoren und werden beim Anbinden von Fibronektin zytoskelettal verankert [104,108]. Die apikale Zelloberfläche der RL95-2-Zellen repräsentiert daher den Zustand einer rezeptiven Uterusepithelzelle.

### 5.1.3.3 JAR-Zellen

Als Trophoblastzellen wurden die JAR-Zellen [109] ausgewählt. Sie stammen aus einer humanen Chorionkarzinomzelllinie und werden als Modell für humane implantationsbereite Trophoblastzellen eingesetzt. In Abb. 5.4 sind REM-Aufnahmen dieses Zelltyps dargestellt.

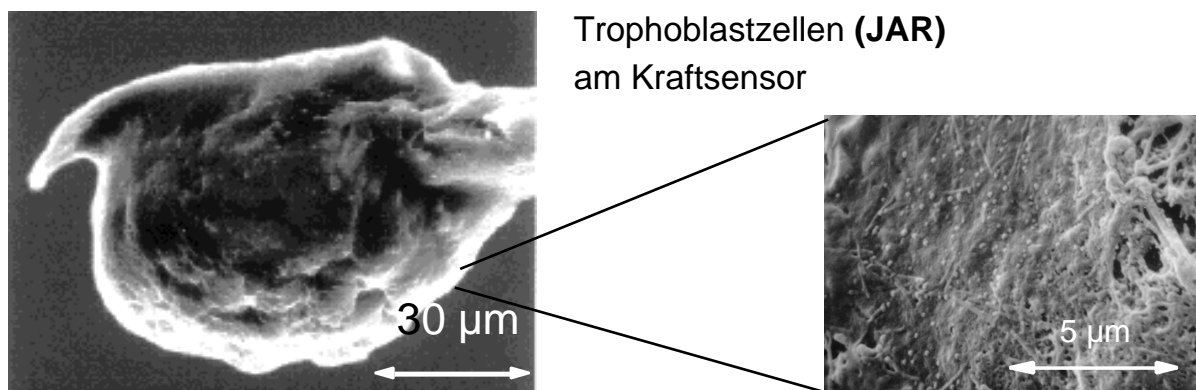


Abb. 5.4: REM- Übersichtsbild von JAR-Zellen am Kraftsensor und eine Vergrößerung der apikalen Membran (mit freundlicher Genehmigung von M.Thie, Essen).

Durch die Kultivierung der JAR-Zellen auf den am Kraftsensor befestigten Kugeln (nach René Röspel [83]) wird die Blastozyste -abgesehen vom Inhalt- naturgetreu nachempfunden.

### 5.1.4 Adhäsionen zwischen JAR- und HEC-Zellschichten

Die Abb. 5.5 A zeigt typische Meßdaten des JAR/HEC Zellsystems nach verschiedenen Kontaktzeiten. Erwartungsgemäß steigt die maximale Adhäsionskraft mit der Kontaktzeit an. Die Kurvenformen sind durch ein scharfes Adhäsionsmaximum und dann mit zunehmender Dehnung durch eine kontinuierliche Abnahme der Adhäsion gekennzeichnet. Das Maximum der Adhäsion tritt bei den verschiedenen Messungen im Bereich von 4-15 µm Distanz vom Kontaktpunkt auf. Die Distanz, die zur vollständigen Separation benötigt wird, beträgt im gezeigten Beispiel 60 µm bei 40 min Kontaktzeit, kann aber auch mehr als 80 µm betragen. Die Adhäsion bei der Separation wird dabei durch viele verschiedene Einzelbindungen und Oberflächenwechselwirkungen zwischen den beiden Zelloberflächen vermittelt. Die Auswahl der möglichen Bindungsstellen ist dabei nicht so groß, wie bei der Wechselwirkung mit Festkörpern (Kapitel 4), da die apikalen Zelloberflächen von Epithelzellen erwartungsgemäß untereinander relativ

passiv sind. Durch die sehr dicke Glykokalyx der HEC-Zellen ist die Zellmembran besonders gut gegen Kontakte mit fremden Oberflächen abgeschirmt.

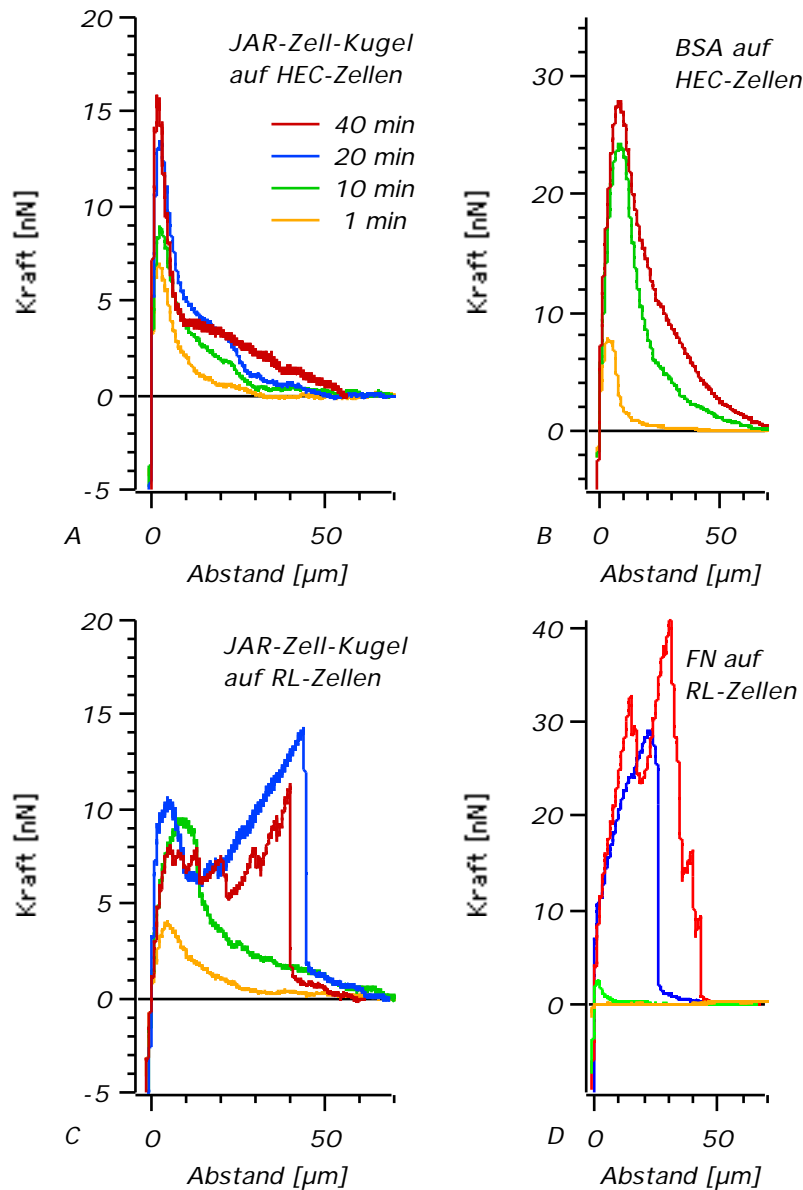


Abb. 5.5 (A) und (C): Typische Trennungskraftkurven nach Kontakten zwischen JAR-Zellen und Uterusepithelzellen unterschiedlicher Dauer (1-40 min). Zum Vergleich (B) und (D): Trennungen von BSA- und FN- Kugeln von diesen Zellen.

Daher ist auch die maximale Adhäsionskraft gegenüber den Messungen mit BSA-Kugeln um etwa die Hälfte reduziert. Allerdings ist die Adhäsion zwischen mit Amylose passivierten Kugeln und HEC-Zellen<sup>10</sup> noch schwächer (Abb. 4.2). Der Vergleich mit den modellierten Kraftkurven (Abb. 4.13) und den Daten aus Wechselwirkungen mit BSA deuten stark darauf hin, daß die einzelnen Bindungen keine Kooperativität besitzen. Sie lösen sich sequenziell und unabhängig voneinander, wie in Abschnitt 4.4 beschrieben.

<sup>10</sup> Diese Meßdaten sind nicht dargestellt, da sie identisch mit denen von FN mit RL-Zellen sind

### 5.1.5 Adhäsionen zwischen JAR- und RL-Zellschichten

Offensichtlich unterscheiden sich die Kraftkurven der JAR-Zellkugeln mit RL-Zellschichten nach Kontakten von 1 und 10 Minuten praktisch garnicht und nach mehr als 20 min Dauer deutlich von den bisher beschriebenen Zellschichtwechselwirkungen -mit Ausnahme der Fibronectinwechselwirkung.

Die Abb. 5.5 B zeigt typische Adhäsionskraftkurven der JAR-Kugeln auf RL-Zellen. Charakterisiert werden sie durch einen breiten Verlauf der Adhäsion mit mehreren starken Einzelabrissen und einem Finalen im Bereich von 10-45  $\mu\text{m}$  Distanz zum Kontaktpunkt. Die Kräfte der Einzelabrisse betragen nach einem 40 min Kontakt 1-3 nN in Abständen von 7-15  $\mu\text{m}$ . Der finale Abriß weist, je nach Experiment, Kräfte bis zu 15 nN auf. Der individuelle Verlauf dieser Separationskraftkurven nach langen Kontaktzeiten ist gerade im Bereich um 40  $\mu\text{m}$  Distanz, wegen der Verwendung lebender Zellen, immer unterschiedlich. Allerdings sind die JAR-RL Separationen bei Kontaktzeiten größer als 20 min in der Mehrheit der Versuche (ca. 75%) durch die Abrißstufen charakterisiert, während bei HEC-Zellen nie solche Abrisse beobachtet werden konnten. Die Abrisse sind ein Hinweis auf die Ausbildung von großflächigen Zellkontakten, den kooperativen molekularen Adhäsionsinseln. Dabei werden durch den Zellkontakt über Zelladhäsionsproteine zytoskelettale Verankerungen gebildet und diese über das Zytoskelett vernetzt. Jede spezifische Zelladhäsions-Molekül-Wechselwirkung, wie die zwischen Integrinen und Fibronectin oder die der E-Cadherine, kann dafür das auslösende Moment sein [104,108]. Die Kontaktzeitabhängigkeit des Abrißphänomens ergibt sich möglicherweise aus der Diffusionsgeschwindigkeit [101] der nicht zytoskelettal gebundenen Adhäsionsproteine (ca. 5  $\mu\text{m}/\text{min}$ ), wie z.B. den Integrinen, oder aus intrazellulären Reaktionen auf das Adhäsionssignal. Die Proteine benötigen mit ihrer Diffusionsgeschwindigkeit einige Minuten, um entlang der Zelloberfläche zur Kontaktstelle zu diffundieren. Die Vernetzung mit anderen schon ausgebildeten Kontakten zur Bildung der molekularen Bindungsinseln (molecular clusters) dauert demnach etwa 15 bis 30 Minuten.

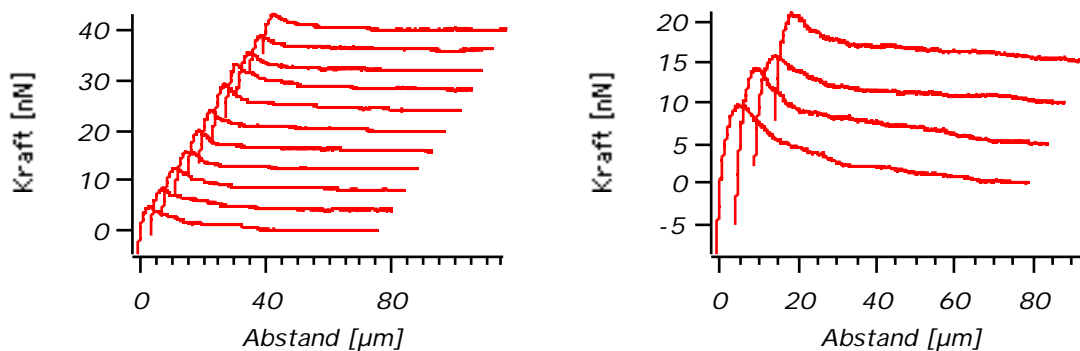


Abb. 5.6: Wiederholte Kontakte zwischen JAR-Kugeln auf RL-Zellen; jeweils 1 min Kontakte (links); jeweils 10 min Kontakte (rechts).

Wiederholte einminütige Kontakte, mit insgesamt 30 Minuten Kontaktzeit, haben ebenso, wie wiederholte 10-minütige Kontakte, mit insgesamt 40 Minuten Kontaktzeit, weder zur Steigerung der Adhäsionskraft, noch zum Auftreten der charakteristischen Abrisse geführt (Abb. 5.6). Die Kurvenformen entsprechen dabei den in Abb. 5.5 gezeigten Kurven nach 1- und 10-minütigen Kontakten. Dabei ist zwischen den Einzelkontakten immer 1 Minute gewartet worden. Dies deutet darauf hin, daß die Bindungsinselbildung sicher länger als 10 Minuten dauert und daß sie kein kumulativer Prozeß ist, bei dem die Zelle nach jedem Kontakt Adhäsionsmoleküle anhäufen kann. Die kooperative Vernetzung der Moleküle kann also nur im Beisein des Bindungspartners vonstatten gehen. Eine Stimulierung bzw. Triggerung der Zelladhäsivität durch ein Kontaktsignal beim ersten oder / und jedem weiteren Kontakt mit der anderen Zelloberfläche ist aus diesen Daten ebenfalls nicht ableitbar. Da die Adhäsionsstärke von Kontakt zu Kontakt nicht nur nicht zunimmt, sondern auch nicht abnimmt, scheint der Vorgang vollständig reversibel zu sein und bei jedem Kontakt von Neuem zu beginnen. Die Adhäsionen mit den starken Abrissen hingegen konnten an den selben Zellen nicht wiederholt werden.

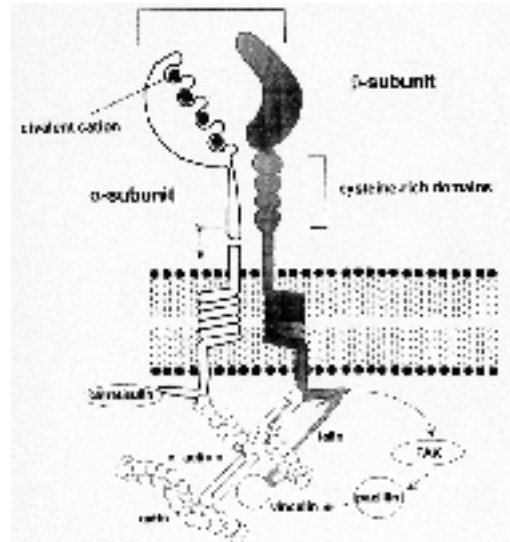
### 5.1.6 Die Rolle des Fibronektins

Die Abb. 5.5 D zeigt typische Kraftkurvenverläufe für das System Fibronektin- auf RL-Zellen. Nach mehr als 20-minütigen Kontakten sind diese in der Mehrheit der Messungen den Kurvenverläufen von JAR-Zellkontakten auf RL-Zellschichten mit Abrissen ähnlich. Charakterisiert werden sie durch einen sehr hohen und breiten Verlauf der Adhäsion mit mehreren starken Einzelabrissen und einem finalen Abriß im Bereich zwischen 20-50  $\mu\text{m}$  Distanz zum Kontaktpunkt. Das Adhäsionsmaximum der hier gezeigten Kraftkurve nach einem 40 min Kontakt beträgt 41 nN mit einem finalen Abriß von 8 nN.

Wegen der reich mit Integrinen bestückten apikalen Zellmembran der RL- Zellen, die viele potentielle Bindungsstellen für die RGD-Sequenz des Fibronektins bietet, und wegen der bekanntermaßen [110] durch die Anbindung von Fibronektin induzierten, zytoskelettalen Vernetzung von Integrinen, ist eine fibronektinbeschichtete Kugel als Modell für eine JAR-Kugel gewählt worden. Die Ausbildung von Abrissen mit einer Fibronektin Modelloberfläche läßt einen Vergleich zwischen den Adhäsionsmechanismen des Fibronektins und den Adhäsionsproteinen der JAR-Zellen zu. Zunächst scheint die Zugänglichkeit oder Besetzungsdichte der Fibronektinmoleküle auf der Modellkugel insgesamt höher zu sein als bei der JAR-Zell-Kugel. Leider war die Moleküldichte nach dem Beschichtungsprozeß mit den hier zu Verfügung stehenden Methoden nicht bestimmbar. Tatsächlich dauert es

auch im Falle des Fibronektins offensichtlich mindestens 20 Minuten, bis die RL-Zellen molekulare Adhäsionsinseln organisiert haben.

Abb. 5.7: Schematische Darstellung des dimeren Integrins (aus [110]). Integrine binden kurze Peptidsequenzen von Fibronektin, Laminin oder von aus IgG Domänen aufgebauten Zelladhäsionsproteinen. Der extrazelluläre Adhäsionsreiz induziert eine indirekte zytoskeletale Verankerung an Aktinfilamente über Talin, -Aktinin und/oder Vinculin (siehe auch Abschnitt 2.2.3).



Interessanterweise sind die Adhäsionskräfte, nach 1- und 10-minütigen Kontakten, bei der FN-Kugel deutlich schwächer als bei der JAR-Kugel. Das deutet darauf hin, daß es bei der Präparation der Fibronektinoberfläche gelungen ist, durch die Amylose-Passivierung die unspezifischen Wechselwirkungen noch unter die Wechselwirkungen zwischen Zellschichten zu reduzieren und eine sehr reine Messung der Fibronektinwechselwirkung mit der Zellschicht zu verwirklichen.

## 5.2 Ausblick

Das Zelladhäsionskraftspektroskop eröffnet ein weites Anwendungsspektrum für die Erforschung der Kontaktaufnahme von Zellverbänden in der Humanmedizin - speziell der Krebsforschung, der Entwicklungsbiologie, der Immunologie sowie der Pharmakologie. Diese nicht invasive Meßmethode kann unter physiologischen Bedingungen sogar Sekundärprozesse, wie die Adhäsionsinselbildung, an lebenden Zellen untersuchen und in Ergänzung zu anderen etablierten oder neueren Techniken, weitere Erkenntnisse liefern. Die immer noch nicht vollständig verstandene apikale Adhäsivität von Epithelzellen -wie in der Frühphase der Embryoimplantation- bleibt eine Herausforderung an nachfolgende Forschungsprojekte. Dabei wird sicherlich die Möglichkeit mit spezifisch beschichteten Modellkugeln -wie im Falle des Fibronektins- gezielt einzelne Adhäsionsmoleküle abzufragen bei gleichzeitiger Möglichkeit die viskoelastischen Zelleigenschaften zu bestimmen eine entscheidende Rolle spielen. Die Stärke des Kraftspektroskopes im Bereich der Vermessung von Zelladhäsionskräften unter physiologischen Bedingungen wird sich in Kombination mit den Erfahrungen aus jahrzehntelanger Zellforschung und der Gentechnik wahrscheinlich bald immer deutlicher herausstellen.

## 6 Interaktionen zwischen einzelnen Zellen

Trotz der Komplexität der Zellschichtadhäsionen konnten zumindest statistische Aussagen zu einzelnen Adhäsionsmolekülen errechnet werden. Um tatsächlich zu einzelmolekularen Messungen vorzustoßen soll nun die Anzahl und die Vielfalt der interagierenden Moleküle stark reduziert werden. Dazu wird eine einzelne Zelle am Kraftsensor befestigt [82].

### 6.1 Rote Blutkörperchen als Modellsystem

Ein experimenteller Ansatz mit möglichst wenigen Unbekannten sind die roten Blutkörperchen. Sie haben (je nach Quelle) sehr reproduzierbare Eigenschaften, sind relativ robust, unkomplex und zudem einfach zu beziehen und in isotonischer Salzlösung (PBS) zu halten. Darüber hinaus scheinen die roten Blutkörperchen (RBC; red blood cell) die besten Zellen zur Vermeidung unspezifischer Adhäsion zu sein, da sie von Natur aus nicht klebrig sind, um den Blutstrom nicht zu behindern. Daher wurden sie als Modellsystem zur Untersuchung der Adhäsion einzelner Moleküle ausgewählt. Mit einem silanisierten spitzenlosen Kraftsensor kann man ein rotes Blutkörperchen, nach längerem intensiven Kontakt (2-10 s bei 0,5-10 nN), von einem Objektträgergläschen „fischen“ (Abb. 6.1) und über lange Zeit (mindestens 4 Stunden) festhalten um es mit verschiedenen Substraten in Kontakt zu bringen.

#### 6.1.1 Grundlegende Eigenschaften der RBC

Rote Blutkörperchen sind von sehr vielen WissenschaftlerInnen mit verschiedenen Techniken hinsichtlich ihrer Membranelastizität und ihrer Adhäsionseigenschaften ausgiebigst erforscht worden [80,95,111,112].

##### 6.1.1.1 Elastizität

Die in Abb. 6.1 dargestellten Kraftkurven zeigen die Annäherung eines Kraftsensors ohne und mit Blutkörperchen auf Glas oder auf eine weitere rote Blutzelle. Der Verlauf der Kurven läßt das harte Substrat, sowie die Elastizität einer und zweier Zellen erkennen. Für geringe Kontaktkräfte zwischen kugelförmigen Oberflächen kann man näherungsweise, aus dem von Hertz [88] aufgestellten Elastizitätsmodell, den Zusammenhang zur Quetschung  $z$  der Zelle darstellen (Abschnitt 4.2). Wenn man die Zellen wieder trennt erkennt man (bei einer Kraftauflösung von hier etwa 30 pN) keinerlei nachweisbare Adhäsion zwischen den roten Blutkörperchen (Abb. 6.2 oben).

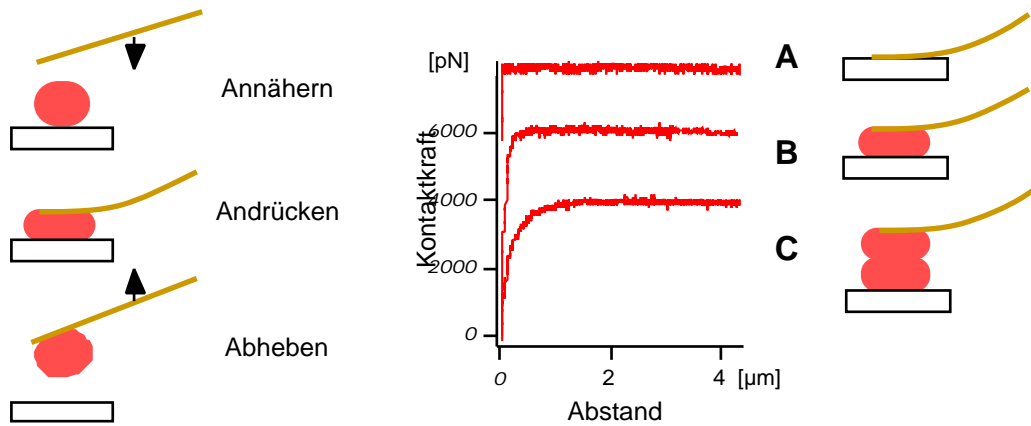


Abb. 6.1 Links: „Zellenfischen“. Rechts: Annäherungskraftkurven eines Kraftsensors ohne Blutkörperchen auf Glas (A), mit Blutkörperchen auf Glas (B) und auf eine weitere rote Blutzelle (C).

### 6.1.1.2 Adhäsion durch Lektinmoleküle

Durch Zugabe von Weizenkeimlektin (WGA; wheat germ agglutinin) in die Messlösung entsteht eine definierte künstliche Adhäsion zwischen roten Blutkörperchen. Dabei klinken sich die beidseitig zuckerbindenden Weizenkeimlektine wie Kletten zwischen bestimmte Glykoproteine der Glykokalyx von roten Blutkörperchen [80] (Abb. 6.2).

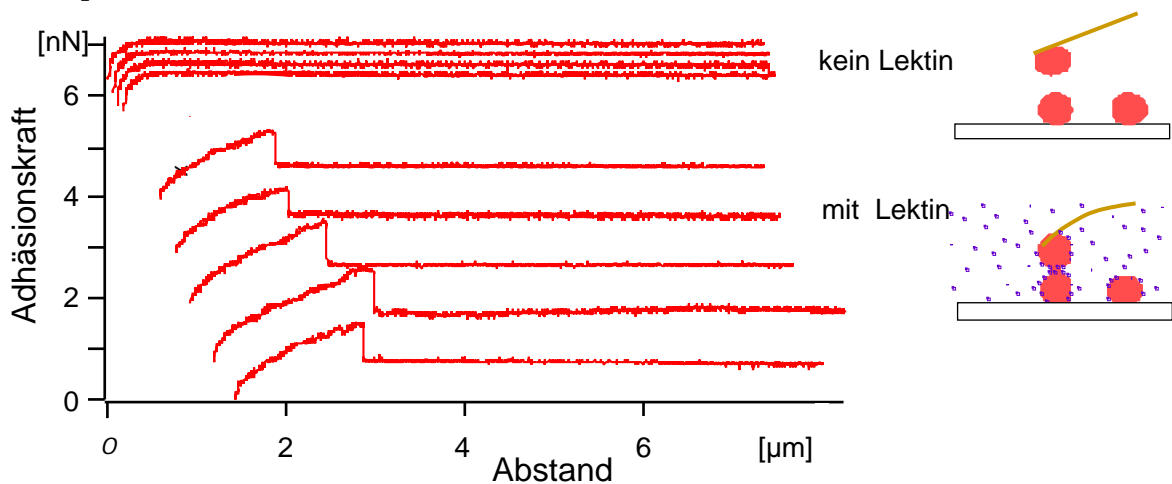


Abb. 6.2: Serie von Trennungskraftkurven eines Kraftsensors mit Blutkörperchen von einem anderen Blutkörperchen vor (oben) und nach (unten) Zugabe von Lektin (WGA) in die Lösung (1 nN Kontaktkraft und 1,5  $\mu\text{m/s}$  Zuggeschwindigkeit).

Zu Beginn dieser Kraftkurven sieht man die repulsive, elastische Rückformung der Zelle die dann in eine lektininduzierte adhäsive Phase übergeht. Diese adhäsive Phase ist anfänglich oft flach ansteigend, da die Lektine über eine etwa 1  $\mu\text{m}$  lange Amylosekette an den Kraftsensor gekoppelt sind. Sie verläuft dann in der Regel elastisch reversibel und geht anschließend in einen irreversiblen Teil über, in dem die Lektinbindungen sich wegen der zu großen Belastung ablösen.



Die Kurven sind wegen der vornehmlich elastischen Eigenschaften der roten Blutkörperchen hochreproduzierbar und lassen die bereits in Abschnitt 4.2 dargelegten Eigenschaften der Zelladhäsion erkennen:

### 6.1.1.3 Kontaktzeitabhängigkeit

Wenn man davon ausgeht, daß die Konzentration an Lektin in der Lösung konstant ist, hängt die Anzahl der geschlossenen Bindungen über die lektinspezifische Bindungsrate von der Kontaktzeit ab. Je länger ein Zell-Zell-Kontakt ist, desto höher ist die Anzahl von Bindungen, die sich zwischen den Zellen ausbilden. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Bindung geschlossen wird, hängt von den bindungsspezifischen "on-" und "off- Raten“ ab und hat typischerweise einen exponentiellen Charakter (Gleichung ( 4-7 ), Abschnitt 4.4).

### 6.1.1.4 Kontaktkraftabhängigkeit

Ähnliches gilt für die Kraft, mit der man die Zellen in Kontakt bringt:

Je stärker die Zellen aufeinander gedrückt werden, desto näher kommen sich die Bindungspartner zum einen (dadurch nimmt die Bindungswahrscheinlichkeit zu) und desto größer wird zum anderen die gemeinsame Kontaktfläche der Zellen. (Dadurch nimmt die Anzahl der maximal verfügbaren Bindungsstellen bei konstanter Bindungsdichte zu.)

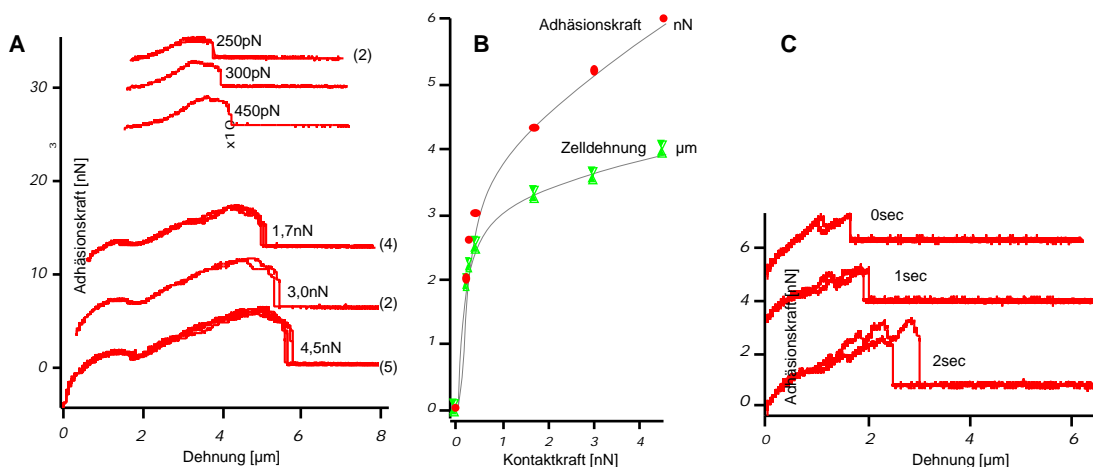


Abb. 6.3: Serie von Trennungskraftkurven eines Kraftsensors mit Blutkörperchen von einem anderen Blutkörperchen bei verschiedenen Kontaktkräften (A) und -zeiten (C) mit ca.  $2 \mu\text{m}/\text{sec}$ . Die Zahlen in Klammern repräsentieren die Anzahl der übereinandergelegten Kurven. (B): Abhängigkeit der Adhäsionskraft und -länge von der Kontaktkraft.

Gemäß den Betrachtungen in Abschnitt 4.4 erhöht sich mit der Kontaktzeit und der Kontaktkraft die maximale Bindungskraft und die Distanz, über die die Zellen aneinander hängen bleiben, bevor sie sich trennen (Abb. 6.3). Der lineare Zusammenhang zwischen Kontaktkraft und maximaler Adhäsionskraft ( 4-6 ) stellt sich hier erst bei Kontaktkräften von mehr als 500 pN ein (Abb. 6.3 B).

## 6.1.2 Die Lektineinzelbindung

Reduziert man demnach die Kontaktkraft<sup>11</sup> und -zeit auf ein Minimum, so sollten einzelne Lektinpaartrennungen beobachtbar werden. Selbiges sollte auch gelten, wenn man die Konzentration der Lektine in der Lösung äußerst gering hält. (Abb. 6.4)

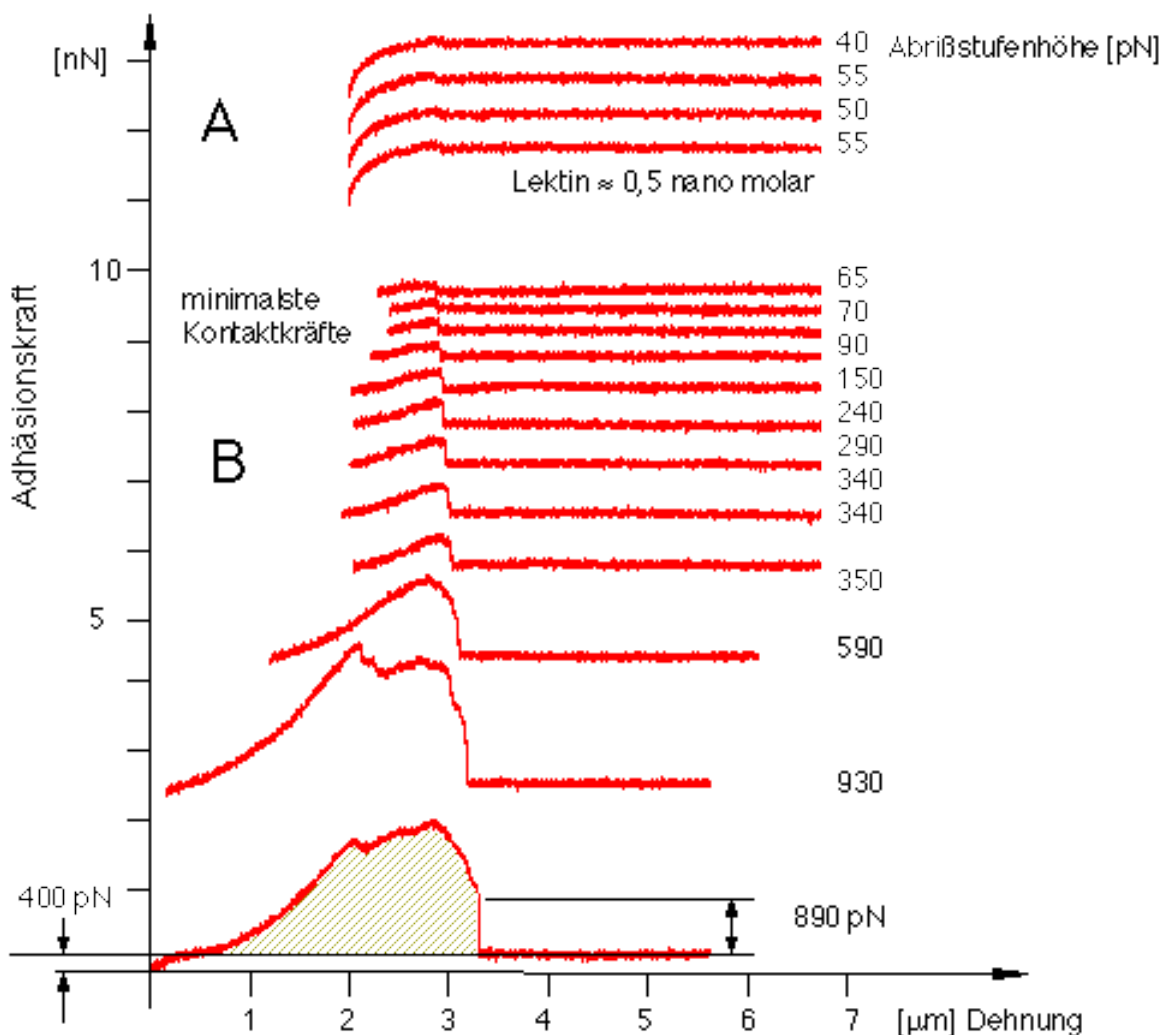
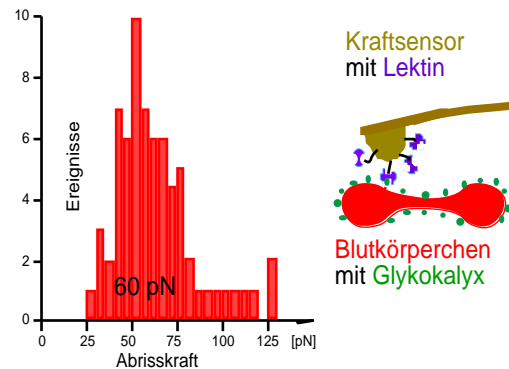


Abb. 6.4: Trennungskraftkurven nach Kontakten zweier Blutkörperchen in sehr niedermolarer (pico bis nanomolar) Lektinlösung (A) und in Lektinlösung hoher (mikromolar) Konzentration mit abnehmender Kontaktkraft und -zeit (B). Die Zahlen der Reihe ganz rechts repräsentieren die Höhe der Kraftstufe des letzten Abrisses in pN.

Die gemessenen Werte sind vergleichbar zu solchen, die mit einzelnen Lektinen an Kraftsensorspitzen auf roten Blutkörperchen gemessen wurden (Abb. 6.5). Die kleinsten Kraftstufen aus Abb. 6.4 sind vergleichbar mit der wahrscheinlichsten Abrißkraft  $\bar{F}$  und daher vermutlich Einzelmolekülereignisse.

<sup>11</sup> Die Kontaktkraft liegt hier schon im Bereich des thermischen Rauschens, also unter der Auflösungsgrenze des Kraftspektrometers, deshalb wurde der Kontakt durch manuelles Verstellen des Umkehrpunktes und nicht computergesteuert durch Erreichen einer vorgewählten Kontaktkraft definiert.

Abb. 6.5: Kraftspektren der Kraftabrisse einer mit Weizenkeimlektin (WGA) funktionalisierten Sensorspitze von roten Blutkörperchen mit  $1,5 \mu\text{m}/\text{sec}$ . Die wahrscheinlichste Abrißkraft liegt bei etwa  $60 \text{ pN}$  (mit freundlicher Genehmigung von W. Dettmann).



### 6.1.3 Tether

Ein weiteres typisches Phänomen der Zelladhäsion ist das Auftreten der Membrantether (Abschnitt 4.2). Beim Dehnen mit einer konstanten Geschwindigkeit haben sie in der Regel nahezu rein viskose Eigenschaften und eine konstante Grundspannung, bis das Membranreservoir zur Neige geht. Aus diesem Grund lassen sie sich unbemerkt über lange Distanzen ziehen bevor sie durch eine charakteristische Kraftstufe beim Abreißen durch das Kraftspektroskop detektiert werden können (Abb. 6.6).

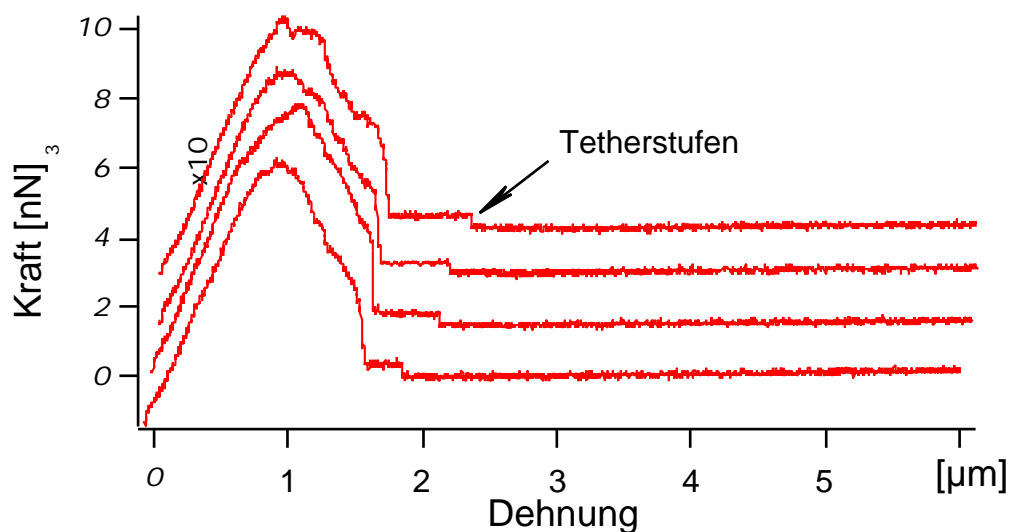


Abb. 6.6: Trennungskraftkurven eines Kraftsensors mit Blutkörperchen von einem weiteren Blutkörperchen in Lektinlösung zeigen die charakteristischen Tetherstufen (Pfeile).

Diese Kraftstufe ist zum einen durch die Oberflächenenergie und zum anderen über die Reibung durch die Ziehgeschwindigkeit (hier:  $1,3 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) definiert. Die Tetherstufe beinhaltet demnach eigentlich keine Information über die wahrscheinlichste Abrißkraft  $\bar{F}$ , sondern über die Belastbarkeit  $L_0$ , mit der die Bindung oder der Tether für die Dauer der Zugzeit bis zur Kraftstufe belastet werden konnte. Aus Mikropipettenexperimenten an RBC wurde der Tetherradius  $R_t$  für den statischen Fall, wo ein gezogener Tether über mehrere Minuten auf

konstanter Länge gehalten wurde, mit etwa 26 nm beziffert. Dabei stellt sich eine ungewöhnlich hohe Grundspannung<sup>12</sup> des Tethers von etwa 50 pN ein [112]. Im stationären Fall, in dem mit konstanter Geschwindigkeit gezogen wird, ist der Tether durch Reibung zusätzlich belastet und der Radius wird entsprechend kleiner. Hwang und Waugh fanden einen etwa linearen Zusammenhang zwischen der Ziehgeschwindigkeit und der Längsspannung im Tether in einem Bereich von 0 bis 0,6  $\mu\text{m}/\text{sec}$  [112]. Extrapoliert man diesen Zusammenhang in den hier verwendeten Geschwindigkeitsbereich von 1,3  $\mu\text{m}/\text{sec}$ , ergäbe sich eine Tetherspannung von 380 pN. Die tatsächlich gemessenen Tetherstufen liegen jedoch zwischen 160 und 210 pN (Abb. 6.6). Das Verhalten der Tether hängt stark von der Zusammensetzung der Zellmembran ab und erlaubt den Vergleich verschiedener Zellen mit RBC nur bedingt

Die Messung der Lektineinzelbindungskraft ist also prinzipiell mit dieser Methode möglich, wenn die Kontaktzeit und die Kontaktkraft minimiert werden. Die in Abschnitt 4.2 vorgestellten Modelle zur Beschreibung der Zelladhäsion lassen sich auch auf die Einzelzelladhäsion übertragen. Im folgenden soll mit dieser Methodik ein weiteres Zelladhäsionsmodell untersucht werden, an dem es erstmals gelang, die Bindungskraft eines einzelnen Zelladhäsionsmoleküls in seiner natürlichen Umgebung zu messen.

## 6.2 Dictyostelium discoideum als Modellorganismus

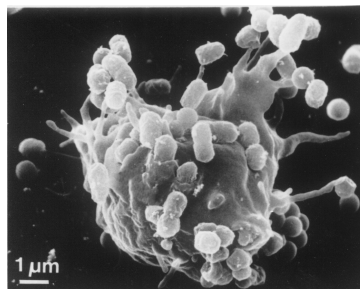


Abb. 6.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Dictyostelium discoideum* Zelle beim Verzehr von Bakterien (REM Aufnahme von G.Gerisch, MPI Martinsried)

### 6.2.1 Der Lebenszyklus von Dictyostelium discoideum

*Dictyostelium discoideum* ist ein eukaryotischer Einzeller (Abb. 6.7), der sich einerseits amöbenartig autark durch Zellteilung fortpflanzt und andererseits, ausgelöst von Nährstoffmangel, durch kollektiv selbstorganisiertes Aggregieren mit Artgenossen zu einem komplexen Vielzellergebilde verbinden kann. Dieses liegt in seinem höchsten Entwicklungsstadium nach etwa 16 Stunden als sporentragender

---

<sup>12</sup> Bei Tethern anderer Zellen oder Vesikel wird eine Tetherspannung von nur 4 bis 8 pN angegeben.

Fruchtkörper vor (Abb. 6.8 und Abb. 6.10). Wenn ausreichend Nährstoffe vorhanden sind entwickeln sich aus den Sporen wieder einzelne Zellen.

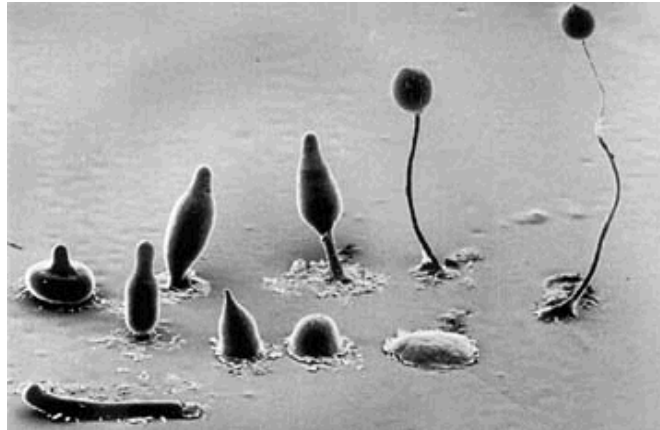
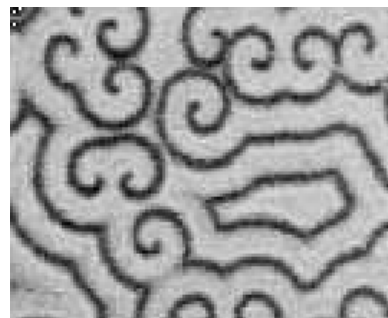


Abb. 6.8: Stadien der Entwicklungsphase von *Dictyostelium discoideum* (REM-Aufnahme von M.G. Grimson and R.L. Blanton, Texas Tech University)

Aus diesem Grund wird *Dictyostelium* als ein Modellsystem für den Entwicklungssprung vom Einzeller zum Vielzeller betrachtet. Der kollektive Selbstorganisationsprozess wird durch cAMP (zyklisches adenosin-3',5'-monophosphat), einem auch im menschlichen Organismus wichtigen chemischen Regulationsbotenstoff, über Entfernungen von einigen Zentimetern signalisiert. Die Signalform ist aber nicht einfach nur ein statisches Konzentrationsgefälle, sondern muß dynamisch gepulst sein. *Dictyostelium* hat dafür ein cAMP Rezeptormolekül, das nur aktiv bleibt, wenn das Signal sich wenigstens alle 10 Minuten ändert. Als Reizantwort gibt die Zelle ihrerseits phasengleich cAMP, aber kontinuierlich auch Phosphodiesterasen zum Abbau des cAMP's, an die Umgebung ab.

Abb. 6.9: Chaotische Spiralwellen aus aggregierenden Dictyostelien in einer Petrischale mit Dunkelfeldmikroskopie; Bildgröße: 1,0 cm x 0,8 cm



(F. Siegert, LMU München).

Auf diese Weise synchronisieren sich Zellen innerhalb eines etwa Quadratzentimeter großen Areals, und es bilden sich chaotische Muster aus, wie sie aus der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion [113] bekannt sind (Abb. 6.9). Außerdem wird der Entwicklungspromotor aktiviert und die Zellen beginnen weitere Moleküle zu synthetisieren, die für die Entwicklung des Vielzellerstadiums wichtig sind. Nur die aggregationsfähigen (entwicklungskompetenten) Zellen besitzen die zum Aufbau eines geordneten Zellverbandes notwendigen, artspezifischen Adhäsionsmechanismen [114].

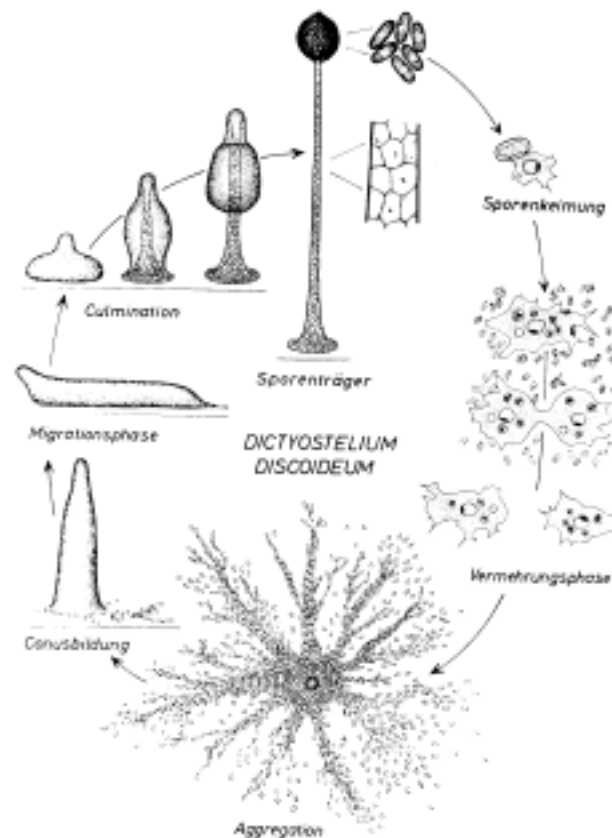


Abb. 6.10: Der asexuelle Entwicklungszyklus von *D. discoideum* (aus [115]).

Solche Zellen wandeln ihre kugelig fransige Gestalt in eine langgestreckt wurmförmige, werden sehr mobil (bis zu  $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) und bilden mindestens zwei Typen von Zellkontakten aus: B-Kontakte (csB), die über die gesamte Zelloberfläche, also auch an den Längsseiten der Zellen gebildet werden, und A-Kontakte (csA), die bevorzugt eine Haftung der Zellenden bewirken und kalziumunabhängig sind [116]. Während einige csB-vermittelte Kontakte auch bereits während der Vermehrungsphase (vegetativ) gefunden werden können, sind die csA-Kontakte ausschließlich in den entwicklungscompetenten aggregierenden Zellen vorhanden.

### 6.2.1.1 Das contact-site-A Glykoprotein

Das csA-Glykoprotein ist das am besten charakterisierte Adhäsionsmolekül von *Dictyostelium*. Es stellt mit einer Kopienzahl von etwa  $2 \times 10^5$  Molekülen pro Zelle etwa 1% der gesamten Membranproteine aggregierender Zellen dar [117]. Das Glykoprotein ist ein integrales Membranprotein und besitzt eine Molekülmasse von 80 kDa. CsA ist ein homophiles Adhäsionsmolekül, dessen genetische Codierung bekannt ist [118] und dessen Struktur in Anlehnung an bekannte Adhäsionsmoleküle homologer Codierung, wie z.B. dem Ig und dem N-CAM vermutet wird [119] (Abb. 6.11).

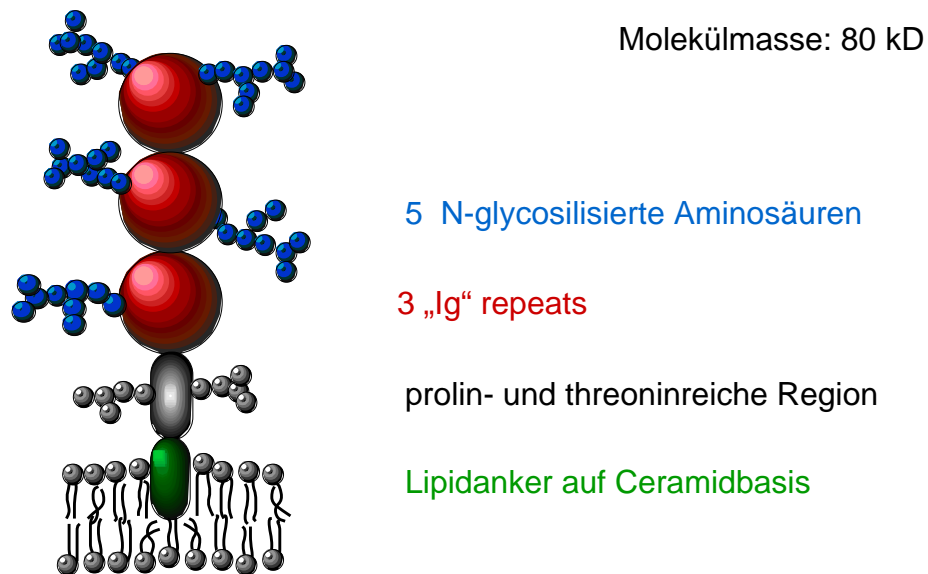


Abb. 6.11: Hypothetische Struktur des csA-Moleküls [120].

Eine stark hydrophobe Region, die sich am C-Terminus befindet, weist darauf hin, daß das csA-Polypeptid keine Transmembranregion besitzt. Solch eine hydrophobe C-terminale Region ist für Membranproteine charakteristisch, deren primärer C-Terminus durch einen Phospholipid-Anker ersetzt wird [121,122]. Das csA-Protein ist über einen Phospholipid-Anker, auf Ceramidbasis in der Plasmamembran verankert [123]. Eine mit viel Prolin und Threonin versehene anschließende Sequenz wird dafür verantwortlich gemacht, daß das Molekül senkrecht und frei beweglich von der Membran absteht und sich nicht flach an die Lipidschicht schmiegt [124]. Die folgende Sequenz aus drei Domänen hat starke Homologie zu Immunglobulinen, an denen 5 N-Glykolisierungseinheiten verteilt sind. Sekundärstruktur-Voraussagen nach Chou [125] deuten auf eine ausgedehnte  $\beta$ -Faltblatt-Struktur über einen großen Bereich des csA-Proteins hin.

Für die aktive Bindungsregion zwischen zwei csA-Molekülen wird wegen ihres elektrostatischen Ladungsmusters die kurze Peptidsequenz "YKLVNDS" im N-terminalen Bereich des csA-Polypeptids, die von den ersten beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen des Proteins flankiert wird, vorgeschlagen. Dabei wird den geladenen Aminosäuren Lys-133 und Asp-138 eine essentielle Funktion beigemessen [126].

### 6.2.2 Kraftspektroskopische Messungen

Das csA-Molekül ist aufgrund seiner Lipidverankerung schwer für Einzelmolekülmessungen zugänglich. In SPR-Messungen konnte die Reaktionskinetik der csA-csA-Wechselwirkung an solubilisierten csA-Molekülen durchgeführt werden [120]. Versuche, das isolierte Molekül auf einem Kraftsensor

direkt zu immobilisieren, sind nicht geglückt. Mit Mikropipetten angesaugt wurden Vesikel als Kraftsensoren verwendet und mit csA in der Membran angereichert. Weil die csA-Moleküle in den Vesikelmembranen sich leicht zu Klumpen zusammenfanden, konnten aber keine Einzelmolekülkräfte aufgelöst werden<sup>13</sup>. Daher wurde ein ungewöhnlicher Weg zur Bestimmung der molekularen Wechselwirkung des csA-Proteins beschritten: das Molekül wird in seiner natürlichen Umgebung mit der ganzen Zelle an einem Kraftsensor befestigt und mit einem weiteren csA-Molekül auf einer anderen Zelle in Kontakt gebracht.

### 6.2.2.1 Immobilisierung

Zur Befestigung der sehr mobilen Zellen am Kraftsensor kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Drei davon erwiesen sich als erfolgreich (nähere Beschreibungen im Anhang). Die einfachste davon ist den Kraftsensor zu silanisieren. Die Aminogruppen reagieren mit vielen Proteinen auf der Zelloberfläche, aber auch mit Molekülen aus der Lösung. Schafft es eine Zelle von der Spitze weg zu wandern (Abb. 6.12), dann sind die Amine nicht mehr reaktiv genug um eine neue Zelle zu halten.

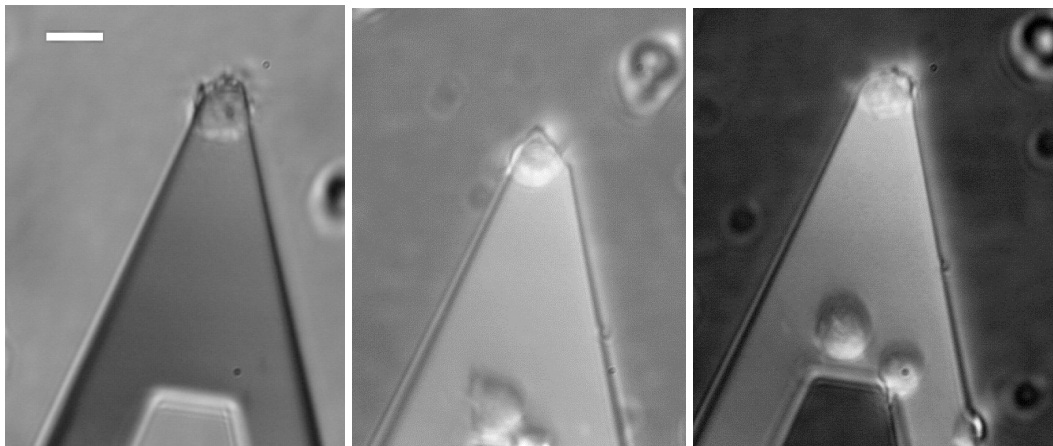


Abb. 6.12: Zelle an der Spitze eines Kraftsensors (Park) und Zellen, die sich im Laufe einiger Minuten von der Spitze entfernt haben (Skalierungs Balken: 20  $\mu\text{m}$ ).

Die zweite Methode besteht im Koppeln von Polyaldehyd an das Silan. Damit wird die Beweglichkeit der Zellen zwar stärker eingeschränkt, aber die Präparation des Polyaldehydes (Anhang) ist sehr aufwendig, und die Wiederverwendbarkeit des Kraftsensors wird nur unwesentlich verbessert. Die ergiebigste Methode ist die Verwendung von kovalent angekoppeltem Weizenkeimlektin (Anhang). Das Lektin bindet spezifisch an die auf der Zelloberfläche reichlich vorhandenen Glykoproteine (csA eingeschlossen) und hat durch die, im Vergleich zu Aminen und Aldehyden, hohe off-Rate eine gewisse Selbstreinigungsfunktion. Dadurch ist zwar die

<sup>13</sup> persönliche Mitteilung von R.Merkel, TU München.



Beweglichkeit der Zellen geringfügig höher, aber die Wiederverwendbarkeit des Kraftsensors verbessert sich dadurch deutlich.

Sobald die Zellen sich in den Einzugsbereich des Laserfokus bewegen, haben sie einen stark störenden Einfluß auf das Signal des am Kraftsensor reflektierten Strahls. Dadurch werden die Meßkurven zum Teil unbrauchbar und der Nachregelungsmechanismus bei längeren Kontaktzeiten kann die Kraft nicht konstant halten. In solch einem Fall muß das Experiment unterbrochen werden bis die Zelle wieder weg gewandert ist, oder die Zelle durch kurzes Herausholen des Sensors aus der Petrischale entfernt werden.

### **6.2.2.2 Grundmuster der Adhäsion von Dictyostelium**

Den Kraftsensor mit der Zelle an der Spitze positioniert man mit dem x-y Trieb genau über einer Zelle auf der Petrischale um Adhäsionskraftexperimente zwischen diesen Zellen vorzunehmen. Die Grundmuster der Zelladhäsionsmessung spiegeln sich auch in den Dictyostelium Experimenten wieder: Mit der Kontaktzeit und der Kontaktkraft steigt die maximale Adhäsion und die Wechselwirkungslänge. Die Elastizität der Zelle ist durch die extreme Mobilität stark variabel, deswegen ist daraus nicht eindeutig abzuleiten, ob die Zelle am Sensor mit dem Substrat oder mit einer weiteren Zelle interagiert hat.

#### **6.2.2.2.1 Unspezifische Adhäsion**

Die Variabilität der in Abb. 6.14 dargestellten Kraftkurven lassen weder eine zuverlässige Unterscheidung in Zellen mit und Zellen ohne csA-Expression zu, noch ist die Maximalkraft der Adhäsion zwischen Zellen und Petrischale signifikant verschieden. Die Wechselwirkung mit der Petrischale ist vermutlich durch die allgemeine Adhäsivität von geladenen Biomolekülen an Festkörperoberflächen und von unspezifischen Adhäsionsmolekülen zur Fortbewegung oder Haftung vermittelt. Tendenziell ist die Breite des Adhäsionsmaximums bei Petrischalenkontakten schmaler und reißt sehr steil ab, während die interzellulären Adhäsionsmaxima meist breiter ausfallen, weil zwei Zellen sich weiter dehnen lassen und ihre Kontaktflächen freier über die Zelloberflächen fluktuieren können um Kraftkomponenten senkrecht zur z-Achse auszugleichen.

Die Adhäsion entsteht aus der Vielzahl von Cadherinen und Integrinen in der Zellmembran von Dictyostelium, die in der Summe offensichtlich stärkere Wechselwirkung als das csA zeigen. Zusätzlich werden unspezifische Adhäsionen durch die hohen Kontaktkräfte sicherlich begünstigt [119]. Daher ist die Unterscheidung zwischen entwickelten und vegetativen Zellen so nicht möglich.

Immerhin lassen sich aus den Kurven charakteristische Eigenschaften im Vergleich zu roten Blutkörperchen ablesen: Die maximale Adhäsionskraft bei längeren

Kontakten von 20 s ist mit bis zu 15 nN extrem hoch, verglichen mit knapp 1 nN bei den lektinvermittelten Adhäsionen (Abschnitt 6.1).

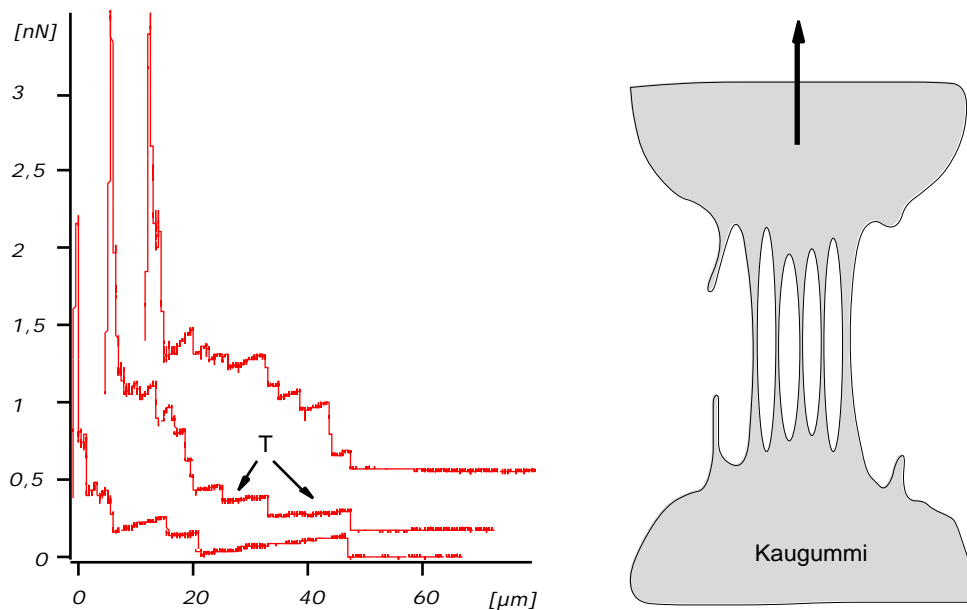


Abb. 6.13: Zellkontakte von  $150 \pm 400$  pN für 20 s auf Petrischale mit höherer Kraftauflösung lassen mutmaßliche Einzelmolekülereignisse und Tethersufen (T), die beim Dehnen der Zelle wie Kaugummifäden reißen, erkennen.

Die Neigung Membranschläuche (Tether) zu ziehen ist ebenfalls deutlich höher und wird durch die pseudopodienreiche Struktur der Dictyostelien (Abb. 6.7) begünstigt, während die RBC starke Membranverankerungen über die Ankyrine (Abb. 2.1) zu ihrem sehr starren Zytoskelett besitzen. Daher ist auch die Wechselwirkungslänge bei RBC nur wenige Mikrometer, während die extrem flexiblen und größeren Dictyostelien manchmal bis über 50  $\mu\text{m}$  weit Zellkontakte halten können. Dabei sind die Stufen von mutmaßlich einzelmolekularen Kraftabbrissen bei höherer Kraftauflösung (Abb. 6.13) deutlich zu erkennen, ebenso wie das tendenzielle Abnehmen der Steigung von Stufe zu Stufe. Die Elastizität (Steigung vor den Stufen) der Verbindung zwischen den Zellen nimmt (wie in Abschnitt 4.3) mit der Entfernung vom Kontaktpunkt ab. Die Beteiligung des Zytoskelettes an der Elastizität der Bindung geht also mit zunehmender Zelltrennung zurück (Abschnitt 4.3). Aktinfilamente sind in den Membranfingern (Filopodien) vermehrt vorhanden und können mit der Bindungsstelle verknüpft sein. Bei waagrecht Verlauf der Kraftkurve ist die Kraftladungsrate Null. Somit ist die Verbindung rein viskos und besteht in der Regel nur aus wenigen, unabhängigen, langen und aktinfilamentfreien Tethern. Die verbindende Kraft nimmt mit der Anzahl der Bindungen aber vor allem mit der Querschnittsfläche und der Elastizität des Verbindungsmaterials ab (in völliger Analogie mit einem Fäden ziehenden Kaugummi, der bei konstanter Kraft auseinander gezogen wird Abb. 6.13).

Für den Nachregelalgorithmus zur Aufrechterhaltung der konstanten Adhäsionskraft stellten Dictyostelien eine echte Herausforderung dar, da sie nicht wie RBC viskoelastisch dem Druck langsam nachgeben, sondern aktiv mit Kräften bis zu einigen nN am Kraftsensor ziehen und ihn auch wegdrücken. Daher beginnen die Adhäsionskraftkurven nach langen Zellkontakten oft nicht an der eingestellten Kontaktkraft, sondern bis über 400 pN höher oder tiefer<sup>14</sup>. Aussagen zur Zellelastizität aus der Annäherungskraftkurve sind aufgrund dieser starken Zellaktivität nicht effektiv.

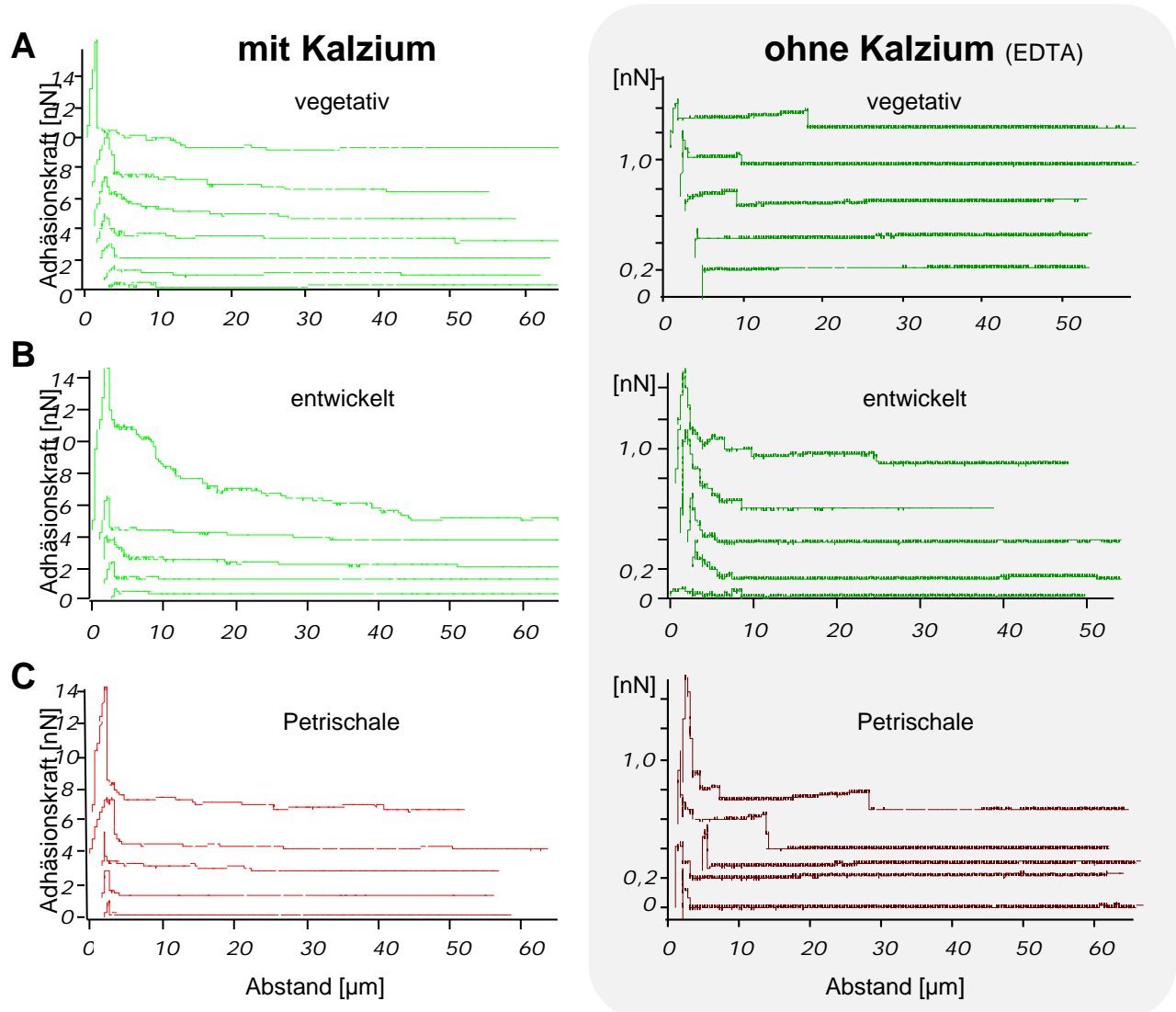


Abb. 6.14: Interzelluläre Kontakte (A) ohne und mit (B) csA produzierenden Zellen; C) Kontakte zwischen Zelle und Petrischale. Alle Kontaktzeiten betragen 20 s bei Kontaktkräften von  $150 \pm 400$  pN in Phosphatpuffer (links), in 5 mMol EDTA (rechts).

#### 6.2.2.2 Kalziumabhängigkeit der Adhäsion

Die zweiwertigen Ionen in der Messlösung können durch Komplexierung des freien Kalziums mit dem Chelatbildner EDTA stark reduziert werden. Bis auf das csA

<sup>14</sup> Bei diesen Experimenten war der Threshhold für die Nachregelung noch bei 500pN später bei 40pN.

benötigen alle CAMs von Dictyostelium Kalzium um den Partner zu binden, daher wird ihr Beitrag zur Zelladhäsion durch Zugabe von EDTA unterdrückt.

Zunächst werden durch das EDTA nur die extrazellulären kalziumabhängigen Reaktionen geschwächt, aber nach und nach auch die im Inneren der Zelle. Nach etwa 4-6 Stunden beginnen die Zellen eine kugelige Gestalt anzunehmen und ihre Bewegungsaktivität zu verlieren. Die Adhäsivität des csA verändert sich im Rahmen der Schwankungen nicht deutlich feststellbar, jedoch werden die Zellen weicher, vermutlich durch Defekte im Aufbau des Zytoskeletts. Experimente mit Zellen in EDTA sollten daher nie länger als drei Stunden dauern um sicher zu gehen, daß die Zellen noch vital sind<sup>15</sup>.

In Abb. 6.14 erkennt man den Einfluß des fehlenden Kalziums in der Lösung auf die starken Adhäsionen. Trotz langer Kontakte von 20 s ist die maximale Kraft von 0,5 nN gegenüber der ohne EDTA (15 nN) stark vermindert. Analoges gilt für die Adhäsionskräfte an Plexiglas bei Kalziumentzug. Höchstwahrscheinlich sind die dennoch auftretenden Adhäsionsstufen zwischen den vegetativen Dictyostelien von 40 bis 200 pN auf "Fehlkontakte" der Zellen mit der Petrischalenoberfläche oder dem Kraftsensor zurückzuführen. Während der 20 Sekunden des Kontaktes ist dies leicht durch die Beweglichkeit der Zellen möglich. Auch bei den entwickelten Dictyostelien treten solche "Fehlkontakte" auf. Viel signifikanter aber sind deren im Durchschnitt deutlich höheren, vermutlich durch das csA vermittelten, Adhäsionskräfte. Auf Petrischale ist die Adhäsion zwar mindestens von derselben Stärke, aber völlig unabhängig vom verwendeten Zelltyp und seinem Entwicklungsstadium. Außerdem zeigt sie in ihrem Verlauf ein ausgeprägtes Treppmuster mit Stufenhöhen von etwa  $120 \pm 80$  pN. Diese Wechselwirkungen sind durch die proteindenaturierenden Eigenschaften der Petrischale als Festkörper und unspezifische Ladungs- und Hydrophobizitäts-wechselwirkungen erklärbar.

Die Betrachtung des Adhäsionsmaximums ist wegen der nicht auszuschließenden "Fehlkontakte" nicht ausreichend um die csA-Wechselwirkung zu charakterisieren. Naheliegender ist, die Stufen mit Wechselwirkungen einzelner Moleküle zu verbinden. Die Höhe der Stufen vor dem Lösen der allerletzten Zellbindung sind allerdings meist von den noch vorhandenen anderen Zellverbindungen überlagert und daher weniger aussagekräftig als die allerletzte Abrißstufe.

Durch die Verlagerung des Interesses auf die Einzelmolekülebene werden im Folgenden wiederum die Kontaktzeit und die Kontaktkraft möglichst klein gehalten und sehr weiche Kraftsensoren ( $< 5$  mN/m) verwendet.

---

<sup>15</sup> Zu Beginn der Arbeit wurden vorzugsweise längere Experimente gemacht, da die Zellen dadurch weniger mobil und viel leichter handhabbar waren.

### 6.2.2.3 Spezifische Adhäsion

In Abb. 6.15 sind repräsentative Kraftkurven zwischen nicht gehungerten (vegetativen) bzw. 6h gehungerten (entwickelten) Dictyostelien (wildtyp AX2) in EDTA dargestellt. Die Kontaktzeiten betragen 0,2 Sekunden bei einer Kontaktkraft von etwa  $70 \pm 20$  pN. Die Adhäsionen der vegetativen AX 2 Zellen sind im Vergleich zu den entwickelten Zellen<sup>16</sup> drastisch reduziert. Aus den Kurven wird jedoch auch die Schwierigkeit deutlich die Zellkontaktzeit zu definieren:

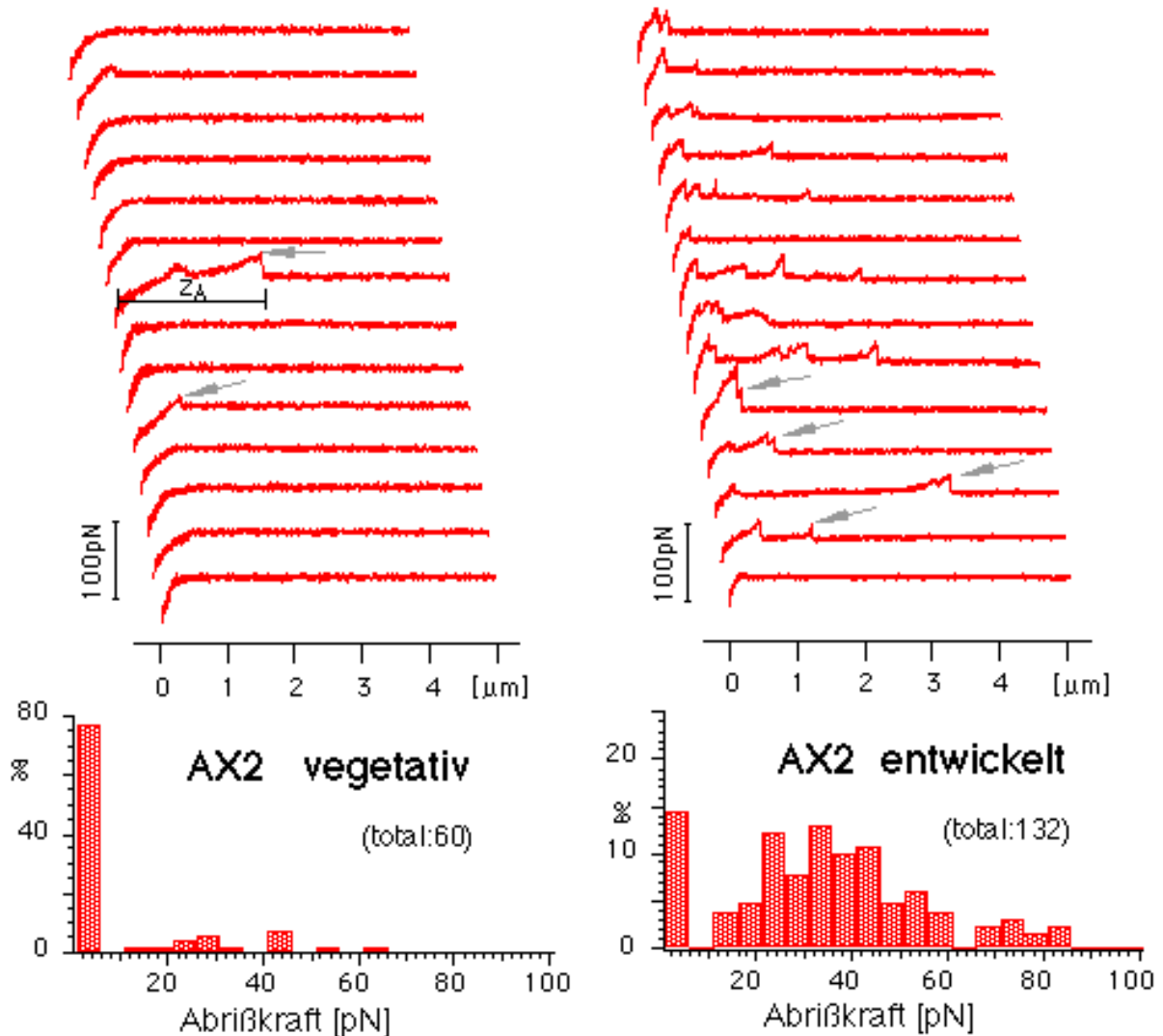


Abb. 6.15 links: Kraftkurven von genährten Wildtypzellen. Rechts: 6 Stunden gehungerte Wildtypzellen. Die Pfeile zeigen den letzten Zellkontaktabriß, dessen Kraftsprung in den Histogrammen gezählt wird. Unten: Histogramme nach Zellkontakten von 0,2 Sekunden Dauer bei etwa 80 pN Kontaktkraft aus einer Stichprobe (total) von 60 bzw. 132 Kraftkurven.

Die Stufen der letzten Zellabriss liegen sehr unterschiedlich weit ( $z_A$ ) vom Kontaktpunkt entfernt. Die Zellen sind entsprechend der Zurückfahrsgeschwindigkeit  $\dot{z}$  des Piezos länger als die eingestellte Kontaktzeit  $t_k$  zusammen ( $t_{ges}$

<sup>16</sup> Selbst nach lediglich 0,2 Sekunden dauernden Kontakten bei Kräften unter 40 pN sind in mindestens 30% der Kraftexperimente noch signifikante Adhäsionen von etwa 20 bis 80 pN nachgewiesen worden (Abb. 6.20).

=  $t_k + z_A/\dot{z}$ ). Mit den Pfeilen sind exemplarisch einige der letzten Zellabrißstufen für die darunter aufgetragenen Histogramme gekennzeichnet. Um sicher zu gehen, daß diese kraftspektroskopischen Experimente zwischen einzelnen Dictyostelien tatsächlich die csA-Wechselwirkung nachweisen, wurden parallel elektrophoretische Gele mit fluoreszenzmarkierten csA-Antikörpern von gleichzeitig aliquotierten Zellen ausgewertet (Anhang).

Im jeweiligen Gel erkennt man eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 80 kD, für den Fall, daß die Zellen csA exprimiert haben. Die Adhäsionshäufigkeit ist bei solchen Zellen deutlich über der von vegetativen Zellen, die, ausreichend genährt, kein csA bilden (Abb. 6.15). Um nachzuweisen, daß tatsächlich das csA die Ursache für die gemessene Wechselwirkung ist, wurde mit folgenden Mutanten von Dictyostelium die csA-Spezifität der Adhäsionsexperimente getestet:

Zelltyp [csA-Expression]	vegetativ	entwickelt
AX2	-	+
HG1287	-	-
HG1287 CPH	-	+
HTC1	+	(+)
HTCP8 [transmembran]	+	(+)
ATCP8 [transmembran]	+	(+)
T10	(-)	-
Alanin [punktmutiert]	+	(+)

Tabelle 6.1: Übersicht der csA-Expression der Mutanten: +: csA-Expression; -: keine csA-Expression; hinterlegt: signifikante Adhäsionskraft (in Klammern: nicht gemessen).

Zur Übersicht sind die verschiedenen Mutanten in der Tabelle 6.1 mit ihren Eigenschaften hinsichtlich der csA-Expression, abhängig vom Entwicklungsstadium, zusammengefaßt. Die geklammerten Teile der Tabelle wurden wegen ihrer geringen Relevanz<sup>17</sup> nicht vermessen. In den Histogrammen (Abb. 6.16) ist die prozentuale Verteilung der gemessenen Abrißkräfte am allerletzten Zellkontakt in Schritten von 5 pN dargestellt. In eindeutiger Weise spiegeln die Histogramme mit hohem Adhäsionsanteil die csA-exprimierenden Zellen, wie in der Tabelle 6.1 aufgelistet, wieder. Die Verwendung der 6 Stunden gehungerten T10-Mutante, bei der alle Eigenschaften der Wildtyp-AX2-Zellen erhalten sind, bis auf die Möglichkeit das csA-Molekül zu exprimieren, bringt den einfachsten und eindeutigsten Nachweis

<sup>17</sup> der Fall von vegetativem HG1287 ist an sich auch irrelevant und wurde mit nur sehr wenigen Experimenten belegt.

der Spezifität der kraftspektroskopischen Methode. Bis auf wenige Wechselwirkungen, die vermutlich durch unkontrollierte Kontakte der oberen Zelle mit der Petrischale oder der unteren Zelle mit dem lektinaktivierten Sensor hervorgerufen wurden, liegt die Adhäsionswahrscheinlichkeit deutlich unter der von csA-exprimierenden Zellen.

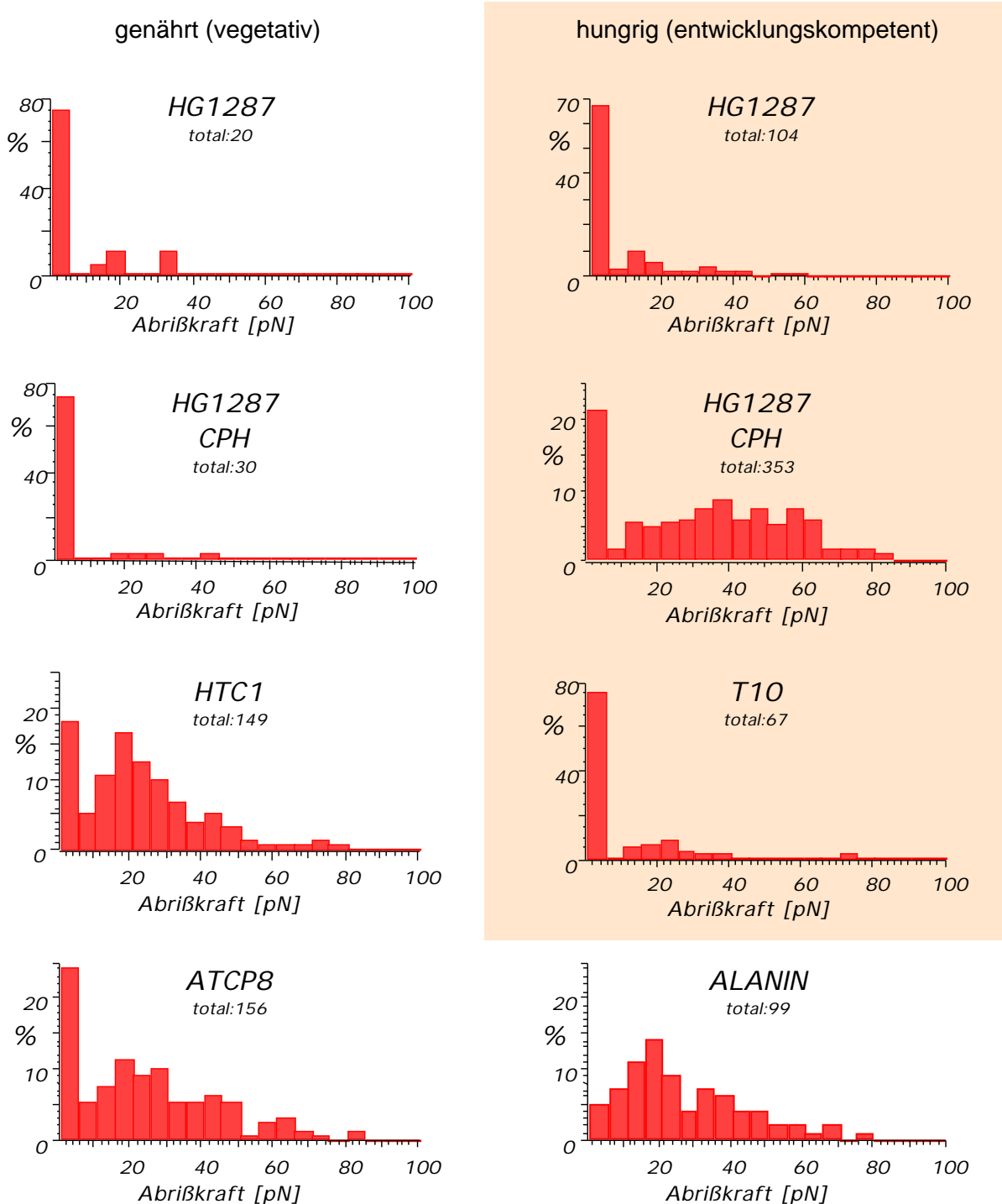


Abb. 6.16: prozentuale Kraftspektren nach Zellkontakten von 0,2 Sekunden bei etwa 60 pN. Mit „total“ ist die Stichprobe der Kraftkurven bezeichnet.

In die Mutante HG1287, bei der unter anderem die Produktion des csA-Moleküls gestört ist, wurde die csA-kodierende DNS-Sequenz vielfach reinsertiert. Diese

Mutante (HG1287 CPH) zeigt wieder Adhäsion, die gegenüber dem Wildtyp AX2 sogar erhöht ist, analog dem durch die Gele belegten erhöhten csA-Vorkommen (Anhang). Dies ist ein zweiter spezifischer Nachweis der csA-Sensitivität der kraftspektroskopischen Methode.

#### 6.2.2.4 Eigenschaften der spezifischen Adhäsion

Zur näheren Charakterisierung der csA-spezifischen Adhäsion wurden verschiedene auf die Adhäsion einflußnehmende Parameter untersucht:

##### 6.2.2.4.1 Kraftladungsrate

Die gemessene Abrißkraft hängt von der Potentialbreite der Bindungstasche ( $x := x_{\max} - x_{\min}$  [Å]), sowie der Kraftladungsrate ( $\dot{F}$  [pN/s]) (2-6) und nur bedingt von der natürlichen "off-Rate" ( $k_{\text{off}}$  [1/s]) ab [15,65,68]. Bis es zu einem Abriß kommt, ist im statistischen Mittel die gesamte zeitliche Entwicklung der Bindungsbelastung (Integration über  $k_{\text{off}}^*(F) dF$  bis zum Erreichen der tatsächlichen Abrißkraft  $F$ ) maßgeblich, wobei  $k_{\text{off}}^*$  die Funktion der Kraft-Dehnungs-Charakteristik aller beteiligten Proteine zwischen Kraftsensor und Bindungsstelle, sowie Bindungsstelle und Probenhalter beinhaltet. Daraus ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit für die Trennung der Bindungspartner bei einer bestimmten Kraft (2-5).

Der Verlauf des Kraftanstieges bis zum Abriß hängt von den mechanischen Eigenschaften der Kopplung  $k_{\text{off}}^*$  der Bindungspartner an Kraftsensor und Substrat ab. Im Falle von Dictyostelium-Zellen ist die Kopplung schwer zu charakterisieren, da die Zelle aktiv durch Kontraktion oder Relaxation in die Zuggeschwindigkeit eingreifen kann. Außerdem sind in der Zelle viele Komponenten vom Zytoskelett bis zur Zellmembran und deren Zwischenverbindungen für die Ankopplung der Liganden an das Substrat beteiligt. Zusätzlich verteilt sich bei den Zellen die Belastung auf mehrere Bindungen, so daß Aussagen über einzelne Bindungen nur statistisch getroffen werden können. Für die Zell-Zellwechselwirkung wurde die Kopplungselastizität der Einfachheit halber durch die Funktion einer freibeweglichen entropischen Polymerkette genähert [127]. Weil in die Histogramme immer der jeweils letzte Abriß eingetragen wird, stammt er häufig von tethergekoppelten Bindungen, die sehr niedrige Kraftladungsraten (sehr flacher Kurvenverlauf) haben.

Experimente zur Kraftladungsabhängigkeit, durch Variation der Zuggeschwindigkeit zwischen 0,5 und 12  $\mu\text{m/s}$ , wurden mit HTCP8- und ATP8-Zellen durchgeführt, die wegen ihres Transmembranankers die reine csA-Wechselwirkung aufweisen sollten. Dabei werden die Kraftabrisse nach der Steigung der Kraftkurve (Kraftladungsrate) direkt vor dem Abriß sortiert. Daraus werden Histogramme zu verschiedenen Kraftladungsraten erstellt. Die Kraftmittelwerte dieser Histogramme



werden gegen den Logarithmus (ln) des Mittelwertes der zugehörigen Ladungsrate aufgetragen (Abb. 6.17).

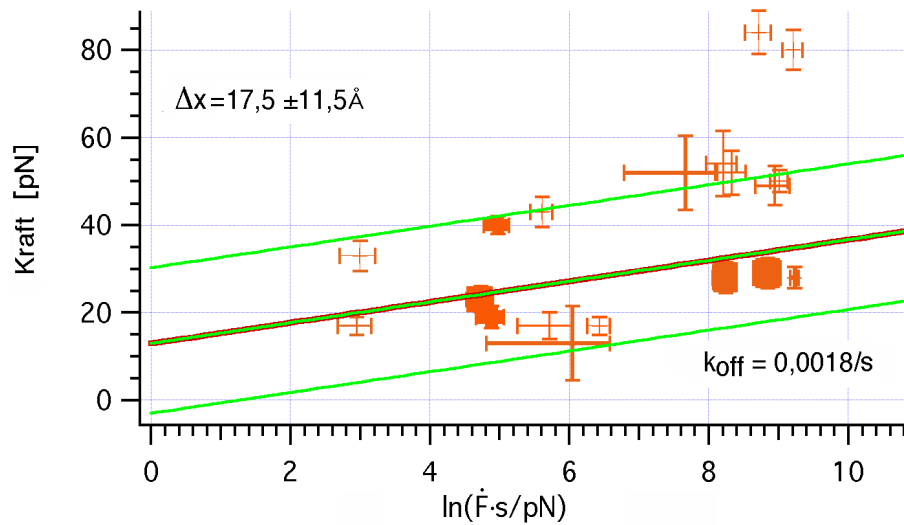


Abb. 6.17: Die Kraftmittelwerte werden gegen den Logarithmus (ln) der zugehörigen Ladungsratenmittelwerte, nach Anzahl der Messungen gewichtet (Dicke der Fehlerkreuze), aufgetragen und mit einer Schwerpunktsgeraden verbunden. Aus der Geradensteigung wurden die die Potentialbreite  $x$  und die natürliche Offrate  $k_{\text{off}}$  ermittelt.

Die Dicke der Fehlerkreuze entsprechen dabei der Gewichtung nach Anzahl der Messungen. Sie werden mit einer Schwerpunktsgeraden verbunden [15].

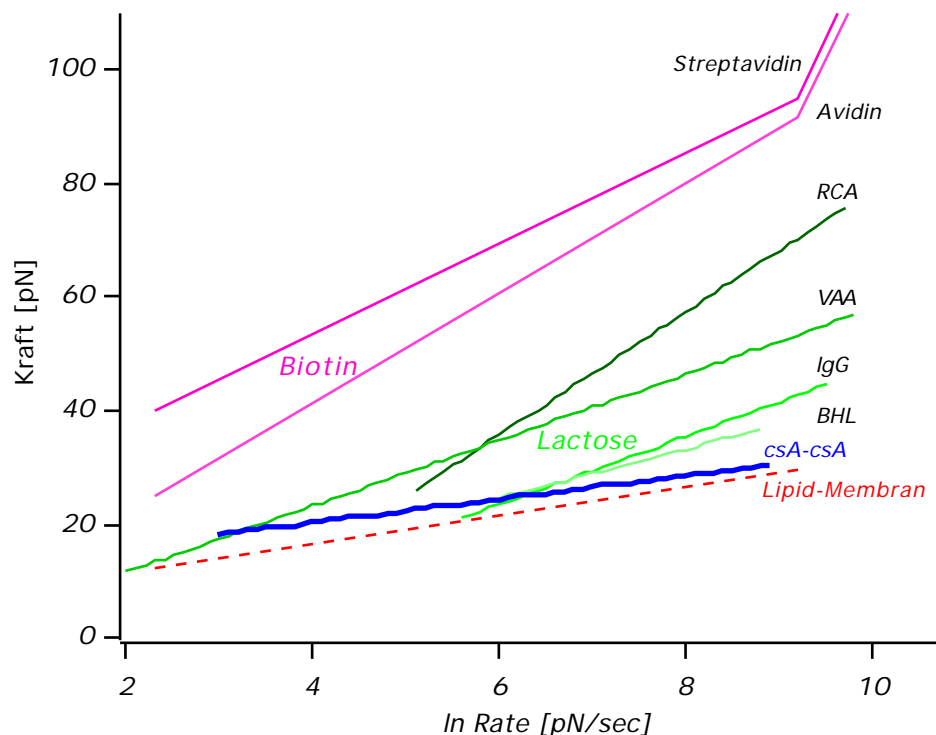


Abb. 6.18: Verschiedene nichtkovalente Bindungspaare zeigen eine logarithmische Abhängigkeit von der Kraftladungsrate. Oben das Biotin -Avidin und -Streptavidin System [128,129]. Darunter die Affinität verschiedener Lektine (RCA, VAA, BHL) sowie eines Antikörpers (IgG) zu Laktose [15]. Ganz unten mit schwacher Steigung das csA-Molekül. Gestrichelt die Haltekraft eines Lipidankers in einer Membran [67] dargestellt.

Besonders bei hohen Raten wirken sich hydrodynamische Effekte der weichen Sensoren immer stärker aus. Daher reißen vermutlich einige Werte bei hohen Raten aus dem ohnehin schon sehr breitgestreuten Feld aus. Die Ratenabhängigkeit wird in Abb. 6.18 mit anderen Rezeptor-Ligandsystemen in Verhältnis gesetzt. Im Rahmen der Meßtoleranz von etwa 5 pN und Unsicherheiten von etwa 20% in der Bestimmung der Federkonstante muß die Lage der csA-csA Geraden relativiert betrachtet werden. Es stellt sich eine sehr moderate Ratenabhängigkeit heraus, die knapp über der für einen Lipidmembrananker [65] liegt. Das bedeutet aber, daß eventuell nicht die csA-Wechselwirkung, sondern vielleicht die Membranankerkraft den entscheidenden Beitrag zu den Kraftspektren liefert. Der Klärung der Frage, ob tatsächlich die homophile csA-Wechselwirkung oder die Lipidankerkraft gemessen wurde, soll im Abschnitt 6.2.3.1 nachgegangen werden. Im Vergleich zu den anderen Ligandpaaren ist der Kraftanstieg sehr niedrig. Möglicherweise ist dies auf die Ankopplung des Moleküls in seiner natürlichen Umgebung zurückzuführen, während die anderen Systeme immer artifiziell an Festkörperoberflächen gekoppelt sind. Durch Rückrechnung der natürlichen off-Rate ohne angelegte Kraft gemäß Gleichung ( 2-3 ), erhält man einen Wert von  $k_{off} = k_{off}^*(F=0) = 0,0018 \pm 0,005/s$ . Mittels Oberflächenplasmonenspektrometrie wurde in erstaunlich guter Übereinstimmung  $k_{off}$  zu 0,0018/s bestimmt [120].

#### **6.2.2.4.2 Kontaktkraft**

Wie bereits diskutiert (Abschnitt 4.2 und 6.1.1.4) steigt bei Erhöhung der Kontaktkraft sowohl die Wahrscheinlichkeit für Adhäsionsereignisse, als auch die Wahrscheinlichkeit höhere maximale Adhäsionskräfte zu messen.

Die zugehörigen Kraftspektren der letzten Zellabrisse verschieben sich ebenfalls zu höheren Kräfteverteilungen in Abhängigkeit von der Kontaktkraft (Abb. 6.19), was bedeutet, daß sich offensichtlich die mittlere Einzelbindungsstärke ebenfalls mit der Kontaktkraft erhöht.

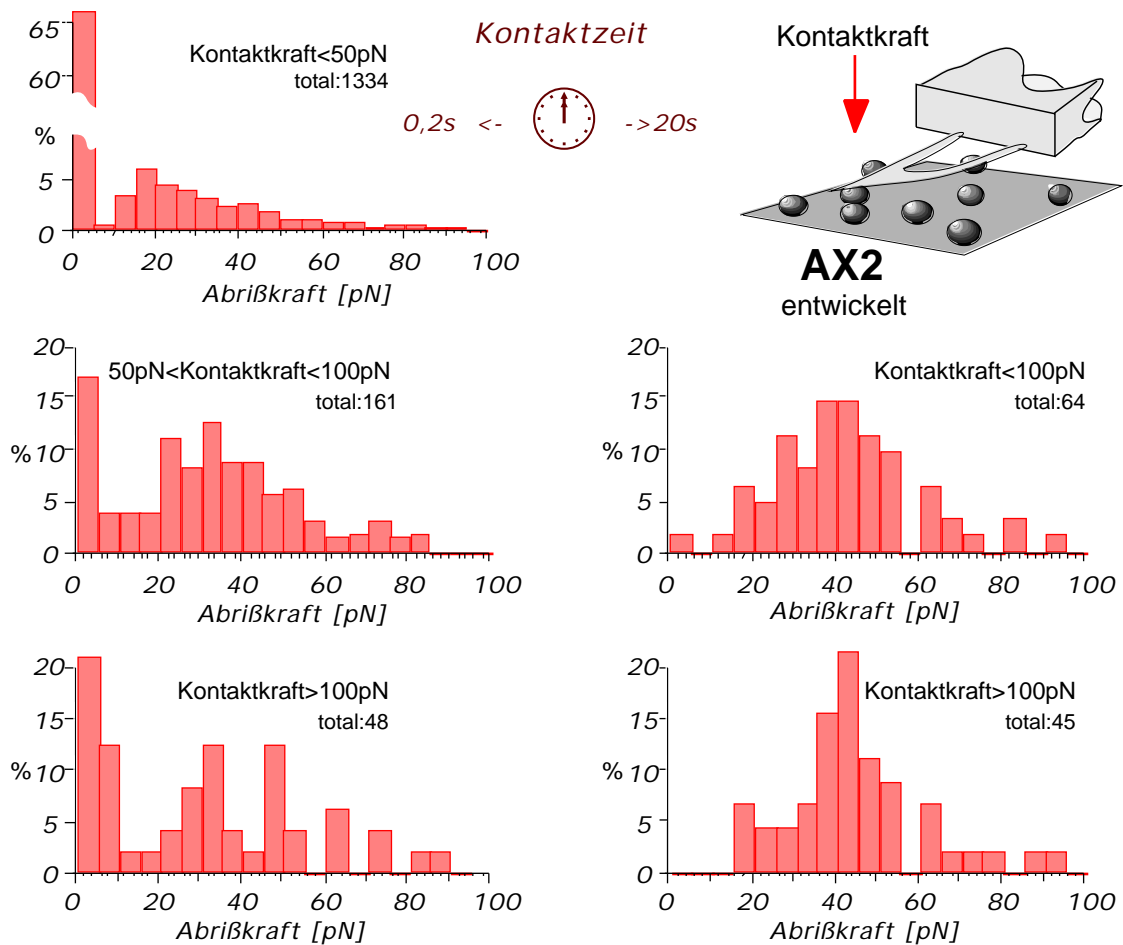


Abb. 6.19: Mit zunehmender Kontaktkraft nimmt die Adhäsionswahrscheinlichkeit und der Anteil höherer Kräfte zu. Nach Kontaktzeiten von 20 Sekunden (rechts) tritt immer Adhäsion auf, aber die Kraftverteilung scheint<sup>18</sup> unabhängig von der Kontaktkraft. („total“ gibt die Anzahl der ausgewerteten Kraftkurven an.)

#### 6.2.2.4.3 Kontaktzeit

Durch die starke Aktivität von Dictyostelien sind die Messungen großen Schwankungen unterworfen, so daß die Kraftspektren kleiner Stichproben nur Trends andeuten können. Dennoch nehmen, wie zu erwarten, die maximalen Adhäsionskräfte und die Adhäsionswahrscheinlichkeit mit zunehmender Kontaktzeit zu ( 4-7 ). Denn sowohl die Oberflächen haben länger Zeit sich aneinander zu schmiegen, als auch die Moleküle zueinander zu diffundieren. Auch die Kraft des letzten Abrisses nimmt dabei zu, wie an den drei Kraftspektren mit zunehmenden Kontaktzeiten von 0,2 s, 1 s und 2 Sekunden zwischen entwickelten AX2-Zellen zu erkennen ist (Abb. 6.20). Außerdem sind gestrichelt Gausskurven angedeutet, die bevorzugte Kraftmittelwerte bezeichnen sollen. Die höheren Mittelwerte werden dabei eher bei längeren Kontaktzeiten gemessen.

<sup>18</sup> Leider ist die Stichprobe zu klein um eine gefestigtere Aussage zu treffen.

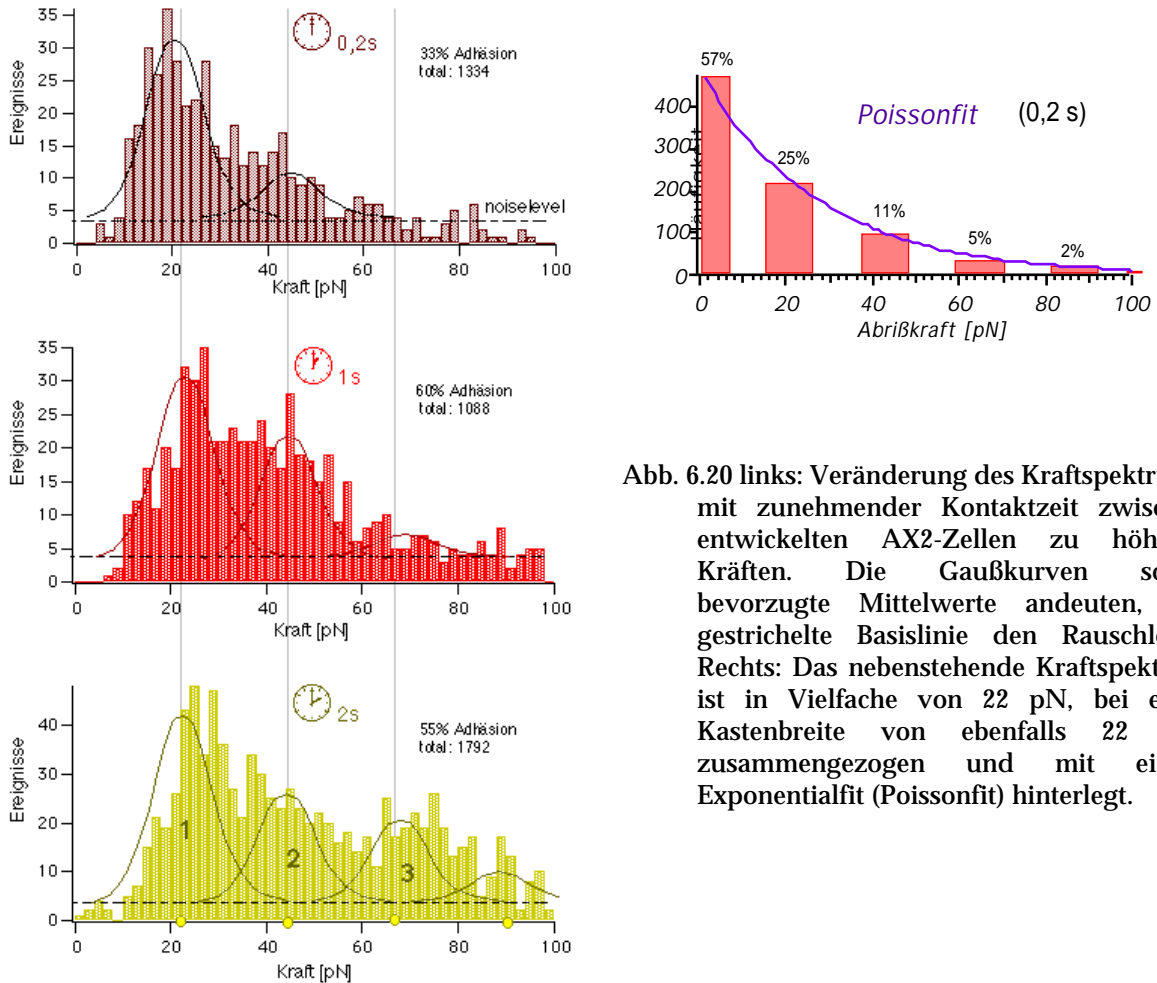


Abb. 6.20 links: Veränderung des Kraftspektrums mit zunehmender Kontaktzeit zwischen entwickelten AX2-Zellen zu höheren Kräften. Die Gaußkurven sollen bevorzugte Mittelwerte andeuten, die gestrichelte Basislinie den Rauschlevel. Rechts: Das nebenstehende Kraftspektrum ist in Vielfache von 22 pN, bei einer Kastenbreite von ebenfalls 22 pN, zusammengezogen und mit einem Exponentialfit (Poissonfit) hinterlegt.

Die Kraftspektren (Abb. 6.16) von HG1287 CPH, mit erhöhter csA-Dichte, sind ebenfalls zu höheren Kräften ( $60 \pm 5$  pN) gegenüber dem Wildtyp AX2 und den Mutanten HTC1 oder HTCP8 ( $20 \pm 5$  pN) verschoben.

### 6.2.3 Einzelmolekülbetrachtungen

Geht man davon aus, daß der im Kraftspektrum dargestellte letzte Zellabriß einzelne Molekülkräfte darstellt, sollten alle Kraftspektren aller Mutanten, die csA exprimieren, idealerweise dasselbe Kraftverteilungsmuster mit einem gemeinsamen eindeutigen Mittelwert für das "csA-csA-Interaktionskraftquant" besitzen. Außerdem liegt die Vermutung nahe, daß die homophile csA-Interaktion größer als die Verankerung des Moleküls in der Membran sein könnte, da die Kraftspektren einen Bereich der csA-Wechselwirkungskräfte von 10 bis über 80 pN umfassen (bei sehr hohen Kraftladungsrate sogar über 100 pN).

#### 6.2.3.1 Der Membrananker

Möglicherweise ist in allen Kraftspektren eine Mischung aus Membranankerabrissen und csA-Molekültrennungen vertreten, zumal die kraftladungsabhängige Haltekraft eines Lipidmoleküls in der Membran fast exakt dem Verlauf des csA-Moleküls (Abb.

6.18) entspricht. Vermutlich liegt die Haltekraft des csA-Ankers aber schon aus biologischen Gründen über den von Evans [65] an artifiziellen Lipidvesikelmembranen aus SOPC und Cholesterol einer Lipidlänge von 18 Kohlenstoffeinheiten bestimmten Werten.

Zur Klärung der Frage an welcher Stelle die Verbindung zwischen den Zellen tatsächlich aufgeht, sind die Mutanten HTCP8 und ATCP8 sehr geeignet, da sie statt des Ceramid Ankers am C-terminus des csA-Moleküls eine transmembrane Region mit stark hydrophoben Anteilen und einem kurzen ladungstragenden cytoplasmatischen Teil besitzen. Dieses modifizierte transmembran verankerte csA-Protein sollte deutlich schwerer aus der Membran zu reißen sein, als das unmodifizierte csA-Protein mit einfachem Lipidmembrananker.

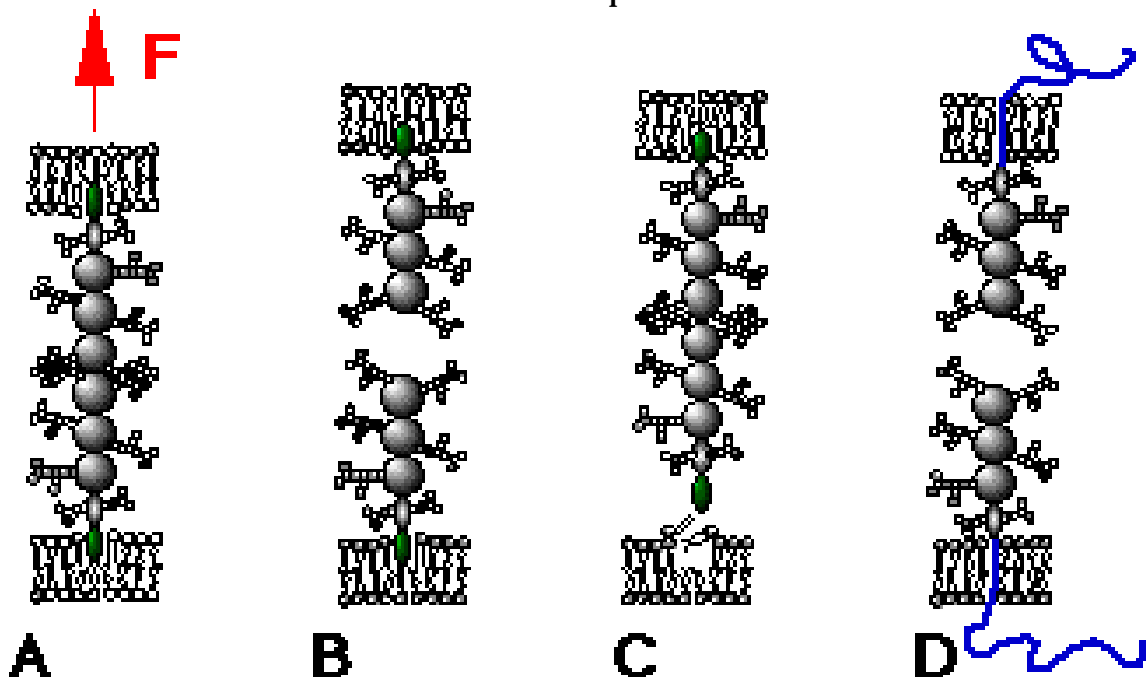


Abb. 6.21: Varianten der Trennung zweier csA-Moleküle: A) csA-Bindungspaar vor der Trennung; B) das Paar trennt sich unter Last; C) der Membrananker reißt heraus; D) bei der Transmembranankermutante ATCP8 trennt sich immer das Bindungspaar.

Die Kraftspektren der Mutanten HTCP8 und ATCP8 sollten, gegenüber dem Fall des Herausreißen des Lipidankers bei den Zellen mit normalem csA, deutlich mehr Kraftabrisse bei höheren Kräften zeigen.

Wie in der Übersicht (Abb. 6.16 und Abb. 6.22) zu erkennen, ist dies aber nicht der Fall. Im Gegenteil, die hohen Kraftbeiträge, wie sie in Abb. 6.20 nach Kontakten von 2 Sekunden auftreten werden hier selbst nach Kontaktzeiten von 10 Sekunden selten gemessen. Daher liegt es nahe anzunehmen, die Bindung bricht zwischen den csA-Molekülen und nicht am Molekülanker in der Membran. Eine nicht auszuschließende alternative Interpretation der Daten wäre daraus die Gleichheit der Bindungskräfte von Membrananker und csA-Bindung zu folgern. Der Versuch diese Frage schlüssig aus der Beobachtung der "Abnutzung" der csA-

Wechselwirkung durch ein Langzeitexperiment an derselben Zelle zu beantworten, ist wegen der hohen Beweglichkeit und Regenerativität der Zellen nicht gelungen.

Die wahrscheinlichere Interpretation ist, auch aus biologischer Sicht, daß das csA größtenteils in der Membran bleibt und das Kräfteverhältnis Anker-/csA-Bindung evolutiv zur größtmöglichen ökonomisch vertretbaren Ausnutzung der Lipidankerkraft ausgereift ist. Die hohen Kräfte bei hohen Ladungsraten (Abb. 6.17) könnten aber auch einen Knick andeuten wie er beim Biotin-Avidin-System beobachtet wird. Dann würde sich bei hohen Zuggeschwindigkeiten der Membrananker lösen [67]. Unklar ist aber weiterhin wie die hohen Kräfte von 60 pN und mehr in den Kraftspektren vom Lipidanker gehalten werden können. Aus der Vielzahl von Messungen ist aber genug Datenmaterial vorhanden, um diese Frage durch nähere Untersuchung der Wechselwirkung des einzelnen csA-Proteins zu klären:

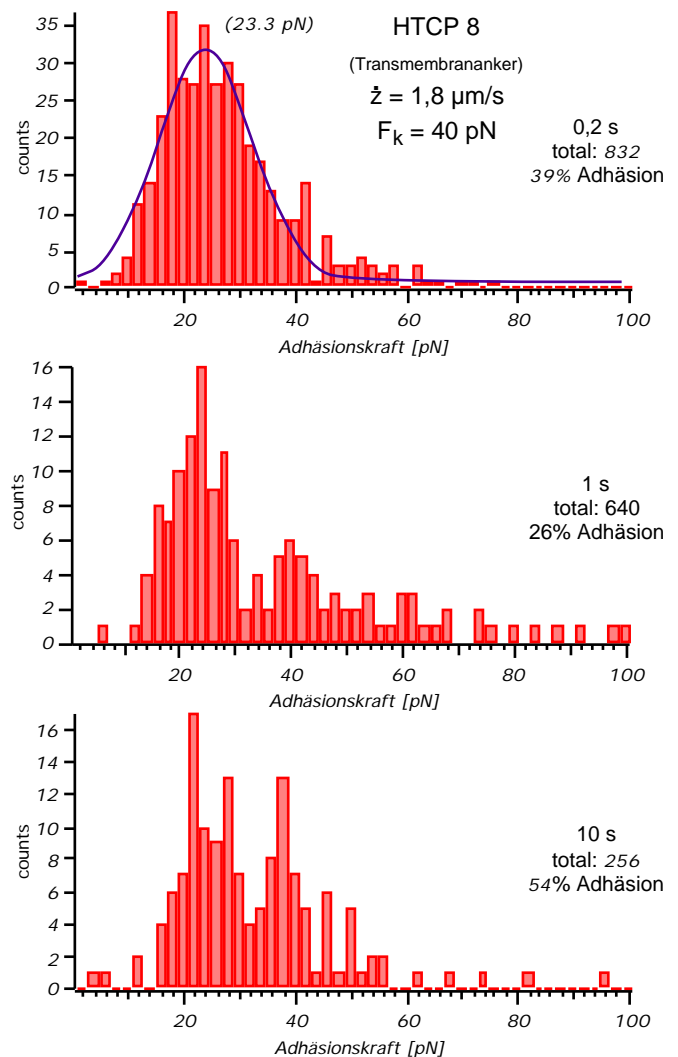


Abb. 6.22: Zeitserie des Transmembranankonstruktes HTCP 8. Die wahrscheinlichste Abrißkraft nach 0,2 s Kontakten liegt bei 23,3 pN (Gaussfit). Deutlich treten zwei Maxima nach Kontakten von 1 und 10 Sekunden auf.

### 6.2.3.2 Die Einzelmolekülwechselwirkungskraft des csA

Bereits die 5 pN-grob gerasterten Kraftspektren (Abb. 6.16) lassen eine Substruktur erahnen. Obwohl diese Histogramme aus verschiedenen Experimenten, und daher mit unterschiedlichen Kraftsensoren verschiedener Federkonstanten, zusammengesetzt sind, weisen besonders die dauerexprimierenden Mutanten bei etwa 20 pN ein Hauptmaximum, bei etwa 45 pN und eventuell 65 pN Nebenmaxima auf. Die Kraftspektren von AX2 (Abb. 6.19) und HG1287 CPH sind vorwiegend mit

härteren Kraftfedern aufgenommen worden<sup>19</sup> und lassen den Trend nicht so deutlich erkennen.

Die Histogramme der HTCP8-Mutante mit Transmembrananker zeigen zunächst einen Kraftmittelwert von 23 pN im Kraftspektrum für 0,2 Sekunden Kontaktzeit (Abb. 6.22). Bei längeren Kontaktzeiten von 1 und 2 Sekunden treten zwei Maxima bei 20 pN und knapp 40 pN hervor.

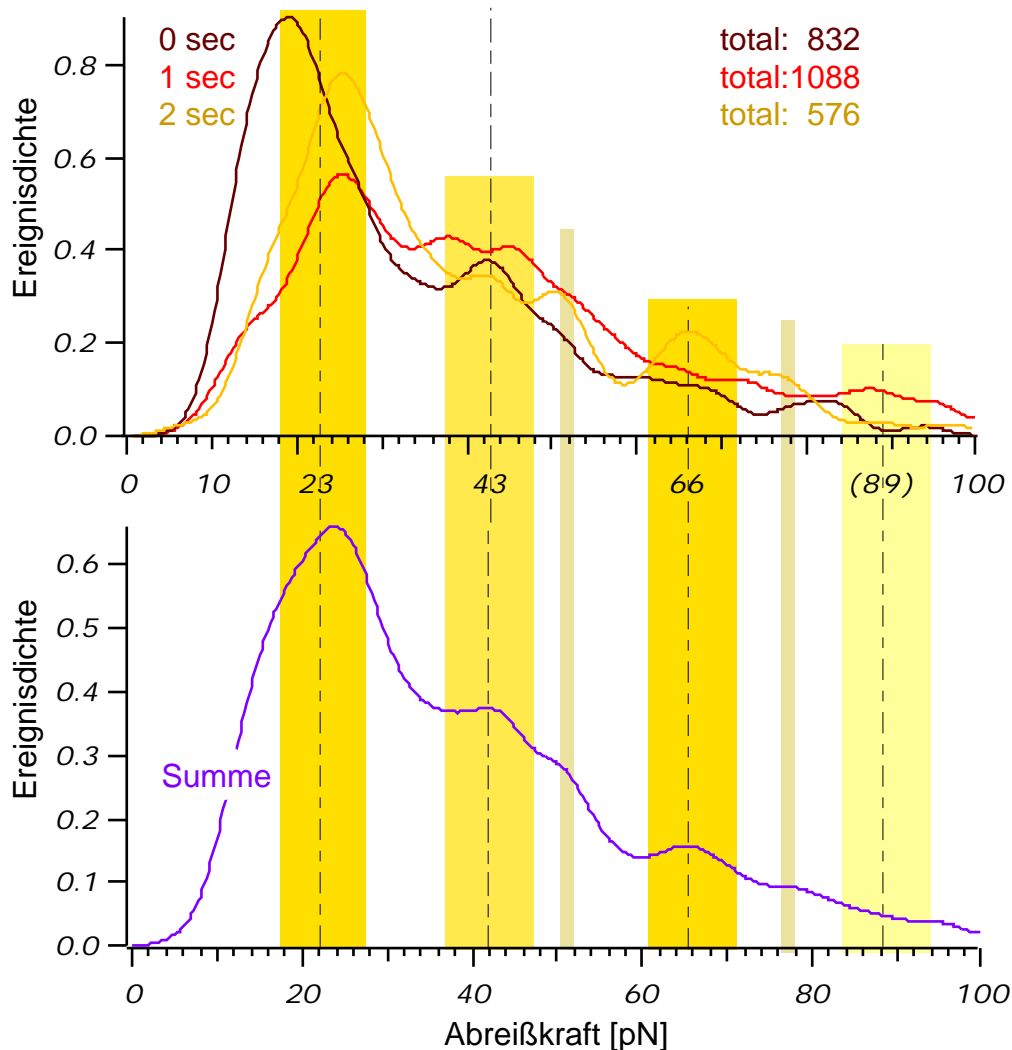


Abb. 6.23: Oben: hochaufgelöste und geglättete Kraftspektren nach 0,1 s, 1 s und 2 s langen Kontakten zwischen entwickelten AX2-Zellen von weniger als 50 pN. Unten: Summe der drei Spektren. Die Balken zeigen die Hauptmaxima von Vielfachen der csA-Einzelmolekülkraft von etwa 22,5 pN an (gestrichelt evtl. Nebenmaxima).

Das in Abb. 6.20 dargestellte Kraftspektrum von entwickelten AX2 ist mit sehr weichen Kraftsensoren (Federkonstante: 3,5 mN/m) bei Kontaktkräften von knapp 30 pN erstellt worden. Es zeigt bei 2 pN-feiner Unterteilung die Zeitabhängigkeit der angedeuteten Substruktur. Diese Histogramme sind allerdings bei einer Geschwindigkeit von 2,5  $\mu\text{m/s}$  entstanden im Gegensatz zu den anderen, die mit

<sup>19</sup> Sehr wahrscheinlich liegen, wegen Problemen bei der Federkonstantenbestimmung, die Kraftwerte dieser Spektren um 10 bis 15% zu niedrig.

etwa  $1,5 \mu\text{m/s}$  aufgenommen wurden. Deshalb ist möglicherweise die Kraftverteilung leicht ( $<1 \text{ pN}$ ) zu höheren Werten verschoben. Die Haupt- und Nebenmaxima zeichnen sich nach Kontaktzeiten von nur  $0,2$  Sekunden bei  $19$  und  $43 \pm 3 \text{ pN}$ , nach Kontaktzeiten von  $1$  Sekunde bei  $26$  und  $46 \pm 3 \text{ pN}$  und nach  $2$  Sekunden bei  $25$ , ( $44$ ) und  $70 \pm 4 \text{ pN}$  ab. Zur Verfeinerung der Auflösung wurden aus diesen Spektren nur die Daten, die mit demselben Kraftsensor bei den genannten Kontaktzeiten aufgenommen wurden, zusammengestellt (Abb. 6.23). Das Kraftspektrum wurde mit  $0,25 \text{ pN}$  aufgelöst und mit einem  $25 \text{ pN}$  groben Gaussfilter geglättet.

Die Maxima und Nebenmaxima treten jetzt deutlicher hervor, und es läßt sich folgern, daß die Bindungskraft des einzelnen csA-Moleküls bei  $22,5 \pm 3 \text{ pN}$  liegen muß, während die höheren Kräfte durch kooperatives Zusammenspiel mehrerer Molekülpaare entstehen könnten. In Abb. 6.20 ist rechts exemplarisch ein Histogramm mit vielfachen von  $22 \text{ pN}$  eingefügt und mit einer gefitteten Poissonverteilung hinterlegt. Daraus lassen sich die Häufigkeit für Ein- und Mehrfachabriss laut folgender Tabelle ablesen:

	1-fach	2-fach	3-fach	(4-fach)	(5-fach)
0,2 s	25 %	11 %	5 %	2 %	0 %
1 s	25 %	15 %	8 %	5 %	3 %
2 s	24 %	16 %	10 %	6 %	3 %

Tabelle 6.2: Kontaktzeitabhängige Poissonverteilung von Ein- und Mehrfachbindungen zwischen csA Molekülen.

Diese Interpretation erklärt auch die Kräfteverteilung bei HG1287 CPH (Abb. 6.16), bei der das Hauptmaximum bei  $40 \pm 5 \text{ pN}$  und die Nebenmaxima bei  $20$  und  $60 \pm 5 \text{ pN}$  zu liegen scheinen: bei HG1287 CPH ist die csA-Dichte so hoch (über 5% der Zellmembran) [130], daß kooperative Wechselwirkungen die Regel sind und die Einzelmolekülereignisse übertreffen. In der Zusammenfassung der drei Kontaktzeiten in ein Spektrum (Abb. 6.23) treten neben den Maxima bei Vielfachen von  $22,5 \text{ pN}$  auch noch kleinere Maxima auf (gestrichelte Balken), deren Ursprung allerdings noch völlig unklar ist.

## 6.2.4 Diskussion

Bei der Charakterisierung der csA-Wechselwirkung ist es offenbar gelungen die Einzelmolekülbindungskraft zu quantifizieren, das Auftreten Vielfacher der Einzelbindungskraft in den Spektren mit der Kontaktzeit und Kontaktkraft zu korrelieren, während die Frage nach dem Bruch der Bindungsstelle nicht mit letzter Sicherheit entschieden werden konnte. Auch die Frage nach der potentiellen



Bindungsstelle in der Molekülstruktur konnte mit der untersuchten Alanin-Mutante (Abb. 6.16 und Anhang) nicht gelöst werden. Aggregationsversuche mit Zellen, die an genau dieser Sequenz mutiert wurden zeigten ebenfalls keine signifikante Änderung in der Adhäsion [131]. Vielleicht ist das Ladungsmuster der potentiellen Bindungsregion nur eine langreichweitige Steuerungshilfe für die Bindungspartner, um das passgenaue Treffen der eigentlichen noch unbekanntenen Bindungstaschen zu beschleunigen [132].

Möglicherweise sind sogar mehrere Bindungsstellen im Molekül vorhanden, oder es entstehen neue Bindungstaschen durch Kooperation mehrerer csA-Moleküle (analog den dimeren Integrinen oder dem Bilden molekularer Überstrukturen wie sie bei Cadherinen diskutiert werden). Eine Bindung aus mehreren Subeinheiten könnte vielleicht auch die Existenz der Nebenmaxima erklären. Zudem liegt bei dem Transmembrankonstrukt HTCP8 (Abb. 6.22) das zweite Maximum deutlich unter 45 pN; dies könnte auf eine veränderte Oligomerstruktur bei einer Kooperativität der Moleküle hindeuten, da die hydrophobe Membranregion den Abstand der Moleküle eventuell ungünstig beeinflusst. Außerdem ist ein potentielles Trimer ( 67 pN) auch nach Kontakten von 10 Sekunden in diesen Messungen so gut wie nicht vorhanden (Abb. 6.22), was ein weiterer Hinweis für die Behinderung der Kooperativität von csA-Molekülen sein könnte. Zudem ist bei 50 pN die Haltekraft eines Lipidankers sicherlich überschritten, also kann diese Kraft nur durch zufällig gleichzeitig reißende Moleküle oder durch gezielte Oligomerbildung verursacht sein. Nur so kann die Kraft auf die Lipidanker der beteiligten Moleküle gleichmäßig verteilt werden um höhere Bindungskräfte als die einfache Membranhaltkraft auszuhalten. Zellen, die kein csA exprimieren, können ohne störende Scherkräfte trotzdem aggregieren und einen Fruchtkörper bilden. Es wurde deshalb vorgeschlagen, daß das csA-Glykoprotein für "schnelle" erste Zellkontakte verantwortlich sei und daß andere Adhäsionsmechanismen für die Aggregation auf einem festen Substrat ausreichen, wo längere Zeit zur Bildung und Stabilisierung von Kontakten zur Verfügung steht<sup>20</sup>. Die Bindung des csA ist sehr schwach im Vergleich zu anderen bisher bekannten Adhäsionsmolekülen (Abb. 6.18), da die Zellen während der Entwicklung des Fruchtkörpers ständig in Bewegung sind und im Zellverband aneinander entangleiten können müssen. Dennoch ist die csA- Wechselwirkung wegen der hohen Dichte (1-2% der Zellmembran) deutlich stärker als die der einzeln stärker adhätierenden, aber selteneren kalziumabhängigen Moleküle (siehe auch Abb. 7.1).

---

<sup>20</sup> Hieraus wird ein grundlegendes (für den analytischen Forscher etwas ärgerliches) Evolutionskonzept deutlich: die Natur hat oft mehrere redundante Systeme für ein Phänomen bereit stehen, um Defekte auszugleichen oder effektiv auf extreme Umweltveränderungen reagieren zu können.

Das natürliche Verhalten von Bindungspaaren ermöglicht langsame Bewegungen von gebundenen Zellen wie aus Abb. 6.17 zu erkennen ist: Je langsamer die Belastung ansteigt, desto kleiner ist die Kraft, bei der die Bindung sich öffnet. Im Extremfall geht die csA-Bindung im Mittel nach etwa 15 Minuten sowieso auf (natürliche off-rate). Durch die Vielzahl der Moleküle bleiben die Zellen dabei aber immer fest verbunden und können trotzdem langsam aneinander entlanggleiten.

### **6.3 Schlußbemerkung**

Durch die Befestigung eines einzelnen roten Blutkörperchens am Kraftsensor konnte die Leistungsfähigkeit der Zelladhäsionskraftspektroskopie unter Beweis gestellt und grundlegende Eigenschaften von Einzelzellwechselwirkungen auf der Ebene einzelner Moleküle bestimmt werden. Direkt darauf aufbauend sind pharmakologisch interessante Messungen zu Blutgerinnungsfaktoren oder Messungen von Blutzellen an Blutgefäßwandzellen vorstellbar [86].

Durch die Einzelzelleexperimente mit Dictyostelium wird ein weites Anwendungsfeld dieser Methode geöffnet: Die Vermessung einzelner Zelladhäsionsmoleküle in ihrer natürlichen Umgebung läßt sich sicherlich auch an vielen anderen Zelladhäsionsmolekülen durchführen, besonders wenn gepaart mit Gentechnologie gezielt Moleküle in der Zellmembran eingebaut und deren Eigenschaften peptidgenau modifiziert werden können. Kraftspektroskopische Messungen an weiteren genetischen Mutationen des csA-Moleküls könnten so beispielsweise auch zur besseren Charakterisierung der Bindungstasche dieses Adhäsionsmoleküls beitragen. Die Zelladhäsionskraftspektroskopie bietet nicht nur die Möglichkeit die Adhäsionskräfte zu ermitteln, sondern auch die Dynamik von Zelladhäsionsvorgängen und von Zelltrennungsvorgängen zu untersuchen.

## 7 Ausblick

Mit dieser Arbeit ist eine neue Basis für die Untersuchung von Adhäsionsmolekülen geschaffen worden, deren vielfältige Anwendungsmöglichkeiten nur erahnt werden können. Um diese Methode für alle Adhäsionsmoleküle zu verallgemeinern sind dabei allerdings zwei Hürden zu überwinden. Zum einen gilt es sehr restriktive experimentelle Bedingungen einzuhalten, da die Funktionalität der Zellen gewährleistet sein muß. Immerhin garantieren diese Bedingungen aber auch die optimalen Verhältnisse für die Funktion der zu untersuchenden Moleküle. Die zweite Schwierigkeit, deren Bewältigung sich lohnt, ist die Isolierung bestimmter Moleküle auf einer Zelle, um die Interferenzen mit anderen Adhäsionsmolekülen zu vermeiden. Dies ist sicherlich nur unter Einbeziehung gentechnologischer Verfahren möglich. Es wäre denkbar eine adhäsionsmolekülfreie Zelllinie zu finden und sie mit dem genetischem Code eines interessierenden Adhäsionsmoleküls zu transfizieren, um daran kraftspektroskopisch die Adhäsion zu charakterisieren. Die gesamte Palette von Untersuchungen bei verschiedenen Rahmenbedingungen wie pharmakologische Veränderungen des Mediums, verschiedene Oberflächen (inklusive Zelloberflächen) oder anderen Einflußgrößen steht dabei zur Auswahl.

Es wäre auch möglich bei geeigneter gentechnologischer Modifikation kraftspektroskopisch an Zellen ein bestimmtes Adhäsionsmolekül als Marker für einen intrazellulären Prozeß abzufragen und somit eine zellschonende, nicht-toxische Markierungsmethode zu entwickeln.

Selbst wenn dieser generelle Ansatz nicht verwirklicht werden kann, ist es doch möglich, vergleichend verschiedene Randbedingungen anhand der veränderten Zelladhäsion zu diversifizieren, wie z.B. in Abschnitt 4.5 gezeigt.

In Abb. 7.1 ist ein Kraftspektrum aller kalziumabhängigen Adhäsionsproteine, die in der vegetativen Phase aktiv sind, dargestellt.

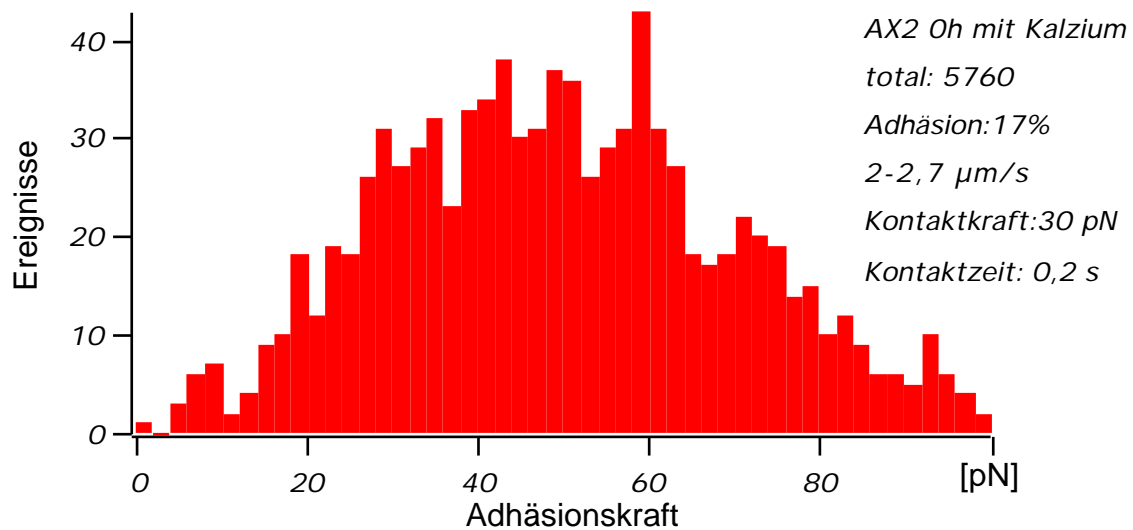


Abb. 7.1: Kraftspektrum der kalziumabhängigen Adhäsionsmoleküle (ohne csA) von vegetativen AX2-Zellen (*Dictyostelium discoideum*) aufgenommen in Phosphat Puffer.

Nach einer gewissen Fülle von kraftspektroskopisch untersuchten Zelladhäsionssystemen erhält man möglicherweise auch eine „Bibliothek“ solcher Kraftspektren, anhand der verschiedene Adhäsionsmechanismen oder Molekülkonstellationen typisiert werden könnten.

Das in Abschnitt 4.4 vorgestellte Modell zur Simulation der unabhängigen Bindungen ist sicher noch verbesserungsfähig und eventuell auf den Bereich der kooperativen Bindungen auszuweiten.

Die Möglichkeit der direkten Kombination aus Zellelastizitäts- und Adhäsionsmessungen (Abschnitt 4.2) erlaubt es, die Zusammenhänge von Adhäsionsmolekülen mit dem Zytoskelett eingehender zu studieren. Dadurch sind gerade in der Krebsforschung aber auch in vielen anderen Bereichen der Medizin und Biologie neue Erkenntnisse und methodologische Neuerungen zu erwarten. Besonders für die Pharmakologie sollte die Kraftspektroskopie an lebenden Zellen Wirkungszusammenhänge verschiedener Drogen sowohl analysieren, als auch zu deren Optimierung beitragen können, und dadurch eine Menge von Tierversuchen überflüssig machen.

---

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) G.M. Edelman, "Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis", *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 135-169 (1985).
- (2) M. Götz, A. Wizenmann, S. Reinhardt *et al.*, "Selective adhesion of cells from different telencephalic regions", *Neuron* **16** (3), 551-564 (1996).
- (3) M. Ruegg and L. Bixby, "Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction", *Trends Neurosci.* **21** (1), 22-27 (1998).
- (4) H.-W. Denker, "Implantation: a cell biological paradox", *Journal of Experimental Zoology* **266**, 541-558 (1993).
- (5) J.R. Graff, E. Gabrielson, H. Fujii *et al.*, "Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression", *J Biol Chem* **275** (4), 2727-2732 (2000).
- (6) B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Aufl. ed. (VCH, Weinheim, 1995).
- (7) R. V. Krstic, *Human microscopic anatomy: an atlas for students of medicine and biology*. (Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 1991).
- (8) V. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis *et al.*, *Molecular biology of the cell*, 3rd ed. (Garland Publishing Inc., New York, 1994).
- (9) A.D. Mehta, R.S. Rock, M. Rief *et al.*, "Myosin-V is a processive actin-based motor", *Nature* **400** (6744), 590-593 (1999).
- (10) T. Kreis and R. Vale, "Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins", (Oxford University Press, 1999).
- (11) D. G. Drubin and W. J. Nelson, "Origins of cell polarity", *Cell* **84** (3), 335-344 (1996).
- (12) E. Rodriguez-Boulan and W.J. Nelson, "Morphogenesis of polarized epithelial cell phenotype", *Science* **245**, 718-725 (1989).
- (13) H.-J. Gabius and S. Gabius, *Glycosciences: Status and Perspectives* (Chapman & Hall GmbH, Weinheim, 1997).
- (14) A. Villalobo and H.-J. Gabius, "Signaling pathways for transduction of the initial message of the glycode into cellular responses", *Acta Anat.* **161** (1-4), 110-129 (1998).
- (15) W. Dettmann, M. Grandbois, S. André *et al.*, "Differences in zero-force and force-driven kinetics of ligand dissociation from  $\alpha$ -galactoside-specific proteins (plant and animal lectins, immunoglobulin G) monitored by plasmon resonance and dynamic single molecule force microscopy", *Archives of Biochemistry and Biophysics* **383** (2), 157-170 (2000).
- (16) P. Lebrun, I. Mothe-Satney, L. Delahaye *et al.*, "Insulin receptor substrate-1 as a signaling molecule for focal adhesion kinase pp125(FAK) and pp60(src)", *J Biol Chem* **273** (48), 32244-32253 (1998).
- (17) A. Horwitz, K. Duggan, C. Buck *et al.*, "Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin - a transmembrane linkage", *Nature* **320** (April), 531-533 (1986).
- (18) R Brackenbury, "Cell adhesion molecules.", *Annual Reports in Medical Chemistry* **25**, 235-244 (1989).
- (19) C. H Damsky, *Cell-to-cell contact* (1989).
- (20) B Öbrink, "C-CAM (Cell-CAM 105) - a member of the growing immunoglobulin superfamily of cell adhesion proteins.", *BioEssays* **13**, 227-234 (1991).

- (21) A. F. Williams and N. A. Barclay, "The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition.", *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 381-405 (1988).
- (22) J. L. Salzer and D. R. Colman, "Mechanisms of cell adhesion in the nervous system: Role of the immunoglobulin gene superfamily.", *Dev. Neurosci.* **11**, 377-390 (1989).
- (23) M. Takeichi, "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.", *Science* **251**, 1451-1455 (1991).
- (24) M. Takeichi, "The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis.", *Development* **102**, 639-655 (1988).
- (25) M. Takeichi, "Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion.", *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 237-252 (1990).
- (26) M. Ozawa and R. Kemler, "Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex.", *J. Cell Biol.* **116**, 989-996 (1992).
- (27) S. Hirano, N. Kimoto, Y. Shimoyama *et al.*, "Identification of a neural catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organisation.", *Cell* **70**, 293-301 (1992).
- (28) J. Behrens, M. M. Mareel, F. M. Van Roy *et al.*, "Dissecting tumor invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion.", *J. Cell Biol.* **108**, 2435-2447 (1989).
- (29) W. Chen and B. Öbrink, "Cell-cell contacts mediated by E-cadherin (uvomorulin) restrict invasive behavior of L-cells.", *J. Cell Biol.* **114**, 319-327 (1991).
- (30) U. H. Frixen, J. Behrens, M. Sachs *et al.*, "E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cell.", *J. Cell Biol.* **113**, 173-185 (1991).
- (31) K. Vleminckx, J. R. L. Vakaet, M. Mareel *et al.*, "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumour cells reveals an invasion suppressor role.", *Cell* **66**, 107-119 (1991).
- (32) R. O. Hynes, "Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.", *Cell* **69**, 11-25 (1992).
- (33) S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg and P. E. F. Plow, "Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif.", *Trends Biochem. Sci.* **16**, 246-250 (1991).
- (34) P. Tapley, A. Horwitz, C. Buck *et al.*, "Integrins isolated from rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts.", *Oncogene* **4**, 325-333 (1989).
- (35) K. Drickamer, "Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins.", *J. Biol. Chem.* **263**, 9557-9560 (1988).
- (36) L. A. Lasky, "Lectin cell adhesion molecules (LEC-CAMs): a new family of cell adhesion proteins involved with inflammation.", *J. Cell. Biochem.* **45**, 139-146 (1991).
- (37) J. L. Marx, "New family of adhesion proteins discovered.", *Science* **243**, 1144 (1989).
- (38) S. D. Rosen, "The LEC-CAMs: An emerging family of cell-cell adhesion receptors based upon carbohydrate recognition.", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**, 397-402 (1990).
- (39) B. K. Brandley, S. J. Swiedler and P. W. Robbins, "Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules.", *Cell* **63**, 861-863 (1990).
- (40) J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 2nd ed. (Academic Press, New York, 1992).
- (41) T. Haltia and E. Freire, "Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins", *Bba-Bioenergetics* **1228** (1), 1-27 (1995).
- (42) T. M. Bayerl, C. F. Schmidt and E. Sackmann, "Kinetics of symmetric and asymmetric phospholipid transfer between small sonicated vesicles studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry, NMR, electron microscopy, and dynamic light scattering", *Biochemistry* **27**, 6078-6085 (1988).

- 
- (43) S. Sharma, S. Bharadwaj, A. Surolia *et al.*, "Evaluation of the stoichiometry and energetics of carbohydrate binding to Ricinus agglutinin: a calorimetric study", *Biochem. J.* **333**, 539-542 (1998).
- (44) H.A. Kramers, *Physica* **7**, 284 (1940).
- (45) P. Hänggi, P. Talkner and M. Borkovec, "Reaction-rate theory: fifty years after Kramers", *Rev. Mod. Phys.* **62** (2), 251-341 (1990).
- (46) S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera *et al.*, "Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex", *Biophys. J.* **72** (April), 1568-1581 (1997).
- (47) M. D. Ward and D. A. Hammer, "A theoretical analysis for the effect of focal contact formation on cell-substrate attachment strength", *Biophysical Journal* **64**, 936-959 (1993).
- (48) R. L. Yauch, D. P. Felsenfeld, S.-K. Kraeft *et al.*, "Mutational Evidence for Control of Cell Adhesion Through Integrin Diffusion/Clustering, Independent of Ligand Binding", *Journal of Experimental Medicine* **186** (8), 1347-1355 (1997).
- (49) M. D. Ward, M. Dembo and D. A. Hammer, "Kinetics of Cell Detachment: Peeling of Discrete Receptor Clusters", *Biophysical Journal* **67**, 2522-2534 (1994).
- (50) M. Rief, F Oesterhelt, B. Heymann *et al.*, "Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM", *Science* **275**, 1295-1298 (1997).
- (51) G Binnig, C.F. Quate and Ch Gerber, "Atomic force microscope", *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930 (1986).
- (52) J. Domke, S. Dannöhl, W. J. Parak *et al.*, "Substrate Dependent Differences in Morphology and Elasticity of Living Osteoblasts Investigated by Atomic Force Microscopy", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2000).
- (53) C. Rotsch and M. Radmacher, "Mapping local electrostatic forces with the atomic force microscope", *Langmuir* **13** (10), 2825-2832 (1997).
- (54) M. Ludwig, W. Dettmann and H.E. Gaub, "AFM imaging contrast based on molecular recognition", *Biophys. J.* **72**, 445-448 (1997).
- (55) D.J. Müller, D. Fotiadis, S. Scheuring *et al.*, "Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscopy", *Biophys. J.* **76**, 1101-1111 (1999).
- (56) T. W. Holstein, M. Benoit, G. von Herder *et al.*, "Fibrous mini-collagens in hydra nematocysts", *Science* **265**, 402-404 (1994).
- (57) H.-J. Butt and M. Jaschke, "Calculation of thermal noise in atomic force microscopy.", *Nanotechnology* **6** (1), 1-7 (1995).
- (58) E. L. Florin, M. Rief, H. Lehmann *et al.*, "Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope", *Biosensors Bioelectr.* **10** (9-10), 895 - 901 (1995).
- (59) M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt *et al.*, "Reversible unfolding of individual titin Ig-domains by AFM", *Science* **276**, 1109-1112 (1997).
- (60) M. Rief, M. Gautel, A. Schemmel *et al.*, "The mechanical stability of Immunoglobulin and Fibronectin III Domains in the muscle protein Titin measured by AFM", *Biophys. J.* **in Press** (1998).
- (61) M. Rief, H. Clausen-Schaumann and H.E. Gaub, "Sequence dependent mechanics of single DNA-molecules", *Nat. Struct. Biol.* **6** (4), 346-349 (1999).
- (62) V.T. Moy, E.-L. Florin and H.E. Gaub, "Intermolecular forces and energies between ligands and receptors", *Science* **266**, 257-259 (1994).
- (63) M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief *et al.*, "How Strong is a Covalent Bond ?", *Science* **283**, 1727-1730 (1999).

- 
- (64) M. Benoit, Th. Holstein and H.E. Gaub, "Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles", *European Biophysical Journal* **26**, 283-290 (1997).
- (65) E. Evans, "Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy", *Faraday Discussions* **111**, 1-16 (1998).
- (66) W. Dettmann, "Dynamische Kraftspektroskopie von einzelnen Rezeptor-Ligand Paaren zu Interaktionen von Zellen", Ph.D, LMU, 1999.
- (67) E. Evans and F. Ludwig, "Dynamic strength of molecular anchoring and material cohesion in fluid biomembranes", *J. Physics: Condens. Matter* **11**, 1-6 (1999).
- (68) R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung *et al.*, "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy", *Nature* **397**, 50-53 (1999).
- (69) A.S.G. Curtis, "the measurement of cell adhesiveness by an absolute method", *J. Embryol. exp. Morph.* **22** (3), 305-325 (1969).
- (70) O. Thoumine and A. Ott, "Biomechanical Properties of Fibroblasts", *Material Science of the Cell* **24** (10), 22-26 (1999).
- (71) S. C. Kuo, D. A. Hammer and D. A. Lauffenburger, "Simulation of Detachment of Specifically Bound Particles from Surfaces by Shear Flow", *Biophysical Journal* **73**, 517-531 (1997).
- (72) S. Chen and T.A. Springer, "An automatic breaking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear", *Journal of Cell Biology* **144** (1), 185-200 (1999).
- (73) N. John, M. Linke and H.-W. Denker, "Quantitation of human choriocarcinoma spheroid attachment to uterine epithelial cell monolayers", *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29 A**, 461-468 (1993).
- (74) G.I. Zahalak, W.B. McConnaughey and E.L. Elson, "Determination of cellular mechanical properties by cell poking, with an application to leukocytes", *J. Biomech. Eng.* **112**, 283-294 (1990).
- (75) E. Evans, R. Merkel, K. Ritchie *et al.*, *Picoforce method to probe submicroscopic actions in biomembrane adhesion* (Springer-Verlag, Berlin, 1994).
- (76) F. Ziemann, J. Rädler and E. Sackmann, "Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin. Networks using an oscillating magnetic bead micro-rheometer", *Biophys. J.* **66**, 2210-2216 (1994).
- (77) J. Dai and M.P. Sheetz, "Mechanical Properties of Neuronal Growth Cone Membranes Studied by Tether Formation with Optical Tweezers", *Biophysical Journal* **68**, 988-996 (1995).
- (78) M. D. Wang, H. Yin, R. Landick *et al.*, "Stretching DNA with Optical Tweezers", *Biophys. J.* **72**, 1335-1346 (1997).
- (79) M. Sato-Maeda, M. Uchida, F. Graner *et al.*, "Quantitative evaluation of tissue-specific cell adhesion at the level of a single cell pair", *Dev Biol* **162** (1), 77-84 (1994).
- (80) M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit *et al.*, "Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **in press** (2000).
- (81) G. Sagvolden, I. Giaver, E. O. Pettersen *et al.*, "Cell adhesion force microscopy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 471-475 (1999).
- (82) A. Razatos, Y.-L. Ong, M.M. Sharma *et al.*, "Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by AFM", *P.N.A.S.* **95**, 11059-11064 (1998).
- (83) M. Thie, R. Rösper, W. Dettmann *et al.*, "Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces.", *Hum. Reprod.* **13** (11), 3211-3219 (1998).



- (84) H. J. Butt, "Electrostatic interaction in atomic force microscopy", *Biophys. J.* **60** (4), 777-785 (1991).
- (85) H. J. Butt and M. Jaschke, "Thermal noise in atomic force microscopy", *Nanotechnol.* **6**, 1-7 (1995).
- (86) L.J. Wurzinger, P. Blasberg and H. Schmid-Schonbein, "Towards a concept of thrombosis in accelerated flow: rheology, fluid dynamics, and biochemistry", *Biorheology* **22** (5), 437-450 (1985).
- (87) C. F. Scott, "Mechanism of the participation of the contact system in the Vroman effect. Review and summary", *J Biomater Sci Polym Ed* **2** (3), 173-181 (1991).
- (88) H. Hertz, "Über die Berührung fester elastischer Körper", *J. Reine Angew. Mathematik* **92**, 156-171 (1882).
- (89) O. Müller, H. E. Gaub, M. Bärmann *et al.*, "Viscoelastic moduli of sterically and chemically crosslinked actin networks in the dilute to semidilute regime: measurements by an oscillating disk rheometer", *Macromolecules* **24** (11), 3111-3120 (1991).
- (90) J. H. Hoh and C.-A. Schoenenberger, "Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy", *J. Cell Sci.* **107**, 1105-1114 (1994).
- (91) J. Domke, C. Rotsch, P.K. Hansma *et al.*, "Atomic Force Microscopy of Soft Samples: Gelatin and Living Cells", in *ACS Symposium Series - Scanning Probe Microscopy of Polymers*, edited by B.D. Ratner and V.V. Tsukruk (American Chemical Society, Washington, DC, 1998).
- (92) K.S. Cole, "Surface forces of the Arbacia egg", *J.Cell.Comp.Physiol.* **1**, 1-9 (1932).
- (93) H. Spatz, L. Kohler and K.J. Niklas, "Mechanical behaviour of plant tissues: composite materials or structures?", *J Exp Biol* **202** (23), 3269-3272 (1999).
- (94) Y. C. Fung, *Biomechanics - mechanical properties of living tissues*, 2nd ed. (Springer, New York, 1993).
- (95) H. Abé, *Data book on mechanical properties of living cells, tissues, and organs* (Springer, Tokyo, 1996).
- (96) G.I. Bell, "Models for the specific adhesion of cells to cells", *Science* **200**, 618-627 (1978).
- (97) R. M. Hochmuth, H. C. Wiles, E. A. Evans *et al.*, "Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether, II. Experiment", *Biophysical Journal* **39**, 83-89 (1982).
- (98) R.M. Hochmuth, J.-Y. Shao, J. Dai *et al.*, "Deformation and Flow of Membrane into Tethers Extracted from Neuronal Growth Cones", *Biophysical Journal* **70**, 358-369 (1996).
- (99) E. Evans and K. Ritchie, "Dynamic strength of molecular adhesion bonds", *Biophys. J.* **72**, 1541-1555 (1997).
- (100) E. Evans, K. Ritchie and R. Merkel, "Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces", *Biophys. J.* **68**, 2580-2587 (1995).
- (101) D. Choquet, D. P. Felsenfeld and M. P. Sheetz, "Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages", *Cell* **88**, 39-48 (1997).
- (102) C. M. Suter, L. E. Errante, V. Belotserkovsky *et al.*, "The Ig Superfamily Cell Adhesion Molecule, apCAM, Mediates Growth Cone Steering by Substrate-Cytoskeletal Coupling", *The Journal of Cell Biology* **141** (1), 227-240 (1998).
- (103) M. Thie, P. Herter, H. Pommerenke *et al.*, "Adhesiveness of the free surface of a human endometrial monolayer as related to actin cytoskeleton", *Molecular Human Reproduction* **3** (4), 275-283 (1997).

- (104) D. P. Felsenfeld, D. Choquet and M. P. Sheetz, "Ligand binding regulates the directed movement of beta1 integrins on fibroblasts", *Nature* **383**, 438-440 (1996).
- (105) K.L. Moore, *Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen*, 3 ed. (Stuttgart, New York, 1991).
- (106) A. Psychoyos, *Nidation window: from basic to clinic* (Springer Verlag, New York, 1995).
- (107) M. Thie, B. Harrach-Ruprecht, H. Sauer *et al.*, "Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity", *European Journal of Cell Biology* **66**, 180-191 (1995).
- (108) C. M. Regen and A. F. Horwitz, "Dynamics of beta1 Integrin-mediated Adhesive Contacts in Motile Fibroblasts", *The Journal of Cell Biology* **119** (5), 1347-1359 (1992).
- (109) R.A. Patillo, A. Ruckert, R. Hussa *et al.*, "The JAR cell line- continuous human multihormone production and controls", *In Vitro* **6**, 398 (1971).
- (110) H. Kaltner and B. Stierstorfer, "Animal lectins as cell adhesion molecules", *Acta Anat.* **161** (1-4), 162-179 (1998).
- (111) K. Svoboda, C.F. Schmidt, D.. Branton *et al.*, "Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton", *Biophys. J.* **63**, 784-793 (1992).
- (112) W.C. Hwang and R.E. Waugh, "Energy of dissociation of lipid bilayer from membrane skeleton of red blood cells", *Biophysical Journal* **72**, 2669-2678 (1997).
- (113) F. Siegert and C.J. Weijer, "Three-dimensional scroll waves organize *Dictyostelium* slugs", *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (14), 6433-6437 (1992).
- (114) S. Bozzaro and G Gerisch, "Contact sites in aggregating cells of *Polysphondylium pallidum*. *J. Mol. Biol.*", **120** (265-279) (1978).
- (115) G Gerisch, "Spezifische Zellkontakte als Mechanismus der tierischen Entwicklung.", *Umschau* **13**, 392-395 (1965).
- (116) H Beug, F. E. Katz and G Gerisch, "Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*.", *J. Cell Biol.* **56**, 647-688 (1973).
- (117) K. Müller and G Gerisch, "A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium discoideum*.", *Nature* **274**, 445-449 (1978).
- (118) J Stadler, C Bordier, F Lottspeich *et al.*, "Improved purification and N-terminal amino acid sequence determination of the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*.", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* **363**, 771-776 (1982).
- (119) C.-H. Siu and R. K Kamboj, "Cell-cell adhesion and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*.", *Dev. Genet.* **11**, 377-387 (1990).
- (120) D. Gabriel, "Biophysikalische und zellbiologische Untersuchung des Zelladhäsionsproteins contact site A", Dissertation, Technische Universität, 1999.
- (121) M. A. J. Ferguson and A. F Williams, "Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidyl-inositol structures.", *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 285-320 (1988).
- (122) G. A. M Cross, "Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins.", *Annu. Rev. Cell Biol* **6**, 1-39 (1990).
- (123) J Stadler, T. G Keenan, G Bauer *et al.*, "The contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* carries a phospholipid anchor of a novel type.", *EMBO J.* **8**, 371-377 (1989).
- (124) F. W Putnam, Y.-S. V. Liu and T. L. K Low, "Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin.", *J. Biol. Chem.* **254**, 2865-2874 (1979).
- (125) P. Y Chou and G. D Fassman, *Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence.* (John Wiley, New York, 1978).

- (126) R. K Kamboj, J. Garipey and C.-H Siu, "Identification of an octapeptide involved in homophilic interaction of the cell adhesion molecule gp80 of *Dictyostelium discoideum*.", *Cell*, **59**, 615-625 (1989).
- (127) P.J. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules* (Hanser, München, 1988).
- (128) V. T. Moy, M. Rief, M. Ludwig *et al.*, "Characterization of the adhesive force between avidin functionalized AFM tip and biotin derivatized beaded agarose", *Int. Scanning Microscopy* **Vol 17**, 99-104 (1994).
- (129) H. Grubmüller, B. Heymann and P. Tavan, "Ligand binding: molecular mechanics calculation of the streptavidin- biotin rupture force", *Science* **271**, 997-999 (1995).
- (130) J Faix, G. Gerisch and A. A Noegel, "Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*.", *J. Cell Sci.* **102**, 203-214 (1992).
- (131) J Faix, "Gezielte Expression und Mutagenese des csA-Glykoproteins von *Dictyostelium discoideum* zur Untersuchung der strukturellen Voraussetzungen seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül.", Dissertation, Universität, 1993.
- (132) B. Heymann and H. Grubmüller, "AN02/DNP-hapten unbinding forces studied by molecular dynamics atomic force microscopy simulations", *Chem. Phys. Lett.* **303**, 1-9 (1999).
- (133) J. L. Hutter and J. Bechhoefer, "Calibration of atomic-force microscope tips", *Rev. Sci. Instrum.* **64** (7), 1868-1873 (1994).
- (134) C. Kittel, *Einführung in die Festkörperphysik*, 10 ed. (Oldenbourg, München, Wien, 1993).
- (135) J. D. Swalen, J. G. II. Gordon, M. R. Philpott *et al.*, "Plasmon surface polariton dispersion by direct optical observation", *Am. J. Phys* **48**, 669 (1980).
- (136) E. Kretschmann, "Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen", *Z. Physik* **241**, 313-324 (1971).
- (137) M. Cardona, "Fresnel Reflection and Surface Plasmons", *Am. J. Phys.* **39**, 1277 (1971).
- (138) A. Otto, "Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection", *Z. Phys.* **216**, 398-410 (1968).
- (139) C. Gerthsen, H.O. Kneser and H. Vogel, *Physik*, 12 ed. (Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1974).
- (140) S. Löfås, M. Malmqvist, I. Rönnerberg *et al.*, "Bioanalysis with surface plasmon resonance", *Sensors and Actuators* **5** (B), 79-84 (1991).
- (141) K. S. Johnston, S. R. Karlsen, C. C. Jung *et al.*, "New analytical technique for characterization of thin films using surface plasmon resonance", *Materials Chemistry and Physics* **42**, 242-246 (1995).
- (142) N. Bunjes, E.K. Schmidt, A. Jonzyk *et al.*, "Thiopeptide-supported lipid layers on solid substrates", *Langmuir* **13** (23), 6188-6194 (1997).
- (143) P. Schuck, "Kinetics of Ligand Binding to Receptor Immobilized in a Polymer Matrix as Detected with an Evanescent Wave Biosensor. I. A Computer Simulation of the Influence of Mass Transport", *Biophys. J.* **70**, 1230-1249 (1996).
- (144) B. Goldstein and M. Dembo, "Approximating the Effects of Diffusion on Reversible Reactions at the Cell Surface: Ligand-Receptor Kinetics", *Biophys. J.* **68**, 1222-1230 (1995).
- (145) K.M. Müller, K.M. Arndt and A. Plückthun, "Model and simulation of multivalent binding to fixed ligands", *Analytical Biochemistry* **261**, 149-158 (1998).
- (146) D. Gupta, H. Kaltner, X. Dong *et al.*, "Comparative cross-linking activities of lactose-specific plant and animal lectins and a natural lactose-binding immunoglobulin G fraction from human serum with asialofetuin", *Glycobiology* **6** (8), 843-849 (1996).

- (147) I. Okazaki, Y. Hasegawa, Y. Shinohara *et al.*, "Determination of the interactions between lectins and glycoproteins by surface plasmon resonance", *J. Mol. Recognit.* **8** (1-2), 95-99 (1995).
- (148) R. T. Lee, H.-J. Gabius and Y.-C. Lee, "Ligand binding characteristics of the major mistletoe lectin", *J. Biol. Chem.* **267** (33), 23722-23727 (1992).
- (149) Y. Shinohara, F. Kim, M. Shimizu *et al.*, "Kinetic measurement of the interaction between an oligosaccharide and lectins by a biosensor based on surface plasmon resonance", *Eur. J. Biochem.* **223** (1), 189-194 (1994).
- (150) Y. Shinohara, H. Sota, F. Kim *et al.*, "Use of a biosensor based on surface plasmon resonance and biotinyl glycans for analysis of sugar binding specificities of lectins", *J. Biochem.* **117** (5), 1076-1082 (1995).
- (151) B. Johnsson, S. Löfas and G. Lindquist, "Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran - modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors", *Anal. Biochem.* **198**, 268-277 (1991).
- (152) G Bertholdt, J Stadler, S Bozzaro *et al.*, "Carbohydrate and other epitopes of the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* as characterized by monoclonal antibodies.", *Cell Diff.* **16**, 187-202 (1985).
- (153) T. Lindl and J. Bauer, *Zell- und Gewebekultur* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994).
- (154) H. Kuramoto, S. Tamura and Y. Notake, "Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro", *Am. J. Obstet. Gynecol.* **114**, 1012-1019 (1972).
- (155) D.L. Way, D.S. Grosso, J.R. Davis *et al.*, "Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture", *In Vitro* **19**, 147-158 (1983).
- (156) J Fogh, *Human tumor cells in vitro* (Plenum Press, New York, 1975).

# Anhang

## Inhalt:

A	MATERIAL UND METHODEN.....	2
A.1	<i>Das Zelladhäsionskraftspektroskop.....</i>	2
A.2	<i>Beschichtungen und funktionale Oberflächen.....</i>	3
A.2.1	Metallschichtbedampfung.....	3
A.2.2	Plasmonenspektrometrie.....	3
A.3	<i>Kraftsensormodifikationen.....</i>	16
A.3.1	Abbrechen der Spitze und eines Federarmes.....	16
A.3.2	Kugeln kleben.....	17
A.3.3	Kraftsensorfunktionalisierung.....	18
A.3.4	JAR- oder SaOS-Zellen auf Kugeln am Kraftsensor:.....	20
A.4	<i>Zellen und Zellkulturtechniken.....</i>	21
A.4.1	Zellen zählen.....	21
A.4.2	Rote Blutkörperchen.....	21
A.4.3	Dictyostelium Discoideum Kultur.....	21
A.4.4	Mutanten von Dictyostelium Discoideum (G. Gerisch).....	22
A.4.5	csA Nachweis im Gel:.....	23
A.4.6	Kultivierung von Zelllinien [153].....	24
A.4.7	Verwendete Zelllinien.....	24
A.5	<i>Chemikalien, Lösungen und Medien.....</i>	25
A.5.1	Chemikalien und Lösungen.....	25
A.5.2	Medien.....	26
A.5.3	Medien und Lösungen der Zellkultur.....	26
A.5.4	Medien und Lösungen der Dictyostelium-Kultur.....	27
B	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	28
B.1	<i>Peptidcodeauswahl.....</i>	29
B.2	<i>Fachwörterauswahl.....</i>	29

## A Material und Methoden

### A.1 Das Zelladhäsionskraftspektroskop

Das verwendete Kraftspektroskop ist eine „langjährige Gemeinschaftsproduktion“ von M. Radmacher, M. Rief, M. Ludwig, und W. Dettmann. Wesentlich für die Ermöglichung von Zelladhäsionsmessungen sind die lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen (dadurch wird auch die Positionierung des Lasers erleichtert), die Erweiterung des Piezohubes auf 100  $\mu\text{m}$ , die Regelbarkeit von Temperatur und  $\text{CO}_2$ -Gehalt, die Möglichkeit in Petrischalen ( $\text{\O} 3,5 \text{ cm}$ ; 150318, Nunc, Roskilde, Dänemark) zu messen sowie die regelbar programmierte Kontrolle der Kontaktzeit und der Kontaktkraft (Abb. 0.1).

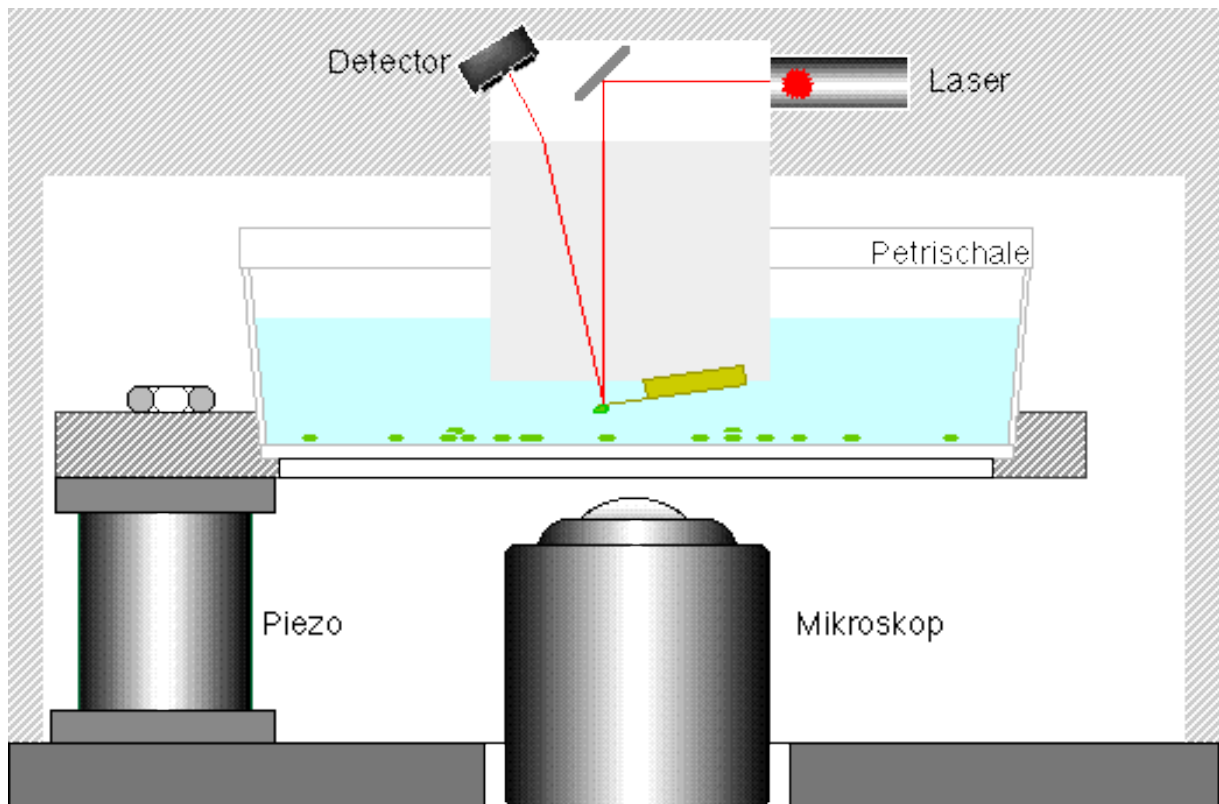


Abb. 0.1: schematischer Aufbau des Zelladhäsionskraftspektroskopes.

Die Daten des verstärkten und tiefpaßgefilterten ( $<20\text{-}100\text{kHz}$ ) Detektorsignals werden mit 4096 (12Bit) oder 32750 Datenpunkten (16Bit) aufgezeichnet. Außerdem kann bei langsamen Zuggeschwindigkeiten ( $<7\mu\text{m/s}$ ) vor dem Aufzeichnen eines Datenpunktes der Mittelwert aus mehreren Datenpunkten gebildet werden (oversampling), so daß je nach Geschwindigkeit, die Datenrate zwischen 0,5 und 20 kHz liegt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Igor Pro 3.0<sup>1</sup>. Zum Eichen des Kraftspektroskopes wird der Kraftsensor in Kontakt mit einem harten Substrat

<sup>1</sup> mit Makros von W.Dettmann und A.Wehe, LMU München

(Petrischale) gebracht und mit dem Piezo eine - durch einen eingebauten Dehnmeßstreifen bestimmte - Strecke weit ausgelenkt. Damit ist die Auslenkung des Kraftsensors in Abhängigkeit vom Detektorsignal definiert. Zur Bestimmung der Federkonstanten eines Kraftsensors, gemäß [57,58,133], wird das thermische Rauschspektrum des frei schwingenden Kraftsensors über den Bereich der ersten Resonanzfrequenz integriert und daraus dessen mittleres Auslenkungsquadrat  $\langle z^2 \rangle$  ermittelt. Durch Gleichsetzen der Federenergie  $1/2 k \cdot \langle z^2 \rangle$  dieser Resonanz mit der thermisch angeregten Energie  $1/2 k_B T$  dieses Freiheitsgrades erhält man die Federkonstante  $k$  des Kraftsensors mit etwa 10%-igem Fehler. Dieser Wert weicht häufig deutlich von den Angaben der Hersteller ab (Abb. 0.12).

## A.2 Beschichtungen und funktionale Oberflächen

### A.2.1 Metallschichtbedampfung

Titan Ti (# Ti006020/12, Goodfellow, Bad Nauheim, Germany), Titan- Vanadium TiV (# Ti256010/1, Goodfellow) und Kobalt-Chrom CoCr (#Co056010/1, Goodfellow) wurden aus Wolfram-Schiffchen (Balzers, München BD482000-T) thermisch auf Objektgläschen (# 990, Assistent, München, Germany) bis zu einer maximalen Filmdicke von 50nm verdampft. Während des Verdampfens bei ca  $2 \cdot 10^3$  Pa in einem Vakuumpumpstand<sup>2</sup> behielten die Objektgläschen Raumtemperatur. Für das Oberflächenplasmonenspektrometer wurden die Deckgläschen mit 1nm CoCr (zur Verbesserung der Goldhaftung auf dem Glas) und anschließend mit 49nm Gold bedampft.

### A.2.2 Plasmonenspektrometrie

Während dieser Arbeit wurde zusammen mit M. Stark ein Plasmonenspektrometer aufgebaut und mit diesem verschiedene Oberflächenfunktionalisierungen charakterisiert. Außerdem wurden Vergleichsmessungen zu Affinitätsbestimmungen von Lektinen auf terminale Glykoproteine untersucht [15]. Um die Methode Oberflächenplasmonenresonanz besser zu verstehen folgt eine kleine theoretische Einführung.

#### Theorie

Allgemein sind Plasmonen resonante Dichteschwankungen eines Plasmas [134]. Besteht das Plasma aus freien Elektronen im Leitungsband einer einige Nanometer dünnen (Halb-)Leiterschicht, spricht man von einem zweidimensionalen Oberflächenplasma. Die resonanten Dichteschwankungen heißen dann Oberflächen-Plasmonen-Resonanzen (Surface Plasmon Resonance) oder in Quanten ausgedrückt

---

<sup>2</sup> Aufbau von Carsten Loebbecke

plasmonische Oberflächen-Polaritonen (**Plasmon Surface Polariton**). Diese Resonanzzustände werden üblicherweise durch Photonen über Gitter- oder Prismenkopplung in Leitern erzeugt, können in einem Plasma aber auch durch Elektronen angeregt werden [135-137] und [138].

Zur hier verwendeten optischen Anregung mit Prismenkopplung strahlt man Photonen unter einem Winkel  $\vartheta_e$  zum Lot einer 50 nm dünnen Goldoberfläche ein. Der Wellenvektor  $\mathbf{k}_e$  des eingestrahnten Lichts  $I_e$  kann in zueinander senkrecht stehende Komponenten  $k_x$  (in der Grenzflächenebene) und  $k_z$  (in Lotrichtung) zerlegt werden (Abb. 0.2). Ist  $n_e$  der Brechungsindex des Prismas aus dem der Lichtstrahl einfällt, so betragen die  $\mathbf{k}_e$ -Komponenten an der Grenzfläche:

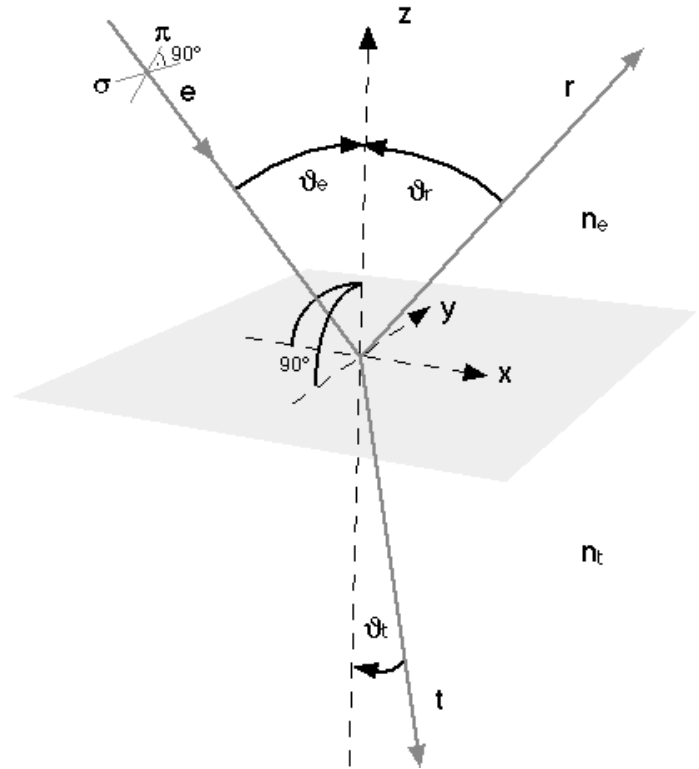


Abb. 0.2: Skizze zur Definition der Strahlbezeichnungen

$$k_x = n_e \sin \vartheta_e \frac{\omega}{c} \quad \text{und} \quad k_z = n_e \cos \vartheta_e \frac{\omega}{c} \quad (0-1 \text{ a,b})$$

mit der Dispersionsrelation  $\omega = c |\mathbf{k}|$  (0-1 a,b), der Lichtgeschwindigkeit  $c$  und der Frequenz  $\omega/2\pi$ . Ebenso werden die Polarisationsrichtungen aufgeteilt in  $\sigma$ -Polarisation, die so gewählt ist, daß sie wie die  $y$ -Achse in der Goldebene liegt und senkrecht dazu (in der  $x$ - $z$  Ebene) die  $\pi$ -Polarisation.

Die Intensität  $I_r$  des reflektierten Lichts wird mit den Fresnel'schen Gleichungen, die aus den Stetigkeitsbedingungen für das elektrische Feld  $\mathbf{E}$  der Maxwell'schen Gleichungen an Grenzflächen zweier Medien abgeleitet sind, beschrieben [139 10.2.5]. Für die  $\sigma$ -Polarisation gilt:

$$\sqrt{\frac{I_r}{I_e}} = \frac{E_r}{E_e} = \frac{n_e \cos \vartheta_e - n_t \cos \vartheta_t}{n_e \cos \vartheta_e + n_t \cos \vartheta_t} \quad (0-2)$$

und analog für die  $\pi$ -Polarisation:

$$\sqrt{\frac{I_r}{I_e}} = \frac{E_r}{E_e} = \frac{n_e \cos \vartheta_e \cos \vartheta_t - n_t \cos^2 \vartheta_e}{n_e \cos \vartheta_e \cos \vartheta_t + n_t \cos^2 \vartheta_e} \quad (0-3)$$



Dabei ist  $\theta_t$  der Winkel des transmittierten Lichtstrahls zum Lot auf die Grenzfläche. Mit dem Brechungsgesetz von Snellius ( $n_e \sin \theta_e = n_t \sin \theta_t$ ) werden (0-2) und (0-3) zu:

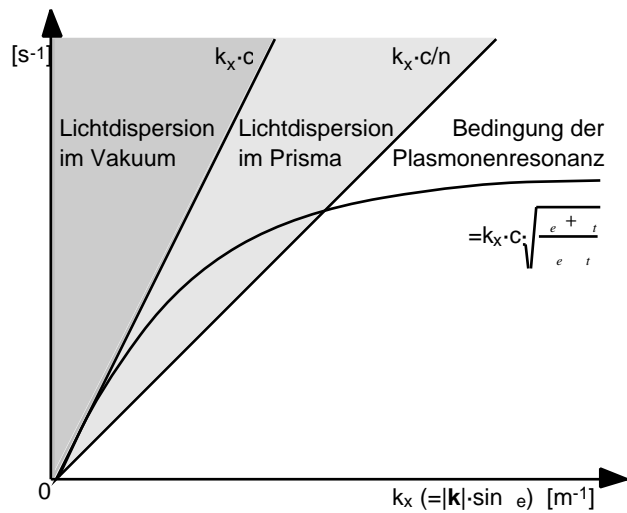
$$\frac{I_r}{I_e} = \left| \frac{\sin(\theta_t - \theta_e)}{\sin(\theta_e + \theta_t)} \right|^2 \quad \text{bzw.} \quad \frac{I_r}{I_e} = \left| \frac{\tan(\theta_e - \theta_t)}{\tan(\theta_t + \theta_e)} \right|^2 \quad (0-4a,b)$$

Anders als Glas und andere nichtleitende Dielektrika haben Metalle und viele andere (Halb-)Leiter bis hinauf in den Wellenlängenbereich sichtbaren Lichtes meist eine Dielektrizitätskonstante mit negativem Realteil (z.B.: Gold bei  $\lambda = 633 \text{ nm}$ :  $\epsilon = -14.4 + i1.43$ ). Sie sind stark reflektierend und absorbieren ab einer gewissen Dicke vollständig. Wegen ihres imaginären Brechungsindex ist das Phänomen des Grenzwinkels der Totalreflexion ( $\sin \theta_e = n_t / n_e$ ) nicht mehr definiert. Gleiches betrifft den Brewsterwinkel bei  $s$ -polarisiertem Licht (0-4b bei  $\theta_t + \theta_e = 90^\circ$ ) hier geht der Nenner gegen unendlich und die Intensität  $I_r$  des reflektierten Strahls verschwindet. In Metallen kann im Imaginären also auch  $\theta_t - \theta_e = 90^\circ$  erfüllt werden, dann sind  $\cos \theta_e = -\sin \theta_t$  und  $\tan \theta_e = -\frac{\sin \theta_e}{\sin \theta_t} = -\sqrt{\frac{\epsilon}{\epsilon_t}}$  (der reflektierte Strahl bekäme in (0-4b) unendliche Intensität, was auf einen Resonanzzustand deuten läßt) [137]. Mit diesen Bedingungen erhält man aus der Dispersionsrelation (0-1a) für die Komponenten von  $\mathbf{k}$ :

$$k_z = -\frac{1}{c} \sqrt{\frac{\epsilon - \epsilon_t + \epsilon_t}{\epsilon + \epsilon_t}} \quad \text{und} \quad k_x = -\frac{1}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_t}{\epsilon + \epsilon_t}} \quad (0-5a,b)$$

Setzt man dort die negativen Dielektrizitätswerte leitender Materialien ein, erhält man für die z-Komponente von  $\mathbf{k}$  meist imaginäre Größen während  $k_x$  einen realen Anteil bekommt und die Dispersionsrelation der Plasmonenresonanz (0-5b) darstellt [135]. Dies bedeutet, daß der reflektierte Strahl nur imaginär in der Grenzfläche propagiert und für die Anregung von Plasmonen absorbiert wird - und nicht etwa, wie oben angedeutet, unendlich wird. Die Methode der Vermessung dieser abgeschwächten Totalreflexion heißt daher ATR (Attenuated Total Reflection). Mittels Gleichung (0-1a,b) kann man unter Verwendung eines Prismas  $n_e$ ,  $\theta_e$  und  $\theta_t$  ( $=2 \theta_c$ ) so wählen, daß die Plasmonenresonanzbedingung (0-5b) erfüllt wird (Abb. 0.3). Für die Erzeugung von Plasmonen an Grenzflächen zu Lösungsmitteln der Brechzahl  $n_l > 1$  muß die Brechzahl des Prismas  $n_e$  entsprechend größer als  $n_l$  des umgebenden Mediums sein.

Abb. 0.3: Dunkelgrau ist der Wertebereich für die x-Komponente von  $\mathbf{k}$  in Abhängigkeit von der Frequenz im Vakuum dargestellt, hellgrau der Wertebereich für Einkopplung aus einem Prisma mit Brechzahl  $n$ . Die Kurve der Bedingung für Plasmonenresonanz (Gleichung (0-5b)) kann man demnach nur durch Einstrahlung aus einem optisch dichteren Medium (hellgrauer Bereich) erfüllen.



In  $z$  Richtung bleibt bei Plasmonenresonanz nur ein imaginäres, exponentiell abklingendes, evaneszentes Feld (Abb. 0.4):

$$E(z) = E(0) e^{-4 \sqrt{\frac{\epsilon_l - \epsilon_t}{\epsilon_l + \epsilon_t}} z} \tag{0-6}$$

wobei  $\epsilon_l$  durch  $\epsilon_t$  zu ersetzen ist, wenn hinter der dünnen Goldfläche statt Luft ein Medium der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_t$  vorliegt [140]. Dann gilt für die Plasmonenresonanzrelation:

$$k_x \frac{c}{\omega} = \sqrt{\epsilon_l} \sin_e = \sqrt{\frac{\epsilon_l - \epsilon_t}{\epsilon_l + \epsilon_t}} \tag{0-7}$$

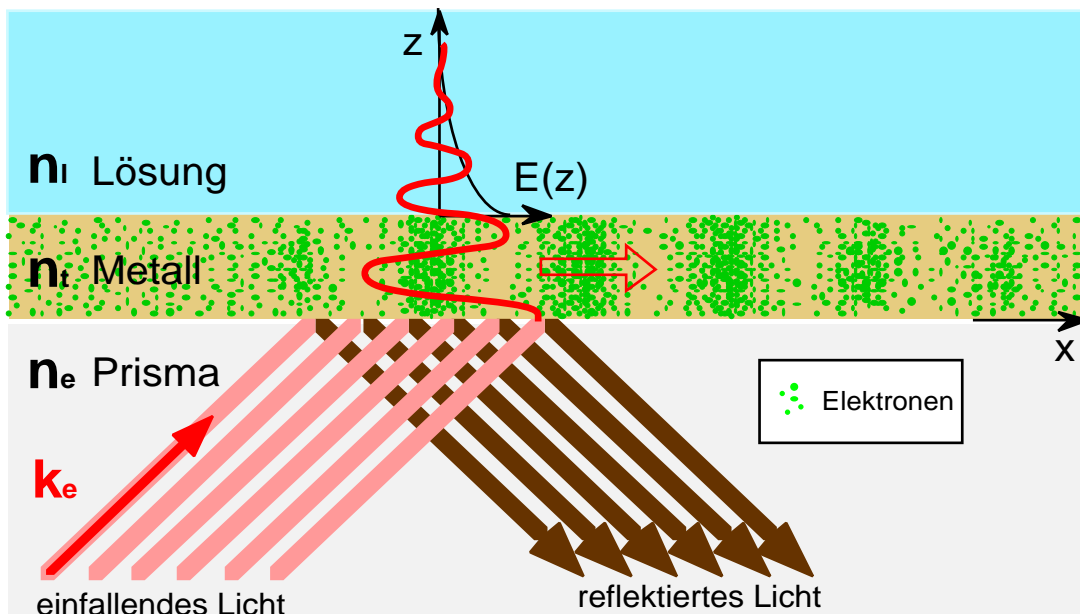


Abb. 0.4: das evaneszente Feld klingt über dem Ort der Totalreflexion exponentiell ab und evoziert bei geeigneter Größe der x-Komponente des Lichtwellenvektors  $\mathbf{k}_e$  eine transversale Dichtewelle der freien Elektronen in der dünnen Metallschicht - die Plasmonenresonanz.

Das bedeutet, die Plasmonen "sehen" das Medium außerhalb der Goldschicht. Dadurch ist die Plasmonenresonanz für etwaige Veränderungen der optischen Dichte "hinter" der Goldoberfläche empfindlich. In der Metallschicht wird die Ausbreitung der Resonanz als longitudinale Welle in x-Richtung proportional dem imaginären Anteil der Dielektrizitätskonstante gedämpft und in Wärme umgesetzt<sup>3</sup>. Für die Zerfallslänge  $L$  der Plasmonenresonanz in der x-y Ebene auf den e-ten Teil gilt:  $L = \frac{1}{2\text{Im}(k_x)}$  (für Gold:  $10\mu\text{m}$ )

Anwendung:

Zur Detektion der Oberflächenplasmonenresonanz betrachtet man den reflektierten Strahl in  $s$ -Polarisation und bestimmt das Minimum der Intensität in Abhängigkeit des Winkels bei fester Wellenlänge oder in Abhängigkeit der Wellenlänge bei festem Winkel. Sobald auf der Goldoberfläche im Bereich des evaneszenten Feldes eine Änderung der optischen Dichte ( $n \cdot z$ ) stattfindet, erfährt die Resonanz eine Dämpfung, die wiederum die Resonanzbedingung verschiebt. Auf diese Weise lassen sich Änderungen im Brechungsindex der Lösung hinter der Goldschicht oder Veränderungen in der Dicke einer dünnen Molekülschicht bei Kenntnis ihres Brechungsindex bestimmen. Je nach Winkel- oder Frequenz-Auflösung und Brechungsindex der dämpfenden Substanz sind Schichtdickenveränderungen von wenigen Ångström detektierbar.

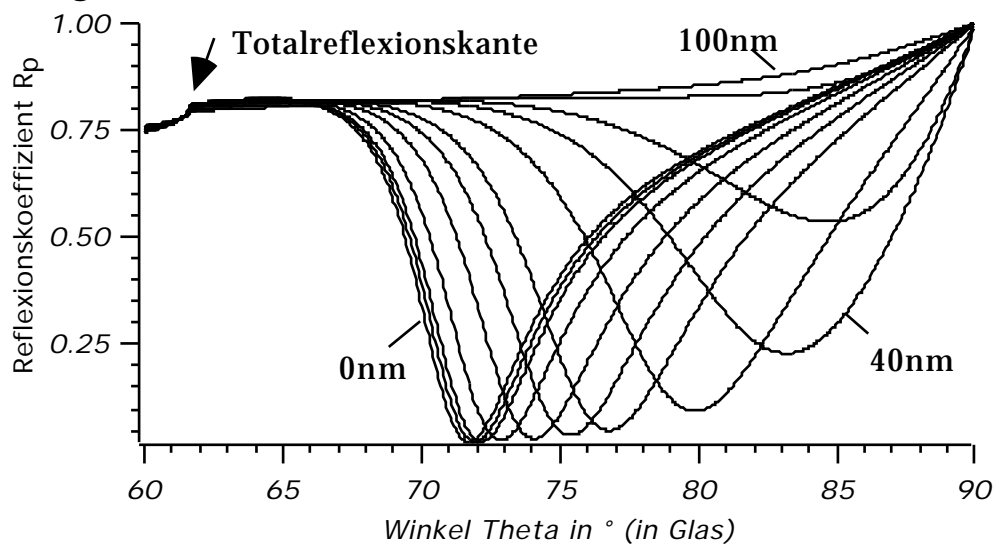


Abb. 0.5: Reflektivitätskurven für Schichten ( $n=1.5$ ) einer Dicke von 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75 und 100 nm auf einer Goldschicht von 50 nm Dicke in Wasser. Hier ist die Reflektivität der  $s$ -Polarisation gegen den Einstrahlwinkel des Lichts ( $\lambda=633\text{nm}$ ) aus einem Prisma ( $n=1,515$ ) dargestellt.

<sup>3</sup>Im Gegensatz zum strahlungslosen Zerfall des Plasmons in Wärme gibt es auch den strahlenden Zerfall in Photonen z.B. an Oberflächendefekten.

Zur Bestimmung der Schichtdicken bedient man sich einem Matrizenmultiplikationsformalismus [141], der analytisch nicht allgemein lösbar ist und daher numerisch<sup>4</sup> bearbeitet werden muß. Grob betrachtet ist die Winkeländerung proportional zur Änderung der optischen Dichte an der Goldoberfläche. Sie ist die Differenz der Brechungsindizes des Lösungsmittels ( $n_l$ ) und der Schicht ( $n$ ) und somit gilt näherungsweise:  $z \cdot (n - n_l)$  [142]. Eine analytische Näherungsformel wurde von Kretschmann angegeben [136].

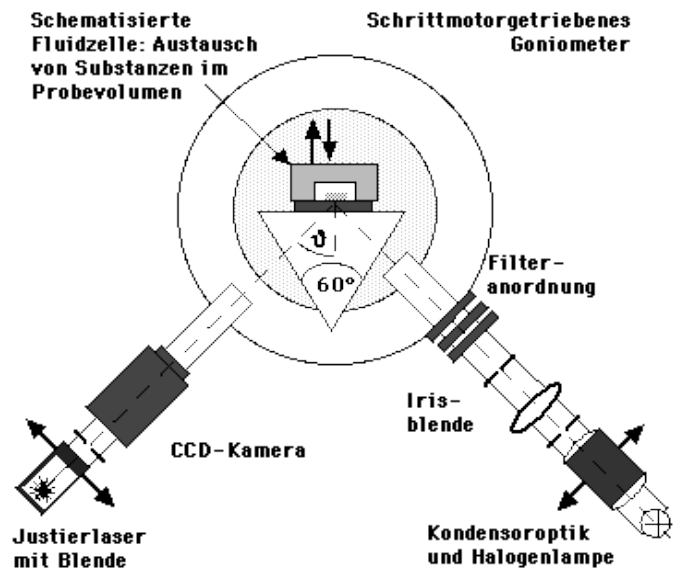
Die hier verwendeten Apparate sind in Kretschmannkonfiguration aufgebaut, arbeiten in Flüssigkeit und analysieren bei fester Wellenlänge ( $\lambda = 633\text{nm}$ ) die winkelabhängige Reflektivität der Goldschicht in  $s$ -Polarisation.

Abb. 0.5 zeigt die Verschiebung des Minimumswinkels der Reflektivität zu größeren Winkeln mit Zunahme der Schichtdicke, sowie die abnehmende Schwächung der reflektierten Intensität im Minimum durch die zunehmende Dämpfung. Der Grenzwinkel der Totalreflexion dagegen bleibt fest.

Zur hochaufgelösten Winkelbestimmung ( $0,005^\circ$ ) werden zwei Arme mit Lichtquelle und Detektor auf schritt-motorgetriebenen

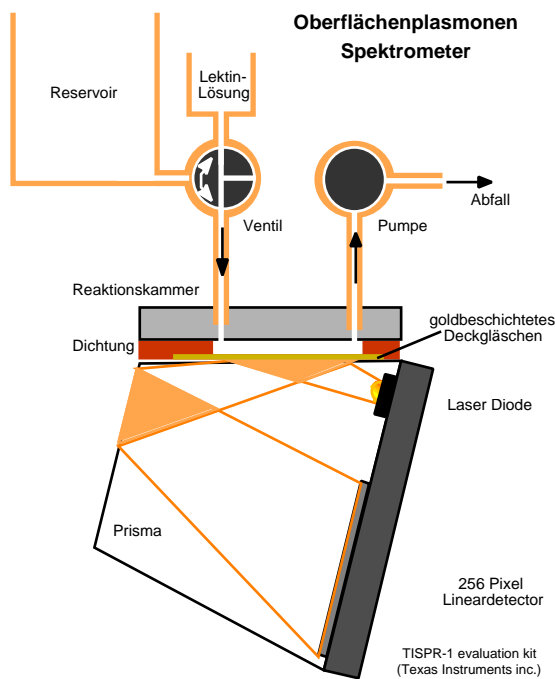
Goniometern so um das Prisma mit der Probe geführt, daß die sensitive Goldschicht immer im Reflexionszentrum und der Detektor im Zentrum des reflektierten Strahls liegt. Zur Verbesserung des Signals wird zum Vergleich die Reflektivität der  $s$ -Polarisation gemessen und daraus der Reflexionskoeffizient  $r = r_s / r_p$  bestimmt. Die Zeit zum Aufnehmen einer Resonanzkurve beträgt je nach

Auflösung zwischen 1 und 10 Minuten.



SPR Aufbau von M. Stark, MPI Martinsried

<sup>4</sup> nach einem Auswertungsprogramm von S. Peitinger, E22, TUM, Garching.



Mit einem anderen Aufbau (Abb. 0.6) mißt man ohne bewegte Teile bei geringerer Winkelauflösung ( $0,04^\circ$ ) aber höherer Zeitauflösung (3 Sekunden pro Kurve) instantan eine Schar von Winkeln und kann so die Geschwindigkeiten untersuchen, mit denen Moleküle auf Oberflächen adsorbieren, die durch die Reaktionskammer fließen oder schnelle Änderungen von Ionenkonzentrationen detektieren (Abb. 0.7), sofern sie die optische Dichte des Mediums verändern.

Abb. 0.6: Aufbau eines kommerziellen SPR-Meßinstrumentes ohne bewegte Teile.

### Schichtherstellung

Um Proteine funktional auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren, sind zwei wesentliche Punkte zu beachten: das Protein soll möglichst kovalent angekoppelt werden, es soll aber auch vor Kontakten mit der Festkörperoberfläche geschützt werden, um Konformationsänderungen, die die Funktionalität verändern könnten, zu vermeiden.

Zur kovalenten Kopplung an die Goldoberfläche haben sich Thiole als die geeignetsten Moleküle erwiesen. Die Schwefelatome schließen eine feste Brücke zu Goldatomen.

Die freien Enden der Thiole können zum Beispiel mit Carboxyl- ( $-\text{COO}^-$ ) oder Amino-gruppen ( $-\text{NH}_3^+$ ) funktionalisiert sein. In dieser Arbeit wurden im wesentlichen zwei Arten von Kopplungen verwendet:

#### Carboxyamylose Funktionalisierung:

Eine langkettige Carboxymethylamylose wurde mit EDC und NHS aktiviert, um an die Aminothiolen auf der Goldschicht zu binden. Nach einer etwa 10 minütigen Reaktionszeit sind im wesentlichen die Verbindungen der goldoberflächennahen Carboxylgruppen zu den Aminothiolen geschlossen. Nach Auswaschen der ungebundenen Amyloseketten wird das Protein, das untersucht werden soll, dazugegeben. Es verbindet seine Aminogruppe(n), die nach Möglichkeit nicht in der

Nähe des interessierenden Reaktionszentrums liegen<sup>5</sup>, mit den noch freien aktivierten Carboxylgruppen der Amylose. Auf diese Weise bildet sich möglicherweise ein Konzentrationsgradient der Proteine in der Amyloseschicht aus. Es ist aber gewährleistet, daß viele Proteine an der frei zugänglichen Oberfläche der Schicht sind und nur wenige in der Nähe der eventuell denaturierenden Goldoberfläche (siehe helle und dunkle Kreise, "Ligand B" in Abb. 0.8). Nach etwa einer Stunde werden die ungebundenen Proteine ausgewaschen und die Sensorschicht ist für einige Tage<sup>6</sup> einsatzbereit. (Siehe auch Anhang Seite 18)

#### Reaktionskinetik an einer Sensorschicht.

Die molekulare Betrachtungsweise des zeitlichen Verlaufs der Vorgänge in der Amyloseschicht auf dem Goldplättchen in Abhängigkeit der Konzentration des Liganden A ist in Abb. 0.8 dargestellt. Die Skizze soll verdeutlichen, welche Komponenten zur Erzeugung des Plasmonenspektrometersignals (Kurve 2) beitragen: Zunächst muß die Konzentration [a] auf ihren konstanten Sollwert ansteigen (Kurve 1), was je nach Zuleitungssystem, Flußrate und Volumen der Meßkammer relativ rasch (10-300sec) geschieht.

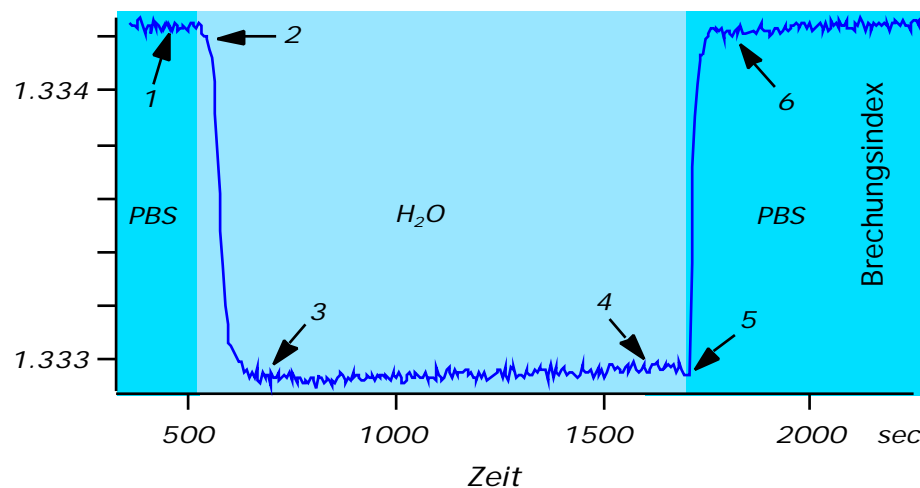


Abb. 0.7: Durchspülexperiment (0,1ml/min): 1: H<sub>2</sub>O Zufuhr wird geöffnet, 2: nach ca. 100 s ist H<sub>2</sub>O am Sensor und verdrängt das PBS bis 3 nach weiteren 200 s. Der Brechungsindex ändert sich dabei um 0,0012. Analog 4,5 und 6 für PBS.

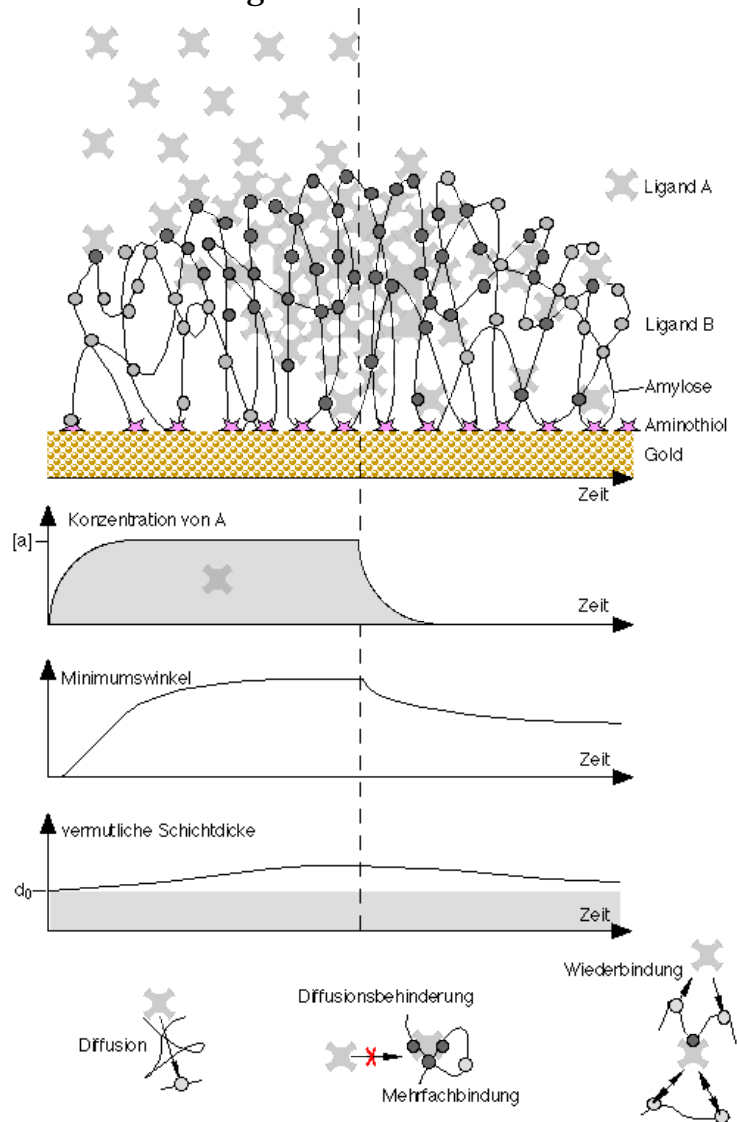
(In Abb. 0.7 dauert es 100 s bis das Totvolumen zwischen Ventil und Probenkammer ausgetauscht ist (1->2). Danach verdrängt das H<sub>2</sub>O die Salzlösung in etwa 200 sec, was an der Änderung des Brechungsindex verfolgt werden kann (2->3). Das Verdrängen des Wassers durch PBS (5->6) erfolgt etwas abrupter, da die Diffusion der Salzionen den Austauschprozeß unterstützt.) Beim Einspülen von Bindungspartnern A (Abb. 0.8) werden die an der Oberfläche liegenden Liganden B

<sup>5</sup> falls ein Reaktionspartner existiert, der nicht mit der aktivierten Carboxyamylose wechselwirkt kann dieser beigemischt werden, um die Bindungstasche zu schützen und anschließend wieder ausgewaschen werden.

<sup>6</sup> Vermessene Schichten waren nie älter als 5 Tage.

leicht erreicht und gebunden. Allerdings ist wegen der Entfernung dieser Bindungsstellen zur Goldoberfläche das gemessene Signal geringer als bei einem direkt an der Goldoberfläche bindenden Liganden A. Nach und nach werden die äußersten Bindungen besetzt und die Liganden diffundieren tiefer in die Schicht hinein. Dabei auftretende diffusionshemmende Ereignisse sind unten skizziert.

Abb. 0.8: Hier ist dargestellt wie ein Bindungskinetikexperiment auf molekularer Skala verlaufen könnte. Auf der Goldschicht sind sternförmig die Aminothiolen symbolisiert, an denen die Amyloseketten immobilisiert sind. Die runden Kreise an den Ketten sind die Proteine (Ligand B) mit zu untersuchender Affinität zum bei  $t=0$  eingespülten Liganden A, der durch einen Kreis mit vier Bindungsstellen andreas-kreuzartig symbolisiert ist. Unter dieser Skizze sind der zeitliche Verlauf der Konzentration  $[a]$  des Liganden A, der des Winkels der Plasmonenanregung und der der vermutlichen Schichtdicke durch Quellung durch Aufnahme des Liganden A dargestellt. Die gestrichelte Linie deutet den Zeitpunkt an, ab dem die Schicht gespült wird und der Ligand A die geschlossenen Bindungen (dunkle Kreise) wieder frei gibt.

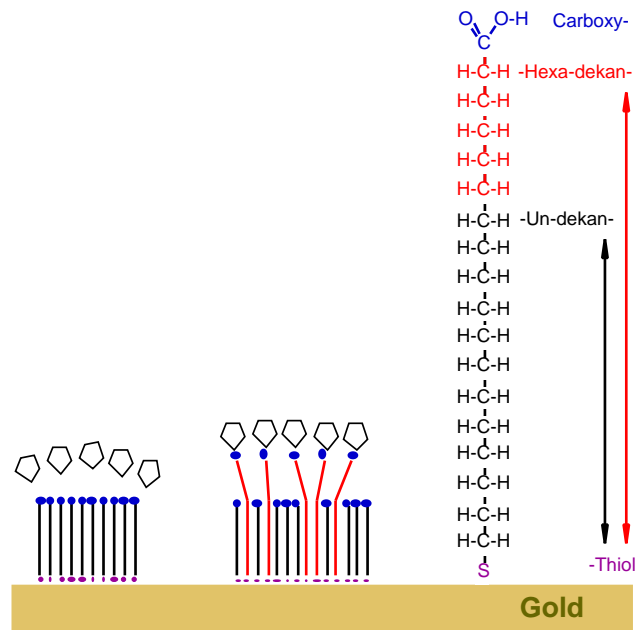


Das Anreichern von Liganden in der Tiefe der Schicht und ein eventuelles Quellen der Schicht erhöhen das Meßsignal weiterhin bis ein stationärer Zustand erreicht wird, oder die Konzentration  $[a]$  auf Null gesetzt wird. Nun lösen sich die äußeren Bindungen als erste wieder, dies verlangsamt das Abklingen der Konzentration. Durch erneutes Binden (rebinding) an der Oberfläche und in der Schicht wird das Herausdiffundieren stärker behindert als die Diffusion in die Schicht. Es ist offenbar sogar so, daß gerade große Moleküle die Schicht dadurch selbst nach Tagen noch nicht verlassen konnten. Auf diese Weise wird die Schicht trotz wiederholtem Spülen mit deutlichen pH-Wertänderungen nach jeder Messung irreversibel optisch dichter (dicker) und damit unsensibler (vergleiche Abb. 0.10 "RCA vorher und nachher").

### Mercapto-Polycarbonsäure Funktionalisierung:

Zur Vermeidung der Diffusion innerhalb der Schicht wurde eine Beschichtung der Goldoberfläche mit Hexadekan- oder Undekan-Thiolen (UDS und HDS) vorgenommen, deren freies Ende mit Carboxylgruppen versehen ist. Dadurch bildet sich eine mehr oder weniger homogene Monolage aus funktionalen "Spacern" aus. Möglicherweise wird die Aktivierung mit EDC und NHS bei zu perfektem Aufbau der Monolage behindert und kann durch Vermischung beider Thiole verbessert werden (Abb. 0.9).

Abb. 0.9: Eventuell erhöhte Zugänglichkeit der Carboxygruppen für die NHS-Moleküle (5-Ecke) durch Mischung zweier unterschiedlich langer Thiole zur Funktionalisierung der Goldschicht.



### Reaktionsgrundgleichungen

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion  $A+B \rightleftharpoons AB$  ist definiert über die zeitlichen Veränderungen der Konzentrationen  $[a]$ ,  $[b]$  und  $[ab]$  :

$$\frac{d}{dt}[ab]; \frac{d}{dt}[a]; \frac{d}{dt}[b] \quad (0-8)$$

Mit  $k_{on}$  als die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Bildung von AB aus A und B und  $k_{off}$  als die für deren Auftrennung in A und B, erhält man :

$$\frac{d}{dt}[ab] = -\frac{d}{dt}[a] = -\frac{d}{dt}[b] = k_{on}[a][b] - k_{off}[ab] \quad (0-9)$$

im Reaktionsgleichgewicht ist  $\frac{d}{dt}[ab] = 0$  und es ergibt sich die Gleichgewichtskonstante:

$$K = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[ab]}{[a][b]} \quad (0-10)$$

Im SPR Experiment sind mit B die gebundenen Moleküle in der Amylosematrix auf der Goldoberfläche, mit A deren Bindungspartner in der Lösung und mit AB der gebildete Komplex aus A und B in der Matrix bezeichnet.



Die Konzentration [a] kann durch geeigneten Experimentaufbau konstant gehalten werden, während die Konzentrationsänderung von [ab] unter obigen Einschränkungen näherungsweise proportional der Verschiebung des SPR-Minimums ist.

Durch Integration von (0-9 über t bei konstanter Konzentration [a] und geeignete Wahl der Integrationskonstanten erhält man unter Verwendung von  $[b]=[b]_0 - [ab]$ : für die Bildung von AB:

$$[ab] = \frac{[b]_0 * k_{on} * [a]}{k_{on} * [a] + k_{off}} \left( 1 - e^{-(k_{on}[a] - k_{off})t} \right), \quad [a] = const \quad (0-11)$$

und für deren Trennung:

$$[ab] = [ab]_0 * e^{-k_{off}t}, \quad [a] = 0 \quad (0-12)$$

Dabei bezeichnet  $[ ]_0$  die Konzentration zum Zeitpunkt  $t=0$

Somit kann man bei Kenntnis der Konzentration [a] durch exponentiellen Fit an den zeitlichen Verlauf des SPR-Minimums die  $k_{off}$  - (Exponent aus (0-12)) und  $k_{on}$  - Raten (Exponent aus (0-11)) von molekularen Wechselwirkungen unter obigen Einschränkungen ableiten.

Je schwerer ein gebundenes Molekül ist, desto stärker ist dessen Einfluß auf die SPR, da es in der Regel eine höher optische Dichte besitzt und einen stärkeren Schichtdichtenzuwachs bewirkt [142].

In dieser einfachen Betrachtungsweise der Konzentrationsverhältnisse werden Einflüsse des Molekulargewichtes auf die Diffusion jedoch nicht berücksichtigt.

Die Reaktion läuft außerdem nicht in freier Lösung ab und wird daher in der Regel durch Transporteffekte in der Amyloseschicht (s.o.) behindert [143]. In diesem Fall spielt das Molekulargewicht aber eine nachweisliche Rolle, da es über die Molekülgröße (Radius R) in die Diffusionsgeschwindigkeit v eingeht:

$$v = D * [c] \propto R * [c] \quad (0-13)$$

Man kann durch Einführen effektiver Reaktionskonstanten zum Reaktionspartner B in der Schicht solche Effekte zum Großteil erfassen [143,144]. Falls man bei Variation von [a] stark verschiedene Gleichgewichtskonstanten erhält, kann man auf beträchtlichen Einfluß von Diffusionsprozessen rückschließen.

Sobald ein Molekül mehrere Bindungsstellen (m) besitzt, wie z.B. ein Antikörper, (m=2) sollte die Anzahl der verfügbaren Bindungspartner B durch Mehrfachbindungen nach unten korrigiert werden, da die Massenerhaltung in Richtung  $A + xB = AB_x$  (mit  $1 < x < m$ ) verschoben ist [145].

## Messungen von Reaktionskinetiken

Beispiel: Bestimmung der Affinität verschiedener Lektine auf ASF und LAC

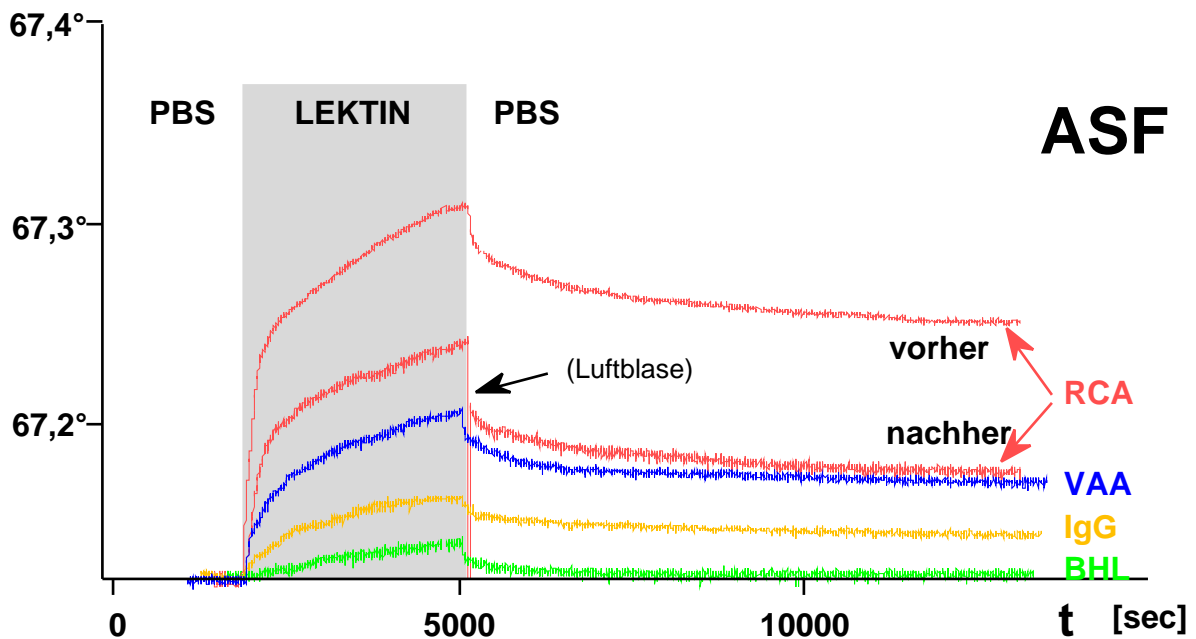


Abb. 0.10: Auftragung des Winkels der Plasmonenresonanz gegen die Zeit zur Bestimmung von  $k_{on}$  - und  $k_{off}$  verschiedener Lektine auf einem mit ASF funktionalisierten Sensor.

In Abb. 0.10 sind die Verlaufskurven der Minimumswinkel verschiedener Lektine und eines Antikörpers auf Asealofetuin (ASF) geplottet. Dabei wurde Ricinusagglutinin (RCA) am Anfang sowie am Ende der Meßreihe vermessen, um die Degradation der Sensorschicht zu überprüfen. Deutlich zu erkennen ist die verminderte Empfindlichkeit der Schicht, da die Amplitude des RCA Signals nach dem Experiment signifikant niedriger ausfällt. Auf den Exponentialverlauf der Kurve hat dies jedoch wenig Einfluß, so daß die Messwerte zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten (Tabelle 0.1) übernommen werden können. Analog ist in Abb. 0.11 der Verlauf der Minimumswinkel der Lektine auf Laktose dargestellt. Dabei ist das extrem starke RCA Signal gegenüber den anderen Substanzen auffällig. Verglichen mit den Daten aus den ASF-Experimenten ist das Signal jedoch etwa dreimal schwächer. Offenbar ist die Laktose als Rezeptor weniger effektiv auf die Testsubstanzen. Dies kann an der molekularen Struktur der beiden Glykoproteine liegen: Das ASF ist ein triantennäres Molekül, das nochmals brokkoliartig dreifach aufgefähert ist, so daß an den neun Antennenenden Lektinbindungsstellen [146] in Form von N-Acetyllactosamin (Lac-N-Ac) vorliegen. Während die Laktose nur eine Bindungsstelle darstellt, und damit die Empfindlichkeit der Schicht deutlich niedriger ist.

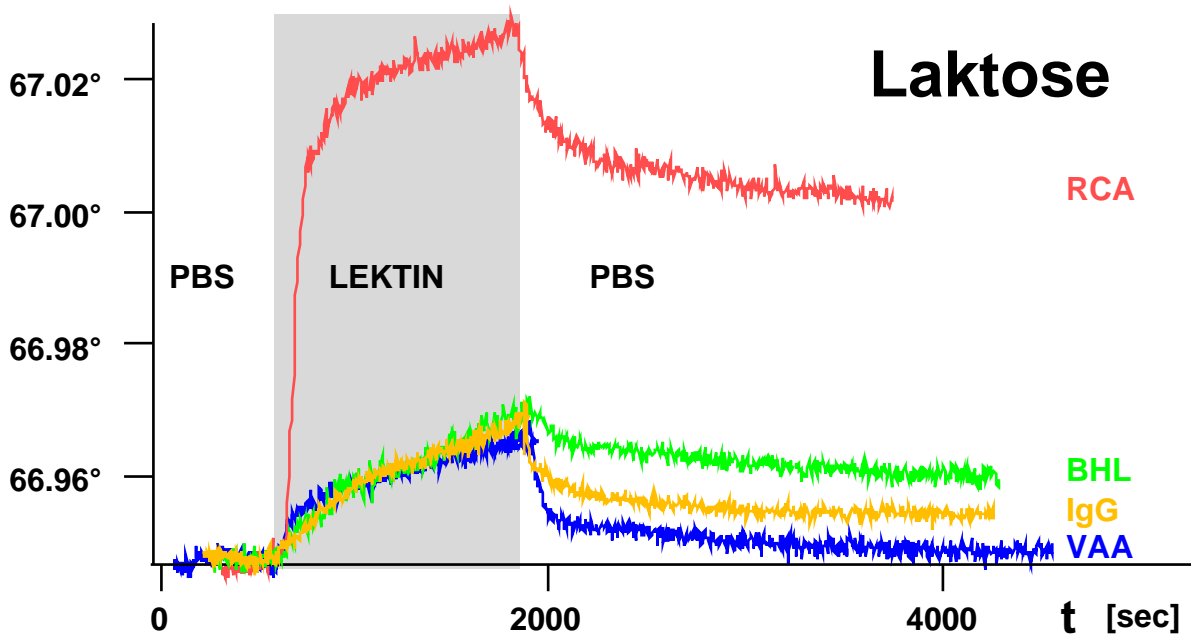


Abb. 0.11: Auftragung des Minimumswinkels der Plasmonenresonanz gegen die Zeit zur Bestimmung von  $k_{on}$  - und  $k_{off}$  verschiedener Lektine auf einem laktosefunktionalisierten Sensor.

In der Tabelle 0.1 sind die insgesamt acht Wechselwirkungen mit ihren Bindungskonstanten zusammengestellt.

#### ASF

	off-Rate [ $s^{-1}$ ]		on-Rate [ $mols^{-1}$ ]		K [ $mol^{-1}$ ]	
BHL	0,00119	$\pm 0,00043$	24000	$\pm 5800$	4,00E-08	$\pm 1,53E-08$
LAK	0,00056	$\pm 0,00003$	132000	$\pm 19400$	2,12E-08	$\pm 1,15E-08$
RCA	0,00107	$\pm 0,00039$	28000	$\pm 7700$	3,58E-08	$\pm 9,13E-09$
VAA	0,00128	$\pm 0,00006$	31000	$\pm 3100$	4,13E-08	$\pm 3,06E-09$

#### Lactose

	off-Rate [ $s^{-1}$ ]		on-Rate [ $mols^{-1}$ ]		K [ $mol^{-1}$ ]	
BHL*	0,0005	$\pm 0,0002$	? $\pm 00$		? ,00E-08	$\pm ? ,00E-00$
LAK	0,0006	$\pm 0,0003$	729000	$\pm 00$	8,81E-10	$\pm ? ,00E-00$
RCA	0,0016	$\pm 0,0004$	117000	$\pm 161900$	6,02E-08	$\pm 3,99E-08$
VAA*	0,0011	$\pm 0,0002$	? $\pm 00$		? ,13E-08	$\pm ? ,00E-00$

Tabelle 0.1: „Die Tabelle der acht Wechselwirkungen“ (\*die Daten für die on-Raten sind noch auf der Festplatte des momentan kaputten Meßrechners „Lisa Plasmona“)

Im Vergleich zu den parallel durchgeführten Messungen der Bindungsstärken mit dem Kraftmikroskop liegen die hier gemessenen off-Raten deutlich niedriger.

Allerdings sind sie soweit bekannt mit anderen Plasmonenspektrometrischen Messungen vergleichbar [147-150].

Woraus - wie aus der Quantenmechanik bekannt - wieder einmal deutlich wird, daß das Messergebnis stark von der Art der Messung beeinflusst wird. Alle Messungen von Bindungskonstanten und -Kinetiken sowie deren Molekulardynamik-Simulationen beleuchten verschiedene Aspekte der Bindung. Denn die Bindung wird immer in einem anderen Kontext betrachtet: Moleküldynamikrechnungen wurden meist ohne Wasser in der Umgebung durchgeführt, und betrachten Zeitskalen im Bereich von Femtosekunden. Kalorimetrische Messungen vermessen Energiebilanzen an völlig freien Molekülen, während plasmonenspektrometrische Messungen immobilisierte Moleküle untersuchen. Die kraftspektroskopischen Messungen legen zusätzlich eine äußere Last an die Bindung an und beleuchten dadurch Kraftverhältnisse tief in der Bindungstasche [15].

### A.3 Kraftsensormodifikationen

Die zur Zelladhäsionskraftspektroskopie verwendeten Kraftsensoren werden mit unterschiedlichen Federkonstanten (Abb. 0.12) hergestellt, und sind wie in Kapitel 3 erwähnt modifiziert worden um Zellen besser darauf immobilisieren zu können und möglichst geringe Federkonstanten zu erhalten.

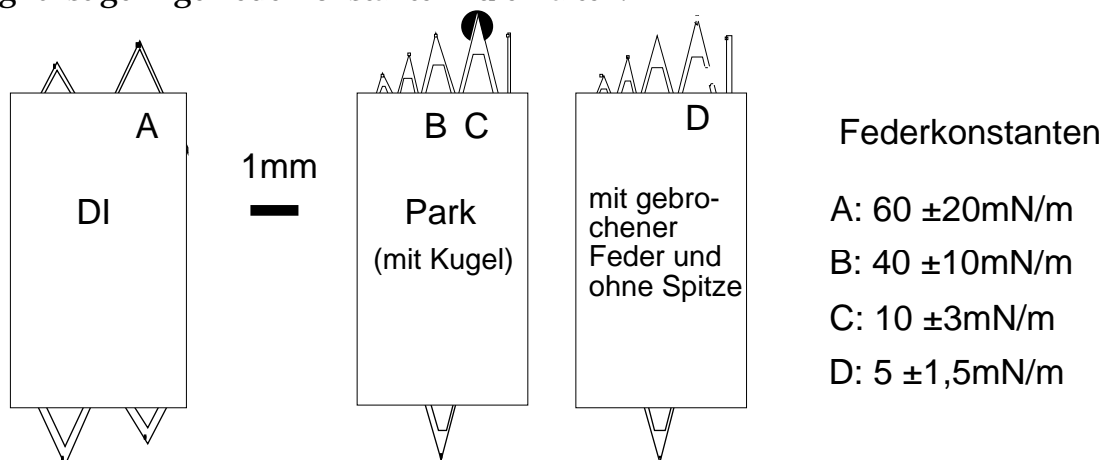


Abb. 0.12: Die Herstellerangaben der Federkonstanten der verwendeten Kraftsensoren von DI (Digital Instruments, Santa Barbara) und PSI (Park Scientific Instruments, Santa Clara, Kalifornien, USA) und deren aus eigenen Messungen bestimmten Abweichungen (die Federkonstante von D ist nicht vom Hersteller angegeben und C wurde ohne Kugel bestimmt.)

#### A.3.1 Abbrechen der Spitze und eines Federarmes

Mit einer speziell angefertigten Pinzette können die Spitze und der Federarm eines Kraftsensors unter einem Vergrößerungsglas (50x) durch die scherende Bewegung der Pinzettenspitzen beim Zusammendrücken abgebrochen werden (Abb. 0.13).

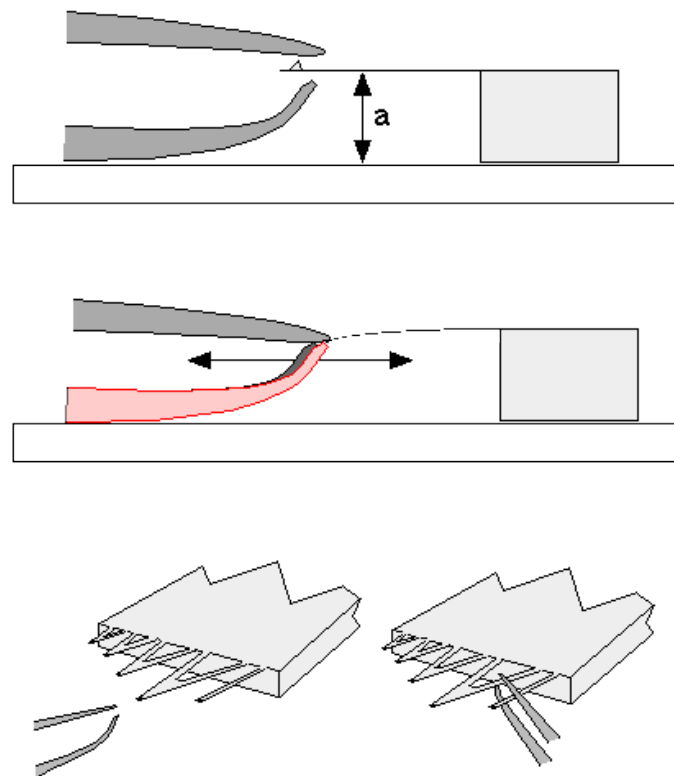


Abb. 0.13: Destruktive Modifikation der Kraftsensoren zur besseren Verwendbarkeit für Zelladhäsionsmessungen.

### A.3.2 Kugeln kleben

Die Messungen der Zelladhäsion sind mit modifizierten Kraftsensoren durchgeführt worden. An die Spitze der Blattfeder sind Sphacryl (Sphacryl-S-1000, Pharmacia, Freiburg) oder Glaskugeln (G 4649, Sigma) mit einem Durchmesser von ca. 70  $\mu\text{m}$  angeklebt worden (UHU plus endfest, 45 min bei 110°C ausgehärtet). Wie in Abb. 0.14 skizziert, wird zunächst eine Reihe Kraftsensoren auf Glasobjektträgern (0656; Roth, Karlsruhe) neben einem eintrocknenden Tropfen von zuvor in Alkohol emulgierten Kügelchen positioniert. Durch geschicktes Stapeln der Objektträger, die sich möglichst auf einer schwarzen Unterlage befinden, kann erreicht werden, daß die eingetrockneten Kügelchen in der selben Fokusebene sind, wie die Kraftsensorfederchen. Mit einer fein ausgezogenen Pipettenspitze ( $\varnothing$  20-50 $\mu\text{m}$ ) wird in den frisch angerührten Zweikomponentenkleber eingetaucht und am sauberen Objektgläschen überschüssiger UHU vorsichtig abgestreift (Abb. 0.14 von rechts oben nach links unten). Die Oberflächenspannung zieht nach kurzer Zeit den zähen Klebstoff auf der dünnen Kapillare zu kleinen perlenschnurartig aufgereihten Tröpfchen zusammen, die nun an den Spitzen der Kraftsensoren plziert werden. Anschließend wird mit einer Kanüle (0,4x20mm, 04657705; Braun, Melsungen) versucht eine getrocknete Kugel durch elektrostatische Adhäsion zu fischen und auf einer Kraftsensortspitze anzukleben (Abb. 0.14 von links oben nach rechts unten). Der

UHU zieht die Kugel aufgrund seiner hohen Oberflächenspannung von selbst in die Mitte des Tropfens.

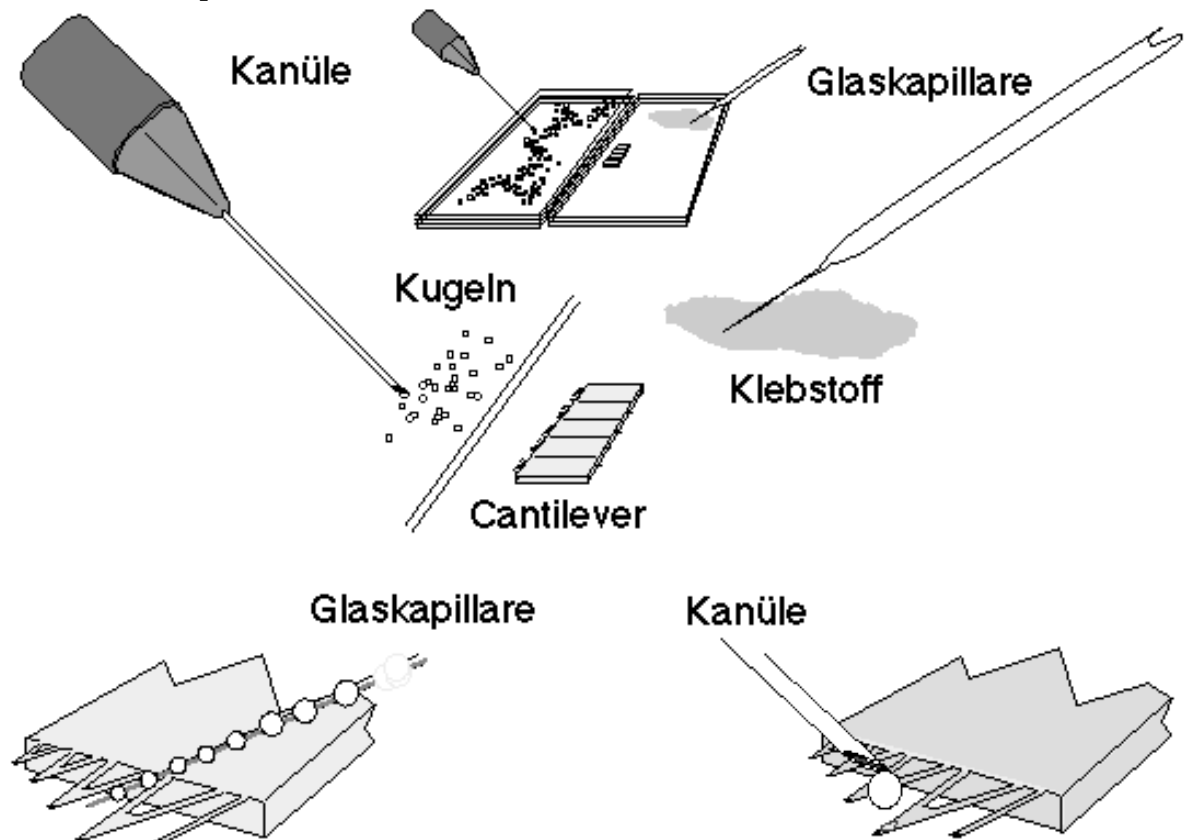


Abb. 0.14 Skizze des Klebevorganges für Kugeln am Kraftsensor (nach R. Röspel, Uniklinikum Essen)

### A.3.3 Kraftsensorfunktionalisierung

In 70% Ethanol für 2 h sterilisierten Sephacryl- oder Glaskugeln wurden unspezifisch mit BSA (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS) inkubiert, oder nach dem folgenden Protokoll, mit Fibronectin funktionalisiert [15]. Analog werden die spitzenlosen Sensoren mit  $\text{NH}_2$ , Polyaldehyd mit oder mit Lektinen funktionalisiert.

In Abb. 0.15 ist die schematische Darstellung der Funktionalisierung des Kraftsensors gezeigt. Das Protokoll dafür wurde in Zusammenarbeit mit M. Grandbois und W. Dettmann analog der Funktionalisierung der SPR- Sensorchips der Firma Biacore abgeleitet [151]. Die Oberfläche des Kraftsensors aus  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ist mit einer dünnen Schicht aus Siliziumoxid (=Glas) überzogen. Im ersten Schritt der Funktionalisierung werden bei der Silanisierung die  $\text{NH}_2$ -Gruppen des Aminosilans kovalent an die OH-Gruppen der Siliziumoxid Schicht angebunden. Die kovalente Anbindung der Amylose die pro Zuckermonomer eine Carboxy- Gruppe ( $\text{COO}^-$ ) aufweist, erfolgt über die Katalysatoren für die Bildung von Amidbindungen, NHS und EDC. Über die noch freien Aktivester können Proteine mit einer freien Aminogruppe angebunden werden (Abb. 0.15):

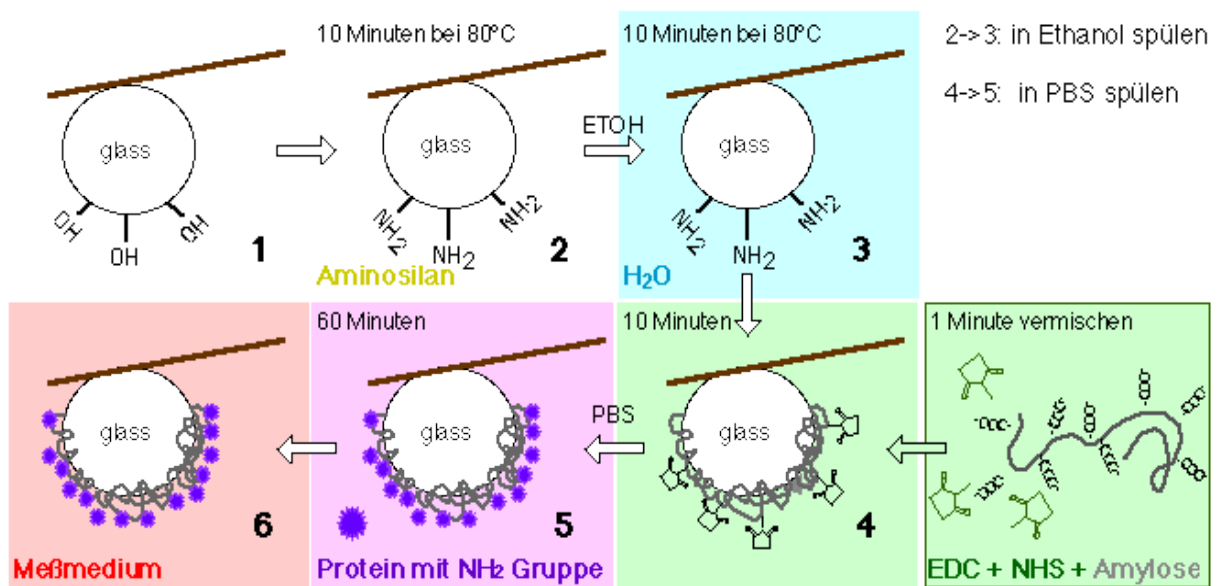


Abb. 0.15: Schematisierte Funktionalisierung eines Kraftsensors mit Glaskugel.

### 1. Aminosilanisierung<sup>7</sup> (im Abzug-giftig!)

Einlegen der Kraftsensoren<sup>8</sup> für 10 min in 80°C Aminosilan (pur), anschließend in Ethanol schwenken und für 10 min in 80°C Millipore Reinstwasser (Millipore, Molsheim) einlegen und abschließend trocknen.

### 2. kovalente Anbindung der Amylose

Lösung aus 10 mg/ml Carboxymethylamylose, 2-10 mg/ml NHS<sup>9</sup>, und 10 mg/ml EDC in PBS für eine Minute mischen, bevor für 8-10 min die silanisierten Kraftsensoren eingelegt werden. Anschließend kurz aber gründlich in PBS spülen, um die nicht angebundene Amylose wegzuspülen.

### 3. kovalente Anbindung der Proteine

Um die Aktivität der aktivierten Carboxyamylose nicht zu verlieren sollten die Zeitangaben genau eingehalten werden, bevor nun der Kraftsensor für mindestens 1 Stunde in eine PBS-Lösung mit etwa 10 µmol Protein gelegt wird. Anschließend mehrmals in PBS spülen und in frischer PBS Lösung aufbewahren. Alle verwendeten Proteine (WGA, Laktose<sup>10</sup> mit NH<sub>2</sub>-Rest, ASF<sup>10</sup> und FN) und auch das Polyaldehyd wurden mit dieser Methode kovalent an die Carboxy-Methyl-Amylose gekoppelt.

Das für die Zelladhäsionsmessungen verwendete Fibronectin ist ebenfalls bei einer Konzentration von 0.5 mg/ml an die ebenso präparierten - an den Kraftsensor geklebten - Glaskugeln, kovalent angebunden worden.

<sup>7</sup> Zur Funktionalisierung von Goldoberflächen wird statt mit Silanen analog mit Aminothiol (2-Mercaptoethylamin) bei Raumtemperatur gearbeitet und anschließend mit 2. weiterverfahren.

<sup>8</sup> Diese Prozedur eignet sich nicht für Sephacyrkugeln!

<sup>9</sup> Über die Konzentrationen von EDC und NHS kann Einfluß auf die Länge der ungebundenen Amylose-Ketten genommen werden (weniger NHS bedeutet längere freie Amylosesequenzen).

<sup>10</sup> Laktose und ASF wurden nur im Plasmonenspektrometer an das Gold gekoppelt.

### Polyaldehyd<sup>11</sup>

1.28 g Natrium Periodat ( $\text{NaIO}_4$ ) in 100 ml Millipore Wasser mit 100 mg Dextran (10 bis 40 kDa) bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß ca. 8h rühren.

Eine der zwei C-C Bindungen der Glucose Monomere des Dextrans, die nicht direkt am Polymerrückgrat hängen, wird durch die oxidative Wirkung des Natrium Periodat zu Aldehydgruppen gespalten. Durch Zugabe von Isopropanol oder anderen Alkoholen erfolgt die Ausfällung des Polyaldehydes, man gibt mehrmals etwa 200 ml des Alkohols unter Rühren zu und dekantiert den Überstand, wenn schließlich die Polyaldehyd Lösung stark angereichert ist geht man zweckmäßigerweise dazu über, das ganze zu zentrifugieren um anschließend das abgesetzte Polyaldehyd zwischen zwei Lagen Filterpapier durch Druck trockenzipressen. Abschließend wird das Polyaldehyd in einem gefalteten Stück Filterpapier mit Stickstoff endgültig trockengeblasen und kann dann im Gefrierschrank einige Wochen lang gelagert werden.

#### A.3.4 JAR- oder SaOS-Zellen auf Kugeln am Kraftsensor:

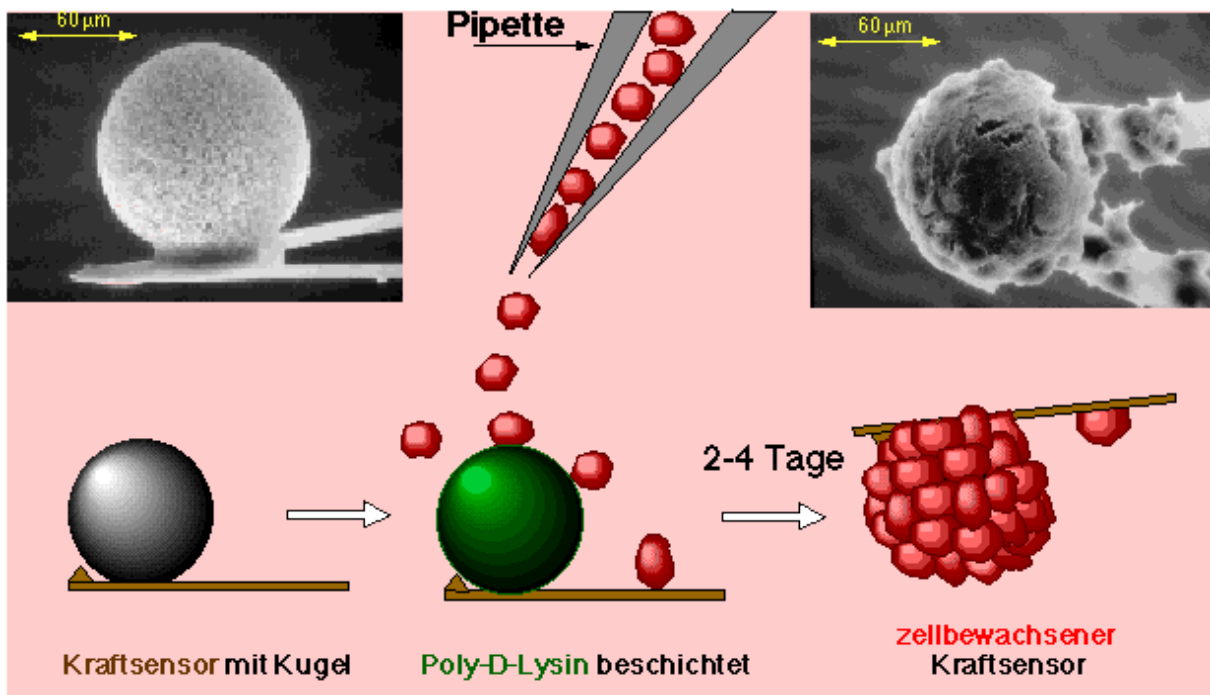


Abb. 0.16: Kraftsensorfunktionalisierung mit einem Zellrasen auf einer Kugel<sup>12</sup>.

Sterilisierte (70% Ethanol für 2 Stunden) Sphacryl- oder Glaskugeln werden unspezifisch mit Poly-D-Lysin (0,01% PBS- Lösung), als Beschichtung für die Zellkultur von Zellen inkubiert [83], in Medium steril mit der Kugel nach oben einzeln in Multiwellplates oder Petrischalen plaziert. Anschließend werden sie mit

<sup>11</sup> nach M. Grandbois, Missouri und M.Kessler, LMU München

<sup>12</sup> nach R. Röspel, Uniklinikum Essen.



JAR/SaOS-Zellen geimpft (Abb. 0.16) und täglich je nach Zellbewuchs nachgeimpft oder bei Konfluenz der Zellschicht auf der Kugel im Kraftspektroskop vermessen. Sobald die Zellen übereinander wachsen ist die Kugel unbrauchbar. Alle Messungen mit Uterus-Zellen (Kapitel 4 und 5) sind in JAR-Zellkulturmedium durchgeführt worden. Die Kultivierung dieser Zellen [83] erfolgte gemäß den im nächsten Abschnitt beschriebenen Protokollen.

## A.4 Zellen und Zellkulturtechniken

### A.4.1 Zellen zählen

Neubauer-Kammer 0,0025 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm (Assistent, München; 441/82)

(Schichtdicke = 0,1mm; stimmt nur wenn geschliffene Deckgläser verwendet werden!)

Fläche mit Zellzahl multiplizieren:

gesamte unterteilte Fläche:	5 x 1 mm <sup>2</sup>	0,2 x 10 <sup>4</sup> /ml
von dreier-Linien umrahmte Fläche:	1 mm x 1 mm	1 x 10 <sup>4</sup> /ml
1 Quadrat von dreier-Linien umrahmt:	0,2 mm x 0,2 mm	25 x 10 <sup>4</sup> /ml
1 Miniquadrat, von Einzellinie umrahmt:	0,05 mm x 0,05 mm	100x 10 <sup>4</sup> /ml

(Um statistisch vernünftige Zahlen zu erhalten, muß man etwa 100 Zellen zählen, wenn man nur 1 Quadrat auszählt ergibt sich, wegen der inhomogenen Verteilungen der Zellen, nur ein Schätzwert; falls die Zellen zu dicht sind, muß man eine Verdünnung auszählen)

### A.4.2 Rote Blutkörperchen

Gewinnung durch seitlichen Stich mit steriler Nadel in einen (eigenen) Finger. Blutstropfen (ca. 4-10 µl) in 1000 µl PBS aufnehmen und zentrifugieren (4000 rpm). Zum Reinigen: überständiges Blutplasma absaugen, rotes Pellet in PBS aufnehmen 2x wiederholen. Dann einen Tropfen auf Objektgläßchen oder Petrischale geben, und Zellen absinken lassen ggf. PBS nachfüllen oder spülen, falls die Dichte zu hoch ist um einzelne Zellen zu fischen (nie trocknen lassen!).

### A.4.3 Dictyostelium Discoideum Kultur

#### Anzucht in Suspension (Axenische Kultur)

Der Laborstamm AX2 und seine Derivate können im Gegensatz zu Freilandisolaten axenisch gezogen werden. Dazu werden jede Woche 30 ml HL5-Medium (Ashworth & Watts, 1970) mit eingefrorenen AX2-Sporen beimpft und die Kultur bis zu einer Dichte von 5x10<sup>6</sup> Zellen/ml hochgezogen. Diese Vorkultur kann 1-2 Wochen bei 4°C unter Schütteln aufbewahrt und zum Animpfen von Hauptkulturen verwendet werden.

Kulturen bis zu 2 Liter werden bei 21°C auf Schüttlern bei 150 rpm gezogen. Man erntet exponentiell wachsende Zellen (bis 5x10<sup>6</sup> Zellen/ml) durch Abzentrifugieren

mit 1500 rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und zweimaliges Waschen mit kaltem Phosphatpuffer (17 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.0).

### **Suspensionsentwicklung**

In Suspension finden Entwicklungsprozesse ohne Morphogenese statt, die sich über die Expression entwicklungsregulierter Proteine und zellbiologische Eigenschaften nachweisen lassen. Unter den laborüblichen Bedingungen erreichen die Zellen Aggregationskompetenz, sind jedoch in der Weiterentwicklung behindert.

Die medium- bzw. bakterienfrei gewaschenen kalten Zellen werden auf eine Dichte von  $1 \times 10^7$ /ml in Phosphatpuffer eingestellt und bei 18-21°C und 150 rpm geschüttelt. Dieser Zeitpunkt gilt als Beginn der Entwicklung ( $t_0$ ).

### **Präparation für Kraftspektroskopie:**

Solche ( $t_0$ ) Zellen werden direkt zu Messungen an nicht-entwickelten Zellen verwendet, während erst nach 6 Stunden ( $t_6$  oder 6h) die inzwischen entwickelten Zellen entnommen werden. Zur Messung werden die Zellen in eine 3 cm Petrischale gegeben und mit Sörensen-buffer verdünnt und gespült, bis zu einer Zelldichte von etwa  $10^4$ /mm<sup>2</sup>. Für kalziumfreie Messungen werden die letzten Spülschritte mit 5-10 mMol EDTA in Sörensen-buffer durchgeführt.

### **Sporen in Phosphatpuffer einfrieren:**

Axenische Zellen: ca. 250 ml Kultur auf  $5 \times 10^6$ /ml wachsen lassen, dann steril abzentrifugieren und auf sterilem Wasseragar zur Entwicklung ansetzen (ca.  $5 \times 10^8$  pro 9 cm Petrischale). Nach zwei Tagen die Sporen ernten. Dazu kann man entweder mit einem sterilen Spatel die Platten abkratzen oder (etwas sauberer aber mit schlechterer Ausbeute), die feuchten Sporenköpfe in den Deckel der Petrischale schlagen. Sporen in 20 mM Phosphatpuffer suspendieren, auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$ /ml einstellen. In 500 µl Aliquots einfrieren. Reicht für etliche Jahre. Lagerung in -80°C Truhe oder in flüssigem Stickstoff (erhöhte Haltbarkeit).

### **A.4.4 Mutanten von Dictyostelium Discoideum (G. Gerisch)**

#### **AX2 (wildtyp):**

Nach etwa 6-stündigem Nährstoffmangel wird entwicklungsreguliert der csA-Promotor aktiviert und csA exprimiert.

AX2 exprimiert im vegetativen Stadium, bei ausreichender Nährstoffkonzentration, kein csA in nachweisbarer Menge.

**HG1287:** csA negative Mutante, produziert csA wegen eines genetischen Defekts weder vegetativ noch entwicklungsreguliert.

**HG1287 CPH:** csA überexprimierende HG1287 Mutante, produziert entwicklungsreguliert, nach 6 h Hungern, csA in verstärktem Maße, da die in

HG1287 fehlende csA-codierende DNS-Sequenz 10 mal hintereinander re-insertiert wurde.

HG1287 CPH exprimiert vegetativ kein csA in nachweisbarer Menge.

**HTC1:** csA-dauerexprimierende HG1287-Mutante, produziert csA unter dem Aktin-15-Promotor, da die in HG1287 fehlende csA-codierende DNS-Sequenz in den bei der Aktinsynthese ständig aktiven DNS-Abschnitt insertiert wurde.

**HTCP8:** transmembranverankertes csA-dauerexprimierende HG1287-Mutante, produziert genetisch modifiziertes csA mit Transmembrankette unter dem Aktin-15-Promotor (siehe HTC1).

**ATCP8:** transmembranverankertes csA dauerexprimierende AX2 (wildtyp) Mutante, produziert genetisch modifiziertes csA mit Transmembrankette unter dem Aktin-15-Promotor (siehe HTC1).

**T10:** produziert weder vegetativ noch entwicklungsreguliert csA, da das csA-Gen in dieser AX2-(wildtyp)-Mutante gezielt zerstört wurde.

**Alaninmutante:** unter dem Aktin-15-Promotor csA\*-dauerexprimierende Mutante, mit modifizierter potentieller Bindungstasche bei der Lys-133 (Lysin) und Asp-138 (Asparaginsäure) gegen Ala (Alanin) ausgetauscht sind.

#### A.4.5 csA Nachweis im Gel:

Durch Gelelektrophorese (SDS-Page) werden die Proteine der aliquotierten Zellen der Größe nach aufgetrennt und das csA-Molekül mit Antikörpern [152] spezifisch angefärbt.

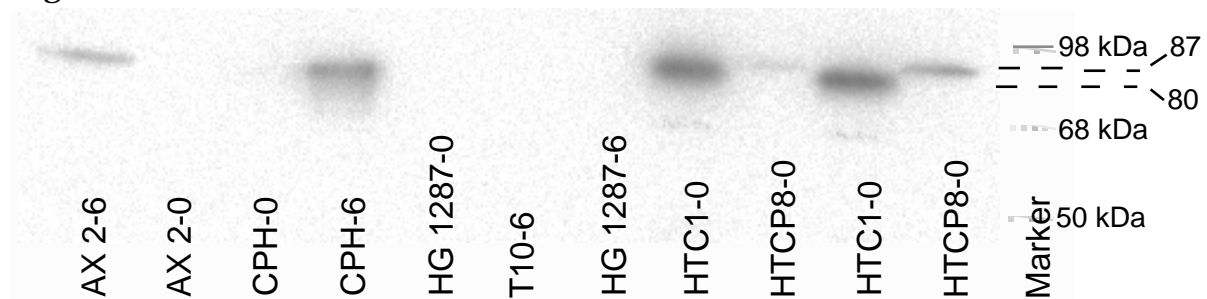


Abb. 0.17: Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine der gekennzeichneten Mutanten - dahinter die Entwicklungszeit in Stunden. Als Marker laufen Moleküle definierter Länge (rechts) um das Molekulargewicht zu definieren. Durch spezifische Antikörperfärbung kann das CSA-Molekül im Gel sichtbar gemacht werden. Die dunklen Balken zeigen die Häufigkeit des csA-Proteins bei einem Molekulargewicht von 80 kDa und etwas schwächer bei etwa 68 kDa (noch nicht glykosiliertes csA im Zytoplasma). Das Transmembrankonstrukt (HTCP8) ist etwas länger: 87kDa

Zur Kontrolle der Molekülmasse wird eine Spur mit gefärbten Proteinen bekannter Länge parallel mitlaufen gelassen (hier: 98,68,50,36kDa). Abb. 0.17 zeigt das Auftreten des csA (dunkle Stellen)im Gel in völliger Übereinstimmung mit dem Auftreten von Kraftbeiträgen von 20 bis 60 pN in den Kraftspektren aus Kapitel 6. Die Schwärzung ist etwa proportional zur exprimierten Menge an csA.

#### A.4.6 Kultivierung von Zelllinien [153]

Zelllinien sind Zellen aus Krebsgeschwüren die im Gegensatz zu Primärkulturen die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen, d.h. sie können *in vitro* wachsen und sich vermehren<sup>13</sup>. Adhärente Zellen wachsen während der Zucht in einem befeuchteten Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (z.B. B220 -5100 8049, Heraeus) an der Bodenfläche von Gewebekulturflaschen (z.B. 38000, 38001, 38002, Renner) an, wo sie sich durch Teilung vermehren können. Nach einigen Tagen überdecken sie die gesamte Bodenfläche mit einem dichten (konfluenten) Zellrasen. Dann müssen sie mit verringerter Dichte in neue Gewebekulturflaschen überführt werden. Zum Passagieren (Umsiedeln oder Umsetzen) der Zellen werden sie zunächst vom Boden der Gewebekulturflasche mit Trypsin-EDTA-Lösung gelöst und nach Verdünnung mit frischem Medium, deren Optimum für jede Zelllinie (mit einer Zählkammer) bestimmt werden muß, in neue Kulturgefäße ausgesät.

Für Experimente können die Zellen wie beschrieben von der Gewebekulturflasche gelöst und auf das vorgesehene Substrat (Petrischale (z.B. Nunc # 150318), auf Deckgläßchen in Multiwellplates (38005, Renner) oder auf die Kugeln am Kraftsensor) ausgesät werden. Üblicherweise können Zelllinien bis zu ca. 20-30 mal passagiert werden, bei weiteren Generationen könnten die Zellen schon so mutiert sein, daß sie den Ursprungszellen nicht mehr entsprechen. Um Zellen trotzdem für längere Zeit aufzubewahren, werden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei -196° C können Zellen für Jahre aufbewahrt werden.

#### A.4.7 Verwendete Zelllinien

**HEC-1-a** (HEC-Zellen): ATCC/HTB 112 [154]. Diese menschliche Zelllinie wurde 1968 aus einem Adenokarzinom des Endometriums einer 71-jährigen Patientin isoliert. Die Zellen zeigen in Kultur ein epitheliales Wachstumsmuster (H.-W.Denker, Essen).

**RL95-2** (RL-Zellen): ATCC/CRL 1671 [155]. Diese menschliche ephiteloide Zelllinie wurde 1982 aus einem mäßig differenzierten adenosquamösen Karzinom des Endometriums einer 65-jährigen Patientin etabliert (H.-W.Denker, Essen).

**JAR-Zellen**: ATCC/HTB 144 8 [109]. Diese menschliche Chorionkarzinomzelllinie wurde direkt aus einem Trophoblasttumor der Plazenta einer 44-jährigen Patientin etabliert (H.-W.Denker, Essen).

**SAOS** (Saos-2-Zellen): ATCC/HTB-85 [156]. Diese menschliche Osteosarkomzelllinie Saos-2 entstammt dem Knochengewebe einer 11-jährigen Patientin.

---

<sup>13</sup> Zelllinien können auch durch Einpflanzung eines Tumor-Gens in eine Primärkultur erzeugt werden oder durch natürliche krebsartige Mutation entstehen.

## A.5 Chemikalien, Lösungen und Medien

Die vorliegenden Untersuchungen wurden vornehmlich mit Chemikalien der Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Gibco-Life Technologie (Eggenstein), Boehringer (Mannheim), Roth (Berlin) und Biochrom (Berlin) durchgeführt. Die Lagerung und Handhabung erfolgte nach Herstellerangaben.

### A.5.1 Chemikalien und Lösungen

<b>Aminosilan:</b> N <sup>1</sup> -[3-(Trimetoxysilyl)propyl]-diethylentriamin	(413348, Aldrich)
$C_{10}H_{27}N_3O_3Si$	
<b>Aminothioliol:</b> 2-Aminoethanthiol; 2-Mercaptoethylamin	(M-9768, Sigma)
$C_2H_7NS$	
<b>Amphotericin B:</b> 250 µg/ml {Pilz und Hefen-Gift}	(A-2942, Sigma; 15290, Gibco)
<b>Amylose:</b> Carboxymethylamylose	(C-4947, Sigma)
<b>BHL:</b> Bovine heart (ga)lectin	(S.André, LMU, München)
<b>BSA:</b> Bovine Serum Albumin; {Rinder Serum}	(Roth, Karlsruhe)
<b>Dextran:</b> $(C_6O_5H_3)_n > 10$ kDa	(D-4133, Sigma)
<b>DMSO:</b> Dimethyl Sulfoxid	(D-5879, Sigma)
$C_2H_6SO$ {Kristallisationsschutz beim Gefrieren}	
<b>EDC:</b> 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid	(E-1769, Sigma)
$C_8H_{17}N_3 \text{ } ^\wedge \text{O-HCL}$	
<b>EDTA:</b> [Ethylenedinitrilo]tetraacetic acid;	(8040.1, Roth; E-9884, Sigma)
$C_{10}H_{16}N_2O_8$ ; (M = 292,25 g/mol)	
<b>Ethanol:</b> $C_2H_5OH$	(5054.2, Roth)
<b>FCS:</b> Fetal Bovine Serum	(F-7524, Sigma; 10108 hitzeinaktiviert, Gibco)
<b>Fibronektin:</b> aus Rinder Plasma {Zelladhäsiv}	(F-4759, Sigma)
<b>HDS:</b> Hexadecansäure, 16-Mercaptohexadecansäure	(448303, Aldrich)
$C_{16}H_{32}O_2S$	
<b>Hellmanex II:</b> Detergens; {Reinigungslösung}	(Hellma GmbH)
<b>HEPES:</b> $C_8H_{18}N_2O_4S$ ; (M= 238,3 g/mol)	(16,371-6, Aldrich; H-3375, Sigma)
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure {pH-Puffer}	
<b>IgG:</b> Immunoglobulin, Fraktion G, aus menschlichem Serum	(S.André, LMU)
(=Lac AB; Lactose Antikörper)	
<b>Insulin:</b> From Bovine pancreas 27 USP / mg, 5807,6 g/mol	(I-5500, Sigma)
<b>Isopropanol:</b> (99%) $C_3H_8O$	(I-9516, Sigma)
<b>Laktose:</b> p-aminophenyl lactoside	(S.André, LMU, München)
<b>Millipore-Wasser:</b> deionisiertes Wasser < 18 M cm	(Millipore Milli-Q plus 185)
<b>Natrium Periodat:</b> $NaIO_4$	(S-1147, Sigma)
<b>NHS:</b> N-Hydroxysuccinimid, $C_4H_5NO_3$	(H-7377, Sigma)

<b>PBS:</b> Phosphat Puffer, pH 7.4, (Tabletten für je 200ml)	(A 8022, Sigma)
<b>Penstrep:</b> Penicillin-Streptomycin Solution (10000 units/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin-Sulfat in 0.9% NaCl)	(P-7539, Sigma; 15140, Gibco)
<b>Poly-D-Lysin:</b> (Molekulargewicht < 70000 g/mol) {Zelladhäsiv}	(P-0899, Sigma)
<b>RCA:</b> Ricinus Communis (castor bean) Agglutinin RCA <sub>120</sub>	(L-7886, Sigma)
<b>Trypsin:</b> 1300 units/mg {Dissoziationsenzym für Zellgewebe}	(T-7409, Sigma)
<b>Trypsin/EDTA:</b> 0.25% Trypsin-EDTA Solution 2.5 g/l Trypsin, 0.2 g/l EDTAx4 Na in HBSS	(T-4049, Sigma)
<b>UDS:</b> Undecansäure, 11-Mercapto-1-undecanol C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> OS	(447528, Aldrich)
<b>VAA:</b> Viscum Album Agglutinin; Mistel-Lektin	(S.André, LMU, München)
<b>WGA:</b> Lectin from Triticum vulgare (wheat germ agglutinin)	(L-9640, Sigma,)

### A.5.2 Medien

<b>DF:</b> Dulbecco's MEM / HAM's F-12 (1:1)	(32500, Gibco)
<b>DMEM:</b> Dulbecco's Modified Eagle's Medium	(D-5648 oder D-6655, Sigma)
<b>HBSS:</b> Hanks' balanced salt solution {isotonische Salzlösung}	(H 6648, Sigma)
<b>Mc Coy's Medium:</b> Mc Coy's 5A Medium	(F1015, Biochrom)
<b>MEM-Vitaminlösung:</b> 100x	(11120, Gibco)
<b>RPMI 1640:</b> VLE RPMI-Medium	(F1415, Biochrom)

### A.5.3 Medien und Lösungen der Zellkultur

Für ein optimales Wachstum werden die Zellen jeweils in chemisch definiertem Medium gehalten. Die Nährmedien werden nach Formulierung des Herstellers zubereitet. Im Einzelnen werden folgende Nährmedien benutzt:

#### HEC-Zell-Medium

86 % Mc Coy's Medium

10 % FCS

2% Penicillin

2% L-Glutamin

#### RL-Zell-Medium

86 % DF

10 mM HEPES

5µg/ml Insulin

10 % FCS, 2% Penicillin

2% L-Glutamin.

(Insulin-Lösung 5µg/ml: 1 mg Insulin in 0,2 l, 0,01 M HCl {zur Glucose-Verdauung})

#### JAR-Zell-Medium:

88 % RPMI 1640

10 % FCS

2% L-Glutamin

(ohne Zusatz von Antibiotika)

**SAOS-Medium (Dr. W. Aicher)**

500 ml DF

1540 mg HEPES

600 mg NaHCO<sub>3</sub>

50 ml FCS

10 ml Penstrep

10 ml MEM-Vitaminlösung

6 ml Amphotericin B

(pH mit NaOH auf 7,4 einstellen + sterilfiltern ergibt ca. 600ml)

**Gefriermischung:**

10 % DMSO

90 % FCS

{zum Gefrieren der Zellen bei -196°C}

**A.5.4 Medien und Lösungen der Dictyostelium-Kultur**

**AX-Medium (Dr.G.Gerisch):**

14,3 g/l Oxoid-Pepton

7,15 g/l Hefeextrakt

18,0 g/l Maltose

0,65 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

0,48 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

(pH 6,7 mit NaOH oder Hcl einstellen, Millipore bidest. Wasser verwenden. In ca. 400 ml Portionen aufteilen und 20 min autoklavieren)

**Soerensen-Phosphatpuffer (zur Entwicklung von AX2 in Suspension)**

20 mM Na<sub>x</sub>K<sub>x</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,2

(Stamm Lösung 0,2 M denn 1 M präzipitiert mit der Zeit, autoklavieren aus 0,2 M Lösungen von Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mischen bis pH 6.2 erreicht Arbeitslösung 20 mM)

## B Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic force microscope	(Kapitel 3 )
ATP	Adenosin Triphosphat (Energiepaket)	(Kapitel 2 )
ATR	Attenuated total reflection	(Seite A 3)
BHL	Bovine heart (ga)lectin (Lektin)	(Seiten A 14, A 25)
BSA	Bovine Serum Albumin	(Seite A 25)
CAM	cell adhesion molecule	(Kapitel 2 )
cAMP	cyclic adenosin-3',5'- monophosphate	(Kapitel 6 )
CHOL	(Cholesterol) (Lipid)	(Kapitel 6 )
csA	contact site A (Zelladhäsionsprotein)	(Kapitel 6 )
csB	contact site B (Zelladhäsionsprotein)	(Kapitel 6 )
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek	(Kapitel 3 )
DNS	Desoxy-Ribo-Nukleinsäure	(Kapitel 2 )
ECM	extra cellular matrix	(Kapitel 2 )
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid	(Seite A 25)
EM	Elektronenmikroskop	(Kapitel 2 )
FCS	Fetal Calf Serum	(Seite A 25)
HBSS	Isotonische Salzlösung	(Seite A 25)
HEC -Zellen	Epithelzellen der Zelllinie HEC-1-a	(Kapitel 5 & A 24)
Ig	Immunoglobulin	(Kapitel 2 & 6 )
JAR -Zellen	Epithelzellen einer Trophoblastzelllinie	(Kapitel 5 & A 24)
kDa	kilo Dalton (Molekülmasse)	(Kapitel 6 )
LEC-CAM	lectin, epidermal, complement-CAM	(Kapitel 2 )
LXXHAVXXNG	Leu- x - x -His-Ala-Val- x - x - Asn-Gly (s.u.)	(Kapitel 2 )
m-RNS	messenger-RNS	(Kapitel 2 )
N-CAM	neuronales Zelladhäsionsmolekül	(Kapitel 2 )
NHS	N-Hydroxysuccinimid	(Seite A 25)
MFM	manipulation force microscope	(Kapitel 3 )
PS	Petrischale	(Kapitel 4 )
PSP	Plasmon surface polariton	(Seite A 3)
RBC	red blood cell	(Kapitel 6 )
RCA	Ricinus Communis Agglutinin (Lektin)	(Seiten A 14, A 25)
REM	Rasterelektronenmikroskop	(Kapitel 2 )
RGD	Arg-Gly-Asp (Peptidsequenz)	(s.u.) (Kapitel 2 )
RL -Zellen	Epithelzellen der Zelllinie RL95-2	(Kapitel 5 & A 24)
RNS	Ribo-Nukleinsäure	(Kapitel 2 )
SAOS-Zellen	Epithelzellen einer Knochenzelllinie	(Kapitel 4 & A 24)
Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Silizium-Nitrid	(Kapitel 3 )



SOPC	(Stearoyllecithinphosphatidylcholin) (Lipid)	(Kapitel 6)
SPR	Surface plasmon resonance	(Seite A 3)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop	(Kapitel 2)
VAA	Viscum Album Agglutinin (Mistel-Lektin)	(Seiten A 14, A 25)
YKLVNDS	Tyr-Lys-Leu-Asn-Val-Asn-Asp-Ser (s.u.)	(Kapitel 6)

## B.1 Peptidcodeauswahl

Ala	Alanin	(Peptid)
Asn	Asparagin	(Peptid)
Asp	Asparaginsäure	(Aminosäure)
Gly	Glycin	(Peptid)
His	Histidin	(Peptid)
Leu	Leucin	(Peptid)
Lys	Lysin	(Peptid)
Ser	Serin	(Peptid)
Tyr	Tyrosin	(Peptid)
Val	Valin	(Peptid)
x	Platzhalter für ein beliebiges Peptid)	

## B.2 Fachwörterauswahl

Aktinfilamente	Aktinpolimerfasern (Zytoskelett)	Kapitel 2
Ankyrin	Verbindungsmolekül	Kapitel 2
Bande3	transmembranes Adhäsionsmolekül	Kapitel 2
Cadherin	Adhäsionsmolekülklasse	Kapitel 2
Chelatbildner	Komplexbildner	Kapitel 6
Endozytose	Membraneinstülpungen	Kapitel 2
Expression	genetisch aktivierte Proteinsynthese	Kapitel 2
Glykokalyx	Glykoproteinschicht	Kapitel 2
heterophil	Adhäsion zw. verschiedenen Molekülen	Kapitel 2
heterodimer	Molekül aus zwei verschiedenen Teilen	Kapitel 2
homophil	Adhäsion zwischen gleichen Molekülen	Kapitel 2
Immunglobulin	Adhäsionsmolekülklasse	Kapitel 2
Integrin	Adhäsionsmolekülklasse	Kapitel 2
Lamellipodien	Flächige Membranusstülpungen	Kapitel 2
Mikrovilli	apikale Membranfingerchen	Kapitel 2
N-Terminus	NH <sub>2</sub> -Ende eines Proteins (C-Terminus COOH-Ende)	Kapitel 2
Philopodien	aktive Membranfinger	Kapitel 6
Promotor	genetischer Schalter	Kapitel 2
Pseudopodien	aktive Membranfüße	Kapitel 2
Selektin	Adhäsionsmolekül	Kapitel 2
silanisieren	mit Silan kovalent funktionalisieren	Seite A 18
Spektrin	stützendes Netzwerk-molekül	Kapitel 2
Vesikel	Bläschen aus Lipidmembran	Kapitel 3
Zytosol	Zellinhalt	Kapitel 2

# Veröffentlichungen

T. W. Holstein, M. Benoit, G. von Herder *et al.*, “Fibrous mini-collagens in hydra nematocysts”, *Science* **265**, 402-404 (1994).

D. Wagner, V. T. Moy, U. G. Hofmann *et al.*, “AFM - The art of touching molecules”, *Proc. ICEM 13-Paris, Applications in Biological Science* **3B**, 751-752 (1994).

M. Benoit, T. Holstein and H. E. Gaub, in *Procedures in Scanning Probe Microscopies*. R. Colton, A. Engel, J. Frommer, H. Gaub, A. Gewirth, R. Guckenberger, W. Heckl, B. Parkinson and J. Rabe, Eds. (John Wiley & Sons, Sussex, 1995)

M. Benoit, T.W. Holstein and H.E. Gaub, “Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles”, *European Biophysical Journal* **26** (4), 283-290 (1997).

M. Thie, R. Röspel, W. Dettmann *et al.*, “Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces.”, *Hum. Reprod.* **13** (11), 3211-3219 (1998).\*

M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch *et al.*, “Discrete molecular interactions in cell adhesion measured by force spectroscopy”, *Nat. Cell. Biol.* **2** (6), 313 - 317 (2000).\*

W. Dettmann, M. Grandbois, S. André *et al.*, “Differences in zero-force and force-driven kinetics of ligand dissociation from galactoside-specific proteins (plant and animal lectins, immunoglobulin G) monitored by plasmon resonance and dynamic single molecule force microscopy”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **383** (2), 157-170 (2000).\*

M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit *et al.*, “Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope”, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **48** (5), 719-724 (2000).\*

---

\* Teile der vorliegenden Dissertation sind in diesen Veröffentlichungen enthalten

# **Lebenslauf**

**Name:** Martin Benoit

**geboren am:** 11. Januar 1965  
**in:** München

**Eltern:** Jutta Benoit  
Peter Benoit

**Grundschule:** 1971 - 1972 Walchstatt  
1972 - 1975 Unterpfaffenhofen

**Gymnasium:** 1975 - 1984 Pasing

**Wehrdienst:** 1984 - 1985 Starnberg

**Studium:** 1985 - 1986 München: Elektrotechnik, TU  
1986 - 1988 München: Philosophie, LMU  
1988 - 1994 München: Physik, LMU

**Diplom:** 1994 München: Physik, LMU

**Promotion:** seit 1996 in München: am Lehrstuhl Gaub