

Etablierung neuartiger fusogener Liposomen zur Lipidinterkalation in tierische Plasmamembranen

Analyse mittels zeitlich und räumlich hochauflösender
lichtmikroskopischer Methoden

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Christian Kleusch

aus Koblenz

Bonn, Oktober 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck

Drittgutachter: Prof. Dr. Arne Lützen

Viertgutachter: PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Tag der Disputation: 20.02.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Für meine Eltern

Danksagung

Vielen Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Rudolf Merkel für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können. Danke, dass Sie sich immer die Zeit genommen haben, „mal kurz“ über spannende Ergebnisse, rätselhafte Artefakte und Messtechnik diskutieren zu können. Sie haben ihre Begeisterung für die Forschung bis heute nicht verloren und ich hatte oftmals den Eindruck, dass sie ebenso gerne selbst mit ans Mikroskop gekommen wären.

Mein zweiter Dank gilt Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck für die Übernahme des Zweitgutachtens und der Möglichkeit, in seinem Seminar regelmäßig meine Ergebnisse vortragen zu können.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Agnes Csiszar. Vielen Dank für die hervorragende und freundschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Du warst immer, zu jeder Tages- und Nachtzeit, ein Ansprechpartner, durch Diskussionen mit Dir haben sich oftmals völlig neue Sichtweisen (meistens für uns beide) eröffnet. Du bist in der Lage, zu motivieren, durch Ideen und Charme auch mal über Durststrecken hinweg zu helfen. Ach ja, vielen Dank auch für die leckeren Lakritzbonbons. Ich erwarte ab jetzt einen lebenslangen Nachschub dieser ungarischen Spezialität :)

Ferner Danke ich...

...Dr. Cornelia Monzel für die tolle Zusammenarbeit beim FCS-Projekt und vor allem damals bei der Etablierung der Technik. Ich erinnere mich gerne an die gute alte Zeit, als wir zu zweit im Chemielabor waren

...PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert für die fruchtbaren Diskussionen über Sphingolipide in Ihrem Büro sowie auf der Tagung in Mosbach.

...Dr. Guillermo Beltramo für die projektübergreifende Hilfe beim Vesikelexperiment und für die Hilfe bei der Anfertigung der Kammern, sowie die lustigen Zeiten im Chemielabor.

...Dr. Sabine Dieluweit für die Einweisung in die Langmuir-Blodgett Technik.

...Dr. Ronald Springer für die Hilfe bei dem Lieblingsthema eines Biologen, der Statistik, und der Versorgung mit feinstem grünen Tee und den *Breaking Bad* Spoilern.

...Dr. Bernd Hoffmann für die Kritik und die kompetenten Ratschläge bei biologischen

Fragen.

...Nils Hersch und Benjamin Wolters für die allwöchentliche Versorgung mit frischen Myos.

...Dr. Alexander Zielinski, Jimmy H., Kurt C., Bob D., Jim M. und viele viele weitere für all die gefühlten Jahre auf der A555, A4 und A61 und dass diese nur durch deine (eure) Anwesenheit nie nervig wurden. Es ist schön, wenn sich Arbeit und Freundschaft vermischen.

...Tobias Braun für die Hilfe beim Fusionscharakterisierungsprojekt und vorallem für die pünktliche Versorgung mit Korrekturen vom Chef, sowie der Bereitschaft, dass ich dich von Bonn aus mit nervigen, aber leider notwendigen Aufgaben für Dies und Das kontaktieren konnte.

...Elena Naumovska, thank you for the good time we shared in our office. It was always so funny hearing you complain about the deutsche Bürokratie. Your passion for science was always inspiring to me. I hope I could teach you a thing or two.

...Catherina Pleschka und Tiffy für das Dissertations-Survival-Paket und die ausgiebigen Gespräche über's...Leben (!?). Dein CB

...Georg Dreisen auch für den Tee und die spannenden Geschichten über's Klettern.

...Dr. med. Sophia Hömberg für das Korrekturlesen. Und die einprägende Zeit auf dem Schrankogel (mit dem wir noch eine Rechnung offen haben, gell !?)

...Allen Kollegen und Kolleginnen des ICS-7 für die Hilfsbereitschaft und die gute Stimmung in der Arbeitsgruppe. Insbesondere Wolfgang Rubner für die Bereitschaft, zur Not auch Montags, Dienstags, Donnerstags und Freitags bestellen zu können.

...Meiner Freundin Laura Seibt für die Unterstützung in den letzten Jahren. Du bist der beste VV2, den man sich vorstellen kann. Auf die Vergangenheit, denn sie hat uns zu dem gemacht, was wir heute sind. Und vorallem AUF DIE ZUKUNFT, wo auch immer diese sein mag :)

Zusammenfassung

Sämtliche lebenden Zellen sind von Biomembranen umschlossen, höhere Zellen weisen auch einen sehr großen Anteil an inneren Membranen auf. Diese Membranen bestehen aus einer flüssigen Lipid-Doppelschicht mit sehr vielen eingebetteten Proteinen. Biomembranen erfüllen vielfältige biologische Funktionen, für deren Untersuchung die selektive Inkorporation künstlicher oder chemisch veränderter Membranmoleküle ein entscheidender Schritt ist.

Die vorliegende Dissertation behandelt die Etablierung sowie Charakterisierung eines neuartigen Liposomen-Fusionssystems (die sogenannten fusogenen Liposomen) zur Interkalation fluoreszenzmarkierter Lipide in zelluläre Membranen. Dieses Interkalationssystem wurde eingesetzt, um biologisch aktive Phospholipide, Mikrodomänen-assoziierte Lipide sowie synthetische, amphipatische Moleküle effizient in Plasmamembranen einzuschleusen und deren Diffusion mittels zeitlich hochauflösender, lichtmikroskopischer Methoden zu analysieren. Dabei stand insbesondere die Analyse dieser Moleküle in proteinreichen, adhären Membranbereichen, den sogenannten Fokaladhäsionen, im Fokus. Fusogene Liposomen wurden 2009 am *Institute of Complex Systems (ICS-7)* entwickelt und wurden in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal für biologische Fragestellungen eingesetzt. Diese Liposomen fusionieren schnell und effizient mit Plasmamembranen. Sie bestehen aus neutralen und positiv geladenen Lipiden sowie Aromat-haltigen, amphipatischen Molekülen in einem bestimmten Mischungsverhältnis. Ein erweitertes Fusionssystem, bei dem ein synthetisches, amphipatisches und aromatisches Molekül (*DiIC₁₈(7)*) die Fusion auslöst und dadurch die Interkalation biologischer Lipide über einen breiten Konzentrationsbereich ermöglicht, wurde erstmals in meiner Diplomarbeit vorgestellt. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde dieses System verwendet, um fluoreszenzmarkierte Glycerophospholipide, Sphingolipide, Glycosphingolipide sowie Sterole in Plasmamembranen tierischer Zellen zu interkalieren und deren intrazelluläre Lokalisation, Transport- und Abbauewege zu betrachten. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten, biologisch aktiven Lipide effizient und schonend in die zelluläre Plasmamembranen eingebracht werden konnten. Von der Plasmamembran ausgehend reicherten sie sich entsprechend ihrer natürlichen, intrazellulären Lokalisation in unterschiedlichen Organellen an. Das Transportsystem beeinflusst demnach nicht die intrazelluläre Verteilung der untersuchten Lipide. Darüber hinaus zeigten sich Unterschiede in der Kinetik des membranständigen Signals. Das synthetische, amphipatische Molekül, welches die Fusion auslöst, wurde innerhalb weniger Stunden von der Plasmamembran ins Endomembransystem transportiert und dort innerhalb 24 Stunden lysosomal abgebaut. Phospholipide

und Sterole mit freien Hydroxylgruppen hingegen sind bis zu 48 h in der Plasmamembran detektierbar. Zellvitalität sowie Proliferationsrate wurden nicht durch fusogene Liposomen verändert.

Im nächsten Schritt wurde erstmals systematisch untersucht, welchen Einfluss die chemische Natur der beteiligten Moleküle auf die Effizienz des Transfers hat. Zur Quantifizierung der Effizienz wurde Durchflusszytometrie verwendet. Deren Ergebnisse wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die einzelnen Lipid-Komponenten, neutrales Lipid, positiv geladenes Lipid und Aromat-haltiges, amphipatisches Molekül wurden systematisch gegen Lipide mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgetauscht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die positive Ladung als auch das delokalisierte π -Elektronensystem unabdingbar für die Membranfusion sind. Liposomen, welche nur aus positiv geladenen sowie fluoreszenzmarkierten Lipiden bestehen, fusionierten ebenfalls mit der Plasmamembran, allerdings bildeten sich hier kurz nach Fusion strukturelle Veränderung der Membran. Nur Liposomen, bei denen das neutrale Lipid eine Phosphoethanolamin-Kopfgruppe besitzt, waren zur Membranfusion fähig. Der Sättigungsgrad der Fettsäurekette hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die Fusogenität. Meine Experimente zeigten, dass bestimmte molekulare Gruppen in neutralen sowie den positiv geladenen Lipiden (Ethylgruppen am Glycerin-Rückgrat; Cholin-Kopfgruppen) eine für die Fusion wahrscheinlich wichtige Wechselwirkung zwischen positiver Ladung und Fluorophor verhindern, beziehungsweise negativ beeinflussen. In der Literatur wurde postuliert, dass invers-kubische (Q_{II}) und invers-hexagonale (H_{II}) Phasen der beteiligten Membranen als Übergangszustände entscheidend für die Membranfusion seien. Diese Hypothese wird durch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse voll und ganz unterstützt.

Im dritten Versuchsteil wurde schließlich die Diffusion von fluoreszenzmarkierten Phospholipiden, Mikrodomänen-assoziierten Lipiden und synthetischen, amphipatischen Molekülen in zellulären Plasmamembranen und Modellmembranen mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) untersucht. Das Ziel dieser Arbeiten war es zu untersuchen, inwieweit die in Modellmembranen wohl etablierte flüssig-geordnete/flüssig-ungeordnete (L_O/L_D) Phasenseparation zur Erklärung der in Zellmembranen beschriebenen Mikrodomänen dienen kann. Die fusogenen Liposomen wurden so angepasst, dass fluoreszente Lipide in einem für FCS-Messungen optimalen Konzentrationsbereich eingebaut werden konnten. Es konnte bewiesen werden, dass die Mikrodomänen-assoziierten Lipide Sphingomyelin sowie Gangliosid GM1 in zellulären Fokaladhäsionen eine signifikant verlangsamte Diffusion im Vergleich zu nicht-adhären Membranbereichen besitzen. Cholesterol, Phosphatidylcholin sowie das synthetische, amphipatische Molekül zeigten keine Verlangsamung. Anhand der Versuche an phasenseparierten Riesenvesikeln konnte der Einfluss der höheren Membranordnung in Fokaladhäsionen, also die Anwe-

senheit einer flüssig-geordneten Domäne, als alleiniger Grund für die beobachtete, langsamere Diffusion von Sphingomyelin und GM1 widerlegt werden. Die Ergebnisse deuten insgesamt auf eine spezifische Protein-Lipid-Wechselwirkung sowie eine mögliche Anreicherung in kurzlebigen, sub-mikroskopischen Membrandomänen hin.

Ingesamt gelang es in der vorliegenden Arbeit das 2009 entdeckte Membranfusions-System weiterzuentwickeln, Hinweise auf den zugrunde liegenden Mechanismus zu finden sowie es erstmals zur Untersuchung membran-physikochemischer Fragen einzusetzen.

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeine Einführung zur Struktur biologischer Membranen	1
2	Material und Methoden	7
2.1	Zellkultur	7
2.1.1	Kulturbedingungen von Ovarienzellen des chinesischen Hamsters, Subtyp K1	7
2.1.2	Isolation und Kulturbedingungen von kardialen Fibroblasten und Myozyten aus Rattenembryonen	7
2.1.3	Zell-Vitalitätstest	9
2.1.4	Identifikation von Zellorganellen mit Organell-spezifischen Markermolekülen	9
2.1.4.1	Plasmamembran-Färbung	9
2.1.4.2	Golgi-Apparat- /Endoplasmatisches Retikulum - Färbung	9
2.1.4.3	Lysosomen-Färbung	10
2.1.5	Transfektion durch Elektroporation	10
2.1.6	Immunohistochemische Färbung	10
2.1.7	Herstellung von Lebendzell-Mikroskopieschalen	11
2.2	Lipide	12
2.2.1	Neutrale Lipide	14
2.2.2	Positiv-geladene Lipide und biotinylierte Lipide	15
2.2.3	Kettenmarkierte Lipide	16
2.2.4	Kopfmarkierte Lipide, markierte Sterole und synthetische, amphipatische Moleküle	17
2.3	Fusogene Liposomen	18
2.3.1	Herstellung fusogener Liposomen	18
2.3.2	Fusion von Liposomen mit der Plasmamembran tierischer Zellen	19
2.3.3	Herstellung von Lipid/Rinderserum-Albumin - Komplexen	19
2.4	Modellsysteme	19
2.4.1	Langmuir-Blodgett-Technik	20
2.4.1.1	Präparation von unterstützten Lipiddoppelschichten	21

2.4.2	Unilamellare Riesenvesikel (GUVs)	22
2.4.2.1	Herstellung von GUVs	23
2.4.2.2	Vesikel-Mikroskopiekammern	24
2.5	Mikroskopie	25
2.5.1	Physikochemische Grundlagen der molekularen Fluoreszenz	25
2.5.1.1	Extinktionskoeffizient, Quantenausbeute und Fluoreszenz- Lebensdauer	27
2.5.1.2	Fluoreszenz-Löschung und Excimerbildung	28
2.5.1.3	Photobleichen und Phototoxizität	30
2.5.1.4	Fluorophor-Sättigung	31
2.5.2	Epifluoreszenz-Mikroskopie	32
2.5.3	Konfokale Mikroskopie	32
2.5.4	Bestimmung der Position von Fokalkontakten mittels Interferenz- Reflexions-Mikroskopie	37
2.5.5	Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie	38
2.5.5.1	Die Autokorrelationsfunktion	40
2.5.5.2	Einstellungen und Parameter des ConfoCor-3 Moduls	43
2.5.5.3	Bestimmung des konfokalen Volumens	44
2.5.5.4	Bestimmung der Laserleistung mit dem ConfoCor-3	46
2.6	Durchflusszytometrie	47
2.6.1	Probenvorbereitung für die durchflusszytometrische Analyse	47
2.7	Statistische Datenanalyse	49
3	Etablierung fusogener Liposomen als hocheffizientes Lipid-Interkalationssystem in zelluläre Plasmamembranen	51
3.1	Einleitung	51
3.2	Ergebnisse	54
3.2.1	Identifizierung von Zellorganellen durch Organell-spezifische Mar- kermoleküle	54
3.2.2	Kinetik der Plasmamembran-Färbung mittels fusogener Liposomen	56
3.2.3	Zeitliche Analyse der intrazellulären Verteilung von <i>Bodipy FL-SM</i> und <i>DiIC₁₈(7)</i> nach Interkalation durch FLs	57
3.2.4	Einfluss von FLs auf Proliferationsrate und potenziell zytotoxische Effekte	58
3.2.5	Vergleich der Lipid-Interkalation durch fusogene Liposomen und Lipid/BSA-Komplexe	60
3.2.6	Interkalation fluoreszierender Cholesterol-Derivate	61
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	63

4	Fusionsanalyse durch systematischen Austausch der fusionsvermittelnden Lipide	65
4.1	Einleitung	65
4.2	Ergebnisse	68
4.2.1	Vergleich des Fluoreszenzsignals unterschiedlicher fusogener und nicht-fusogener Liposomen mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie	69
4.2.2	Zelluläre Aufnahme von Liposomen aus neutralen und fluoreszenzmarkierten Lipiden	72
4.2.3	Zelluläre Aufnahme von Liposomen aus einem neutralen, positiv geladenen und fluoreszenzmarkierten Lipid	73
4.2.3.1	Variation in der Kopfgruppe des neutralen Helferlipids	74
4.2.3.2	Variation in der Kettensättigung des Helferlipids	76
4.2.3.3	Variation des positiv geladenen Lipids	78
4.2.3.4	Variation des fluoreszenzmarkierten Lipids	80
4.2.4	Zelluläre Aufnahme von Liposomen aus positiv geladenen und fluoreszenzmarkierten Lipiden	82
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	84
5	Diffusion von Phospholipiden und Mikrodomänen-assoziierten Lipiden in zellulären Membranen und Modellsystemen	87
5.1	Einleitung	87
5.1.1	Fokaladhäsionen - Verbindung zwischen Zelle und Untergrund	92
5.1.2	Der Myofibroblast	94
5.2	Ergebnisse	95
5.2.1	Bestimmung primärer, kardialer Myozyten und Myofibroblasten aufgrund morphologischer Unterschiede	95
5.2.2	Identifizierung der Intensitätsmuster in IRM-Aufnahmen als reife Fokaladhäsionen	96
5.2.3	Interkalation von Phospholipiden und Mikrodomänen-assoziierten Lipiden für FCS-Analysen	98
5.2.4	Lipid-Diffusion in der Plasmamembran von Myofibroblasten im Hinblick auf adhärierte Membranbereiche	100
5.2.5	Zeitliche Bestimmung des ansteigenden Hintergrundsignals bei Messungen mit <i>Bodipy FL-GM1</i>	107
5.2.6	Lipid-Diffusion in phasenseparierten Riesenvesikeln als biomimetisches Modellsystem	112
5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	119

6	Generelle Diskussion	121
6.1	Diskussion über FLs als geeignetes Lipid-Interkalationssystem	121
6.2	Diskussion der Fusionsanalyse durch den systematischen Austausch der fusionsvermittelnden Lipide	125
6.3	Diskussion zur Diffusion von Phospholipiden und Mikrodomänen-assoziierten Lipiden in zellulären Membranen und Modellsystemen	131
7	Ausblick	139
8	Lebenslauf	141
	Literaturverzeichnis	142

1 Allgemeine Einführung zur Struktur biologischer Membranen

Die zelluläre Membran ist ein fundamentaler, struktureller Bestandteil aller lebenden Organismen. Die Plasmamembran besitzt eine besonders bedeutsame Funktion, indem sie als äußere Hülle das Zellinnere von der Umgebung abgrenzt. Diese abgrenzende Eigenschaft war für die Evolution des Lebens von herausragender Bedeutung, da durch die Abgrenzung des Zellinneren vom extrazellulären Raum spezielle, intrazelluläre Bedingungen geschaffen werden und beispielsweise Energieträger angereichert und gespeichert werden konnten. Ohne die abgrenzende Funktion der Membran könnten beispielsweise keine Ionengradienten über Bakterien-, Mitochondrien- und Chloroplasten-Membranen aufgebaut werden, welche von der Zelle zur Synthese von ATP und als Energielieferant für den Transport ausgewählter Stoffe genutzt werden [4]. Des Weiteren dient die biologische Membran als Barriere vor der äußeren Umgebung der Zelle. Diese Barriere verhindert zum Beispiel das Eindringen zytotoxischer Moleküle, ist aber gleichzeitig selektiv permeabel gegenüber Botenstoffen. Signale, beispielsweise in Form ausgeschütteter Hormone oder Neurotransmitter, müssen effizient und schnell „über“ die Membran weitergeleitet werden, wobei der gesamte Signaltransduktionsprozess an diesem Übergang meistens noch verstärkt wird [175]. Membranen sind darüber hinaus auch für die interzelluläre Erkennung wichtig. Zellen müssen in der Lage sein, ihre Umgebung zu erkennen und aneinander oder an Substraten adhären zu können, um intakte Gewebe formen zu können.

Unabhängig ihrer spezifischen Funktion besitzen alle biologischen Membranen die gleiche strukturelle Gemeinsamkeit: Sie bestehen aus einer dünnen Schicht aus Lipiden, in die Proteine eingebettet oder peripher assoziiert sind. Die Lipide selbst sind als durchgängige, lückenlose Doppelschicht mit einer Dicke von 8 nm organisiert [154]. Sie sind untereinander nicht durch kovalente Bindungen verknüpft, sondern sind durch den hydrophoben Effekt in der Lage, geschlossene Membranen zu bilden [182]. Lipide selbst sind amphipatische Moleküle. Sie besitzen eine hydrophile Kopfgruppe sowie hydrophobe Schwänze, die Fettsäureketten. Daher organisieren sich Lipide in wässriger Umgebung so, dass ihre hydrophoben Fettsäureketten nicht mit den Wasser-Molekülen in Kontakt kommen können und nur die hydrophilen Kopfgruppen ins Wasser eintauchen [182]. Phospholipide

bilden also allein aufgrund ihres amphipatischen Charakters Doppelschichten, in denen die Fettsäureketten im Inneren von der wässrigen Umgebung abgeschirmt werden. Da die Membran durch die hydrophoben Wechselwirkungen zusammen gehalten wird, welche wesentlich schwächer sind als kovalente Bindungen, können sich die Komponenten der Membran lateral verschieben, durch zweidimensionale Diffusion, oder sogar in seltenen Fällen, sogenannte „Flip-Flop“-Bewegung vollziehen [29]. Die zelluläre Membran stellt also eine dynamische Barriere dar, deren Hauptkomponenten nicht starr an einem Ort organisiert sind, sondern vielmehr als Flüssigkeit mit einer hohen Dynamik betrachtet werden muss. Daher wurde 1972 von Singer und Nicolson der Begriff des „Flüssig-Mosaik-Modells“ eingeführt. Es beschreibt, wie Proteine (das Mosaik) in die Lipiddoppelschicht (die Flüssigkeit) eingebettet sind. Die hydrophoben Bereiche dieser Transmembranproteine sind dabei von den Fettsäureketten der Lipide umgeben und die hydrophilen Teile des Proteins dem wässrigen Außenmilieu zugewandt [154]. Eine schematische Darstellung dieses Modells ist in Abbildung 1.1 zu sehen.

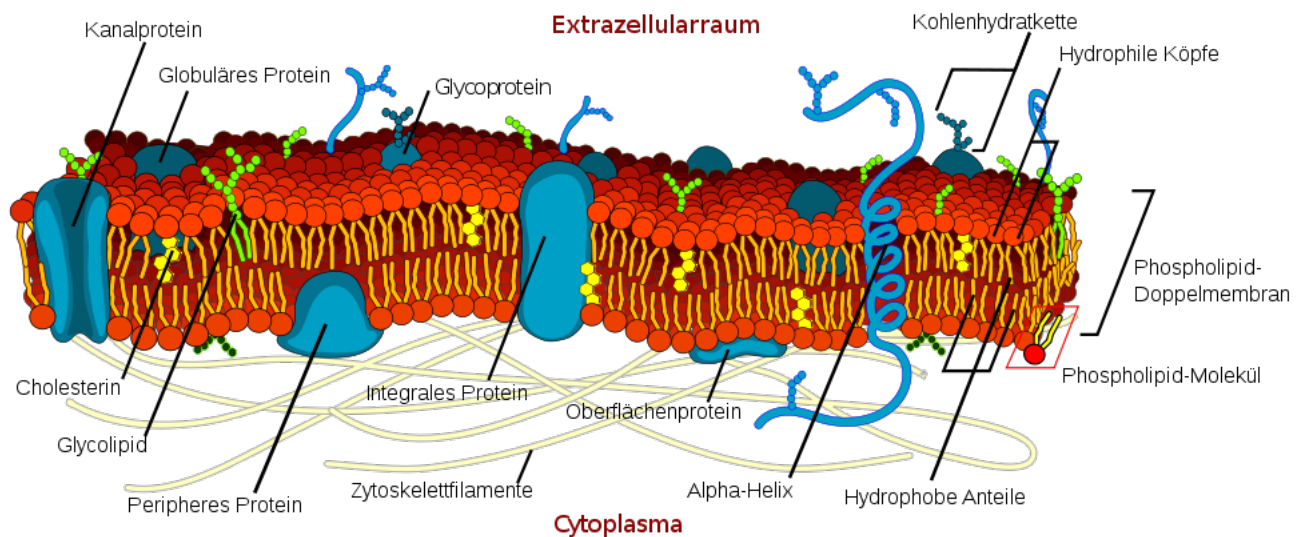


Abbildung 1.1: Das Flüssig-Mosaik-Modell der Plasmamembran.

Quelle: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_membrane_detailed_diagram_de.svg
Das Bild unterliegt den freien Bildrechten von *Wikipedia commons* und darf ohne Einschränkung für jegliche Zwecke verwendet werden.

Lipid-Moleküle machen etwa 50 % der Masse tierischer Membranen aus [4]. Phospholipide stellen dabei den Großteil aller Lipid-Moleküle dar. Sie besitzen eine polare Kopfgruppe sowie zwei unpolare Fettsäureketten. Die Fettsäureketten verschiedener Lipide aus tierischen Zellen können unterschiedlich lang sein und enthalten immer eine gerade Anzahl zwischen 14 und 24 Kohlenstoff-Atomen [182]. Die Diversität von Lipid-Molekülen in zellulären Membranen ist enorm. Bisher wurden, basierend auf den Variationen in den

Fettsäureketten und Kopfgruppen ungefähr 1000 verschiedene Lipide identifiziert [170]. Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Membranlipid-Klassen mit den am häufigsten vorkommenden Vertretern besprochen.

- Glycerophospholipide: Die häufigsten strukturellen Lipide in eukaryotischen Membranen stammen aus der Klasse der Glycerophospholipide. Wichtige Vertreter sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidsäure (PA) und Cardiolipin (CA). Glycerophospholipide besitzen typischerweise zwei Fettsäureketten, verestert an die Glycerin-Gruppe des Lipids. An die dritte, endständige OH-Gruppe des Glycerins ist eine Phosphatgruppe gebunden, welche wiederum mit unterschiedlichen Alkoholen verestert ist, was die strukturellen Unterschiede in den Kopfgruppen ausmacht. PA besitzt eine primäre Phosphatgruppe und kommt nur in Spuren in zellulären Membranen vor, allerdings ist PA ein zentrales Intermediärprodukt in der Biosynthese von Glycerophospholipiden [182]. PC besitzt eine Cholin-Kopfgruppe (kovalent gebunden an die Phosphatgruppe) und ist eines der am häufigsten vorkommenden Lipide tierischer Membranen. Sie können aus bis zu 50 % PC bestehen [4]. PE ist das Haupt-Membranlipid von Bakterien, kommt aber auch in tierischen Zellen in großen Mengen vor und ist dort oftmals asymmetrisch verteilt in der zytosolischen Schicht der PM zu finden [4]. PS besitzt wie PE terminal eine Aminogruppe an der Kopfgruppe und ist darüberhinaus negativ geladen. Es ist wie PE auch in der zytosolischen Schicht der PM lokalisiert. PI macht nur zwischen 2 und 8 % des Anteils an Phospholipiden in eukaryotischen Zellen aus. Einige Lipidkinasen können Phosphatgruppen an bestimmte Positionen des Inositolrings anfügen, wobei die phosphorylierten Formen als PIP_2 oder PIP_3 an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, indem sie als Bindungsstelle für periphere Signalproteine dienen können [182, 4]. CA ist ein häufiges Phospholipid der inneren Mitochondrienmembran, von Chloroplasten sowie einiger Bakterienmembranen [182].
- Sphingolipide: Sie stellen ebenfalls eine wichtige, strukturelle Lipidklasse dar. Sphingosin bildet das in allen Sphingolipiden vorkommende Grundgerüst. Sphingosin ist eine einfach ungesättigte Acylkette, bestehend aus 18 Kohlenstoffatomen mit einer Aminogruppe und zwei freien Hydroxylgruppen. Eine Acetylierung der Aminogruppe mit einer Fettsäurekette führt zu Ceramid (Cer), einem fundamentalen Sphingolipid. Obwohl in biologischen Membranen wenig freies Ceramid vorkommt, bildet es die strukturelle Basis für komplexe Sphingolipide wie Sphingomyelin (SM) oder Glycosphingolipide [182]. Die am häufigsten vorkommende Sphingolipide in zellulären Membranen sind SM sowie die Glycosphingolipide, welche Mono-, Di- oder Oligosaccharide kovalent an die Kopfgruppe gebunden, besitzen [4]. In SM ist die terminale OH-Gruppe des Ceramids durch Veresterung an Phosphocholin

gebunden. Die freie OH-Gruppe trägt zum polaren Charakter der Kopfgruppe bei, da H-Brücken zu benachbarten Lipiden, Wassermolekülen oder Membranproteinen ausgebildet werden können [4]. Zusammen mit PC, PE und PS bildet SM insgesamt die Hälfte der Lipidmasse tierischer Zellmembranen [175]. Häufig vorkommende Vertreter der Glycosphingolipide sind die Ganglioside. Ganglioside kommen in niedriger Konzentration in der äußeren Schicht der PM vor und haben antigene Eigenschaften, indem sie als Rezeptor für Antikörper oder diverse Toxine (zum Beispiel Cholera-Toxin) dienen [182]. In Erythrozyten tragen Glycosphingolipide Blutgruppen-typische Oligosaccharide [29].

- Sterole: Sterole sind die am häufigsten vorkommenden unpolaren Lipide zellulärer Membranen. Der wichtigste Vertreter eukaryotischer Membranen ist Cholesterol (in Säuegtern) beziehungsweise Ergosterol (in Hefen). Cholesterol besitzt eine starre Steroid-Ringstruktur, an die eine freie OH-Gruppe und eine kurze, unpolare Kohlenwasserstoffkette. Es kann in tierischen PMs bis zu 30 % der Gesamt-Lipidmasse ausmachen und kommt weiterhin in Lysosomen, Endosomen und den Golgi Apparat vor [182]. Cholesterol beeinflusst maßgeblich die Eigenschaften einer Lipiddoppelschicht, indem es mit seiner freien OH-Gruppe mit den polaren Kopfgruppen der Lipide wechselwirkt und dadurch der steife Steroid-Ring mit den Bereichen der Fettsäureketten in der Nähe der Kopfgruppe interagieren muss. Dadurch werden Kopfgruppen-nahe Teile des Lipid teilweise immobilisiert und die gesamte Lipiddoppelschicht weniger deformierbar [4].

Die Lipidzusammensetzung verschiedener zellulärer Membranen kann sehr unterschiedlich sein, was direkten Einfluss auf die Funktion und Struktur des jeweiligen Organells hat. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Lipid-Komposition der PM sowie subzellulärer Membranen, isoliert aus Ratten-Leberzellen.

	Anteil der Phospholipide [%]							Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein)
	PC	PE	PS	PI	PA	CL	SM	
PM	39	23	9	8	1	1	16	128
Mitochondrien	40	35	1	5	-	18	1	3
Endoplasm. Retikulum	58	22	2	10	1	1	1	14
Lysosomen	40	14	2	5	1	1	20	38
Kernmembran	55	13	3	10	2	4	8	38
Golgi Apparat	50	20	6	12	1	1	8	78

Tabelle 1.1: Lipid-Komposition der PM und subzellulärer Membranen aus Ratten-Leberzellen. Adaptiert nach [182]

Lipidphasen

Aufgrund des amphipatischen Charakters und der dadurch bedingten räumlichen Anordnung der Lipide wird die Lipiddoppelschicht als zweidimensionaler Flüssigkristall angesehen [163]. In Abhängigkeit vom Lipid, der Temperatur und des Wassergehalts können Phospholipide verschiedene Phasen ausbilden. Dieses Verhalten wird als Polymorphismus der Lipide bezeichnet. Kristalline, lamellare Phasen (L_C) werden von praktisch allen Phospholipiden bei niedrigen Temperaturen gebildet. Diese Phase zeichnet sich durch hohe, dreidimensionale Ordnung auf kurzer sowie großer Distanz aus und sind demnach echte Kristalle [33]. Diese Phase ist oftmals wasserfrei. Eine ebenfalls lamellare, festkörperartige Phase ist die Gelphase (L_β). In der L_β -Phase sind die Kohlenwasserstoffketten steif, völlig ausgedehnt und regelmäßig auf einem zweidimensionalen Gitter ausgerichtet [33]. Sie können in dieser Phase langsam (auf einer Zeitskala von 100 ns) entlang ihrer Längsachse rotieren, zeigen aber fast keine laterale Diffusion. Oberhalb einer bestimmten Temperatur beziehungsweise Wassergehalts machen die Kohlenwasserstoffketten eine Umwandlung von der L_β - hin zu einer flüssigen Phase, die L_α -Phase [33]. Diese Phase ist gekennzeichnet durch eine hohe laterale Diffusion der Lipide sowie einen niedrigeren Ordnungsgrad der Kohlenwasserstoffketten. Deshalb wird sie auch als flüssig-ungeordnete (L_D) Phase bezeichnet. Abbildung 1.2 stellt schematisch die in Biomembranen relevanten, lamellaren Lipidphasen dar.

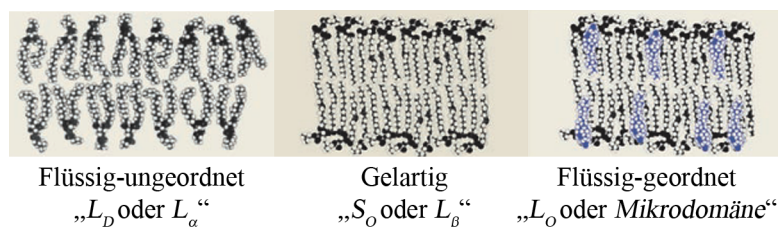


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der lamellaren Lipidphasen, welche in Biomembranen relevant sind. Verändert nach [170].

Einen besonderen Fall der Lipidphasen in Biomembranen stellt die flüssig-geordnete (L_O) Phase dar. Sie zeichnet sich zum einen durch einen hohen Ordnungsgrad der Kohlenwasserstoffketten aus (ähnlich der L_β -Phase), andererseits zeigen die Lipide innerhalb der L_O -Phase eine hohe laterale Diffusion (ähnlich der L_D -Phase) [170]. Cholesterol ist in der L_O -Phase dicht zwischen die Kohlenwasserstoffketten der Glycerophospho- und (Glyco-)Sphingolipide gepackt, wodurch diese zu einer höheren Ordnung gezwungen werden [86]. In Modellmembranen kann diese Interaktion zu mikroskopisch unterscheidbaren L_D/L_O -Phasen führen. Die L_O -Phase ist in solchen Membranen reich an gesättigten Glycerophospholipiden oder Sphingolipiden und Cholesterol, wohingegen die L_D -Phase reich an ungesättigten Glycerophospholipiden ist [86].

Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit behandelt die Untersuchung zellulärer Membranen durch räumlich und zeitlich hochauflösende, fluoreszenzbasierte Analysemethoden. Im ersten Ergebnisteil wird ein neuartiges Lipid-Interkalationssystem vorgestellt. Das System beruht auf einer speziellen Lipid-Zusammensetzung aus neutralen und positiv geladenen Lipiden sowie fluoreszenzmarkierten Molekülen, welche, gemischt in einem bestimmten molaren Verhältnis und ohne Zugabe fusionserzeugender Proteine, mit der PM eukaryotischer Zellen fusionieren können. Es wird die Interkalation biologisch relevanter Glycerophospholipide, Sphingolipide, Glycosphingolipide sowie Sterole gezeigt und deren sub-zelluläre Lokalisation untersucht. Die Effizienz des Systems wird mit einem etablierten, Protein-basierten Interkalationssystem verglichen sowie potenziell zytotoxische Effekte untersucht.

Im zweiten Ergebnisteil wird anschließend die zur Fusion kritische Lipid-Zusammensetzung dieser fusogenen Liposomen untersucht, indem die einzelnen Lipid-Komponenten systematisch gegen Lipide anderer Eigenschaften ausgetauscht werden. Hier erfolgt die Analyse zum einem qualitativ durch konfokale Mikroskopie und quantitativ durch eine neuartige, durchflusszytometrische Analyse, welche in der Lage ist, aufgrund spezieller Fluorophoreigenschaften verschiedene Aufnahmewege (Endozytose & Fusion) unterscheiden zu können. Die zur Fusion notwendigen Lipide werden mit strukturell ähnlichen Lipiden, welche keine Fusion auslösen, verglichen und der Fusionsmechanismus vor dem Hintergrund der beobachteten Unterschiede diskutiert.

Im dritten Teil dieser Arbeit werden fusogene Liposomen verwendet, um biologisch relevante, fluoreszenzmarkierte Lipide in PMs kardialer Fibroblasten zu interkalieren. Die Diffusion verschiedener Lipid-Arten wird anschließend zeitlich hochaufgelöst mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie untersucht. Dabei werden im Besonderen proteinreiche, adhärierte Membranbereiche analysiert und mit nicht-adhären Bereichen der PM verglichen. Die Ergebnisse dieser Analyse werden anschließend durch Verwendung eines Membran-Modellsystems weiter analysiert, um Rückschlüsse zu beobachteten, Lipid-spezifischen Effekten in zellulären Membranen schließen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

In diesem Kapitel werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären Zellen und Zelllinien angegeben, Isolations- und Kulturbedingungen skizziert sowie grundlegende zellbiologische Arbeitstechniken beschrieben.

2.1.1 Kulturbedingungen von Ovarienzellen des chinesischen Hamsters, Subtyp K1

Immortalisierte Ovarienzellen des chinesischen Hamsters, Subtyp K1 (*CHO-K1*) wurden bei *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA) gekauft. Die Kultivierung erfolgte in *Dulbeccos modified eagles medium-F12* (DMEM-F12; Sigma, Taufkirchen, Deutschland), ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % antibiotisch/antimykotischer Penicillin/Streptomycinlösung (je 10 000 Einheiten/ml) in 75 cm² Zellkulturflaschen. Dabei wurde eine Konfluenz von 80 % nie überschritten. Während der Kultivierungs- und der Experimentalphase herrschten gleichbleibende Umgebungsbedingungen von 37°C und 5 % CO₂ Konzentration bei gesättigt feuchter Atmosphäre vor. Für Fusionsexperimente mit nachfolgender lichtmikroskopischer Analyse wurden 6000 Zellen zwei Tage vor Experimentbeginn auf Fibronectin-beschichtete (human; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) Hochpräzision-Mikroskopiekammern ausgesät (siehe Kapitel 2.1.7). Für Fusionsexperimente mit nachfolgender durchflusszytometrischer Analyse wurden je 200 000 Zellen in jede Kammer einer 24-Well Kulturschale ausgesät.

2.1.2 Isolation und Kulturbedingungen von kardialen Fibroblasten und Myozyten aus Rattenembryonen

Kardiale Fibroblasten und Myozyten wurden aus Herzen von Rattenembryonen, wie in Referenz [32] beschrieben, isoliert. Eine schwangere Ratte (Tag 18; Wistar, Charles River, Sulzfeld) wurde mit CO₂ betäubt, anschließend unter einer Guillotine dekapitiert und der Bauchraum geöffnet. Die Rattenembryonen wurden aus dem Uterus entfernt,

mit einer Schere dekapitiert und der Brustraum vorsichtig geöffnet. Das Herz und die Lunge wurden mit einer Feinpinzette entfernt. Unter dem Stereomikroskop wurde das Lungengewebe und der Herzbeutel entfernt. Die intakten Herzen wurden sofort in 15 ml eiskalter *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS; Sigma) gesammelt. Nachdem alle Herzen auf diese Weise isoliert wurden, wurden sie mit einer Pasteurpipette in 15 ml neues, eiskaltes HBSS überführt. Die Herzen wurden ohne HBSS in eine Zellkulturschale gegeben und mit zwei Skalpellenspitzen in ca. 1 mm³ große Stücke zerteilt, in 8 ml einer 37°C warmen Trypsin-EDTA Lösung (0,5 % Trypsin; 0,2 % EDTA; TE; Sigma) überführt und 8 min bei 37°C inkubiert, um die zusammenhängenden Gewebestücke aufzuschließen. Durch minutiöses Aufschütteln der Suspension konnte ein gleichmäßiger enzymatischer Aufschluss erreicht werden, wobei man die Gewebefragmente eine Minute vor Ende der Inkubationszeit auf den Boden des Röhrchens absinken ließ. Der Überstand wurde verworfen und die Gewebefragmente anschließend 3 min mit 10 000 Einheiten DNase (Sigma) unter leichtem Schütteln inkubiert und für den zweiten Verdauungsschritt erneut in 8 ml einer 37°C warmen TE-Lösung überführt und für 8 min bei 37°C gehalten. Der Überstand wurde wieder von den sedimentierten Gewebefragmenten getrennt, diesmal aber mit 7 ml Passivierungslösung (20 % FKS in *F10 Ham's medium*) versetzt, um den Verdauung zu stoppen, und danach auf Eis gelagert. Die Gewebefragmente wurden ein zweites mal mit 10 000 Einheiten DNase versetzt und 3 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgte ein dritter Verdauungsschritt mit 8 ml 37°C warmer TE-Lösung für 8 min. Der Überstand wurde entnommen und mit 7 ml Passivierungslösung versetzt. Anschließend wurden beide Zellsuspensionen 10 min bei 4°C und 200× g zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand entnommen und verworfen, sowie beide zellhaltigen Sedimente in 1 ml 37°C warmen Myozytenmedium resuspendiert. 500 000 Zellen wurden anschließend in eine 28,2 cm² Zellkulturschale (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Am ersten Tag nach Isolation wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) einmal gewaschen und anschließend mit 3 ml 37°C warmen Myozytenmedium (*F10 Ham's medium*; *MM*⁺; Sigma) aufgefüllt. Während der Kultivierungs- und der Experimentalphase herrschten gleichbleibende Umgebungsbedingungen von 37°C und 5 % CO₂ Konzentration bei gesättigt feuchter Atmosphäre vor.

Die hier beschriebene Isolationsmethode lieferte laut Banerjee et. al. ca. 64 % kardiiale Fibroblasten und 30 % kardiiale Myozyten [11]. Auf die Isolation folgte eine 5-tägige Proliferationsphase, bei der das Medium alle 2 Tage ausgetauscht wurde. Dies resultiert in Myofibroblasten mit reifen, 2-5 µm großen Fokaladhäsionen [57] und sehr niedriger Zellteilungsrate [28].

Für Fusionsexperimente und Lipiddiffusionsanalysen wurden 10 000 Primärzellen zwei Tage vor Experimentbeginn auf Fibronectin-beschichtete (human; BD Biosciences) Hochpräzisions-Mikroskopiekammern ausgesät (siehe Kapitel 2.1.7).

2.1.3 Zell-Vitalitätstest

$7,5 \times 10^4$ CHO-K1 Zellen wurden auf kleine Zellkulturschalen ($\varnothing = 3.5$ cm; Greiner, Solingen, Deutschland) einen Tag vor Experimentbeginn ausgesät und wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben kultiviert. Am nächsten Tag hatte die Kultur eine Konfluenz von etwa 40 % erreicht und wurde mit fusogenen Liposomen bestehend aus DOPE/DOTAP/DiR/Bodipy FL-SM = 1/1/0.05/0.05 w/w behandelt (siehe Kapitel 2.3.1). Um eine Verteilung der interkalierten Lipide zu ermöglichen, wurden die Zellen 10 min weiter inkubiert. Anschließend wurden sofort, nach 24 h und nach 48 h die behandelten Zellen und eine unbehandelte Kontrolle trypsiniert, pelletiert und die Pellets in PBS resuspendiert. Die Zellsuspension (20 μ l) wurde anschließend mit 0.5 % Trypan Blau (Sigma)/0.9 % NaCl-Lösung (80 μ L) für 2 min bei 37°C inkubiert. Trypan Blau reichert sich in toten Zellen an, wodurch sich diese identifizieren ließen. Die relative Anzahl lebender Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h) durch 5 unabhängige Experimente mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.1.4 Identifikation von Zellorganellen mit Organell-spezifischen Markermolekülen

2.1.4.1 Plasmamembran-Färbung

Die Plasmamembran von CHO-K1 Zellen wurde mit dem lipophilen Marker-Molekül *Vybrant-DiI* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) gefärbt, indem die adhärenen Zellen 5 min bei 37°C mit 5 μ M *Vybrant-DiI* in DMEM-F12 inkubiert, einmal mit PBS-Puffer gewaschen und sofort mit einem konfokalen Mikroskop (cLSM) analysiert wurden, um einer Anreicherung des Farbstoffes im Endomembransystem zeitlich weitestgehend ausschließen zu können.

2.1.4.2 Golgi-Apparat- /Endoplasmatisches Retikulum - Färbung

Der Golgi Apparat (GA) und das endoplasmatische Retikulum (ER) wurden gemäß der von Lipsky et al. etablierten Methode markiert [113]. Dazu wurden adhärenente CHO-K1 Zellen für 30 min bei 4°C mit 5 μ M Bodipy FL Ceramid (Life Technologies) komplexiert an BSA (siehe Kapitel 2.3.3) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mehrmals mit kaltem PBS-Puffer gespült und mit frischem Zellkulturmedium bei 37°C für weitere 30 min inkubiert. Die Proben wurden erneut gewaschen und mit einem cLSM analysiert.

2.1.4.3 Lysosomen-Färbung

Lysosomen wurden mit dem Markermolekül *LysoTracker Green DND-26* (Life Technologies) markiert. Adhärente CHO-K1 wurden 30 min bei 37°C mit 50 nM *LysoTracker*, verdünnt in Zellkulturmedium, inkubiert. Die Markierungslösung wurde abgesaugt, durch frisches Medium ersetzt und die Proben wurden anschließend mit einem cLSM analysiert.

2.1.5 Transfektion durch Elektroporation

Um die Co-Lokalisation von Fokaladhäsions-assoziierten Proteinen und den als Fokaladhäsionen interpretierten Mustern in Interferenz-Reflexionsbildern (siehe auch Kapitel 2.5.4) eindeutig beweisen zu können, wurden primäre Myofibroblasten und Myozyten sechs Tage nach Isolation mit GFP-Vinculin, einem Fokaladhäsion-assoziierten Protein, transfiziert. Für die Transfektion durch Elektroporation wurde ein Transfektionsreagenz (*primary rat cardiomyocytes nucleofector kit*; Lonza, Köln, Deutschland) verwendet. Pro Transfektion von 500 000 primären Zellen wurden 82 µl Nucleofector-Lösung und 18 µl Supplement mit 5 µg Plasmid-DNA gemischt. Der Nucleofector wurde auf das dem Kit beiliegende Programm eingestellt. Die Zellen wurden trypsinisiert und pelletiert und in der Transfektionslösung mit Plasmid-DNA resuspendiert. Danach wurden sie schnellstmöglich in die Elektroporationselektrode überführt, elektroporiert und in frischem MM^+ -Medium verdünnt. Danach wurden sie in entsprechender Zellzahl auf Lebendzell-Mikroskopieschalen (siehe Kapitel 2.1.7) ausgesät. 6 h nach Transfektion wurden die adhärenierten Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit frischem MM^+ -Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit dem cLSM analysiert.

2.1.6 Immunohistochemische Färbung

Um die aus der in Kapitel 2.1.2 beschriebenen kardialen Myofibroblasten und Myozyten morphologisch besser voneinander unterscheiden zu können, wurde eine immunohistochemische Färbung durchgeführt. Dabei sollten Hinweise auf mögliche, im Hellfeld bzw. Interferenz-Reflexionsbild sichtbare und ohne spezifische Färbung erkennbare Unterschiede gewonnen werden. Es wurde eine Doppelfärbung gegen die Proteine Calnexin, ein transmembranes Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER), und gegen Aktin, das strukturbildende Protein des Aktin-Zytoskeletts, durchgeführt.

Vor der Färbung wurden die auf Lebendzell-Mikroskopieschalen adhärenierten, primären Zellen mit einer 3,7%-igen Paraformaldehydlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 30 min bei 37°C fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen in 30 mM Glycin-Lösung (Sigma) gewaschen. Die Membran wurde so sanft wie möglich mit 0,2%

Triton-X 100 für 5 min permeabilisiert, um ein Eindringen der Antikörper ins Zellinnere zu ermöglichen, gleichzeitig aber so wenig Membran wie möglich auszuwaschen. Die Proben wurden drei mal mit PBS-Puffer gespült. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde mit einer 5 %-igen BSA-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um nach einem Waschschrift mit dem primären Antikörper zu inkubieren. Zur Markierung des ER wurde folgender Antikörper verwendet:

Primärer Antikörper:

anti-Calnexin; polyclonal aus Hase; Reaktivität gegen Maus, Ratte, Mensch, Seidenaffe (Abcam; Cambridge, Großbritannien).

Die Zellen wurden mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 (v/v) in 1 %-iger BSA-Lösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Daraufhin wurde 3 mal mit 1 % BSA/0,2 % Tween-20-Lösung gewaschen, um unspezifisch gebundene und ungebundene Antikörper zu entfernen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und den histochemischen Markern:

Sekundärer Antikörper:

anti-Hase-Alexa555; polyclonal aus Affe; Reaktivität gegen Hasen-IgG schwere & leichte Kette (Abcam)

Histochemische Färbung:

Alexa448-Phalloidin; färbt Aktin-Zytoskelle (Life Technologies)

DraQ-5; färbt DNA (Abcam)

Der sekundäre Antikörper und die beiden histochemischen Marker wurden jeweils 1:1000 in 1 %-iger BSA-Lösung (v/v) verdünnt und für 90 min bei Raumtemperatur auf der Probe gelassen. Auch hier erfolgte ein 3-maliger Waschschrift mit 1 % BSA/0,2 % Tween-20-Lösung. Die Proben wurden mit PBS-Puffer aufgefüllt und anschließend mit dem LSM analysiert.

2.1.7 Herstellung von Lebendzell-Mikroskopieschalen

Viele der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse wurden durch räumlich und zeitlich hochauflösende lichtmikroskopische Methoden erzielt. Dabei waren spezielle Anforderungen an Mikroskopieschalen, auf denen Zellen kultiviert und analysiert wurden, gestellt. Diese sollten zum Einen eine ausreichend große Kultivierungsfläche bieten, von oben für Fusionsexperimente gut zugänglich und zu öffnen sein, gleichzeitig verschließbar und sterilen Kulturbedingungen genügen und des Weiteren über dickenkorrigierte Präzisionsdeckgläser verfügen. All diese Anforderungen konnten nur durch eigens hergestellte Schalen erfüllt werden.

Bei der Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven spielt die korrekte Dicke des Deckgläschens eine entscheidende Rolle. Abweichungen der Dicke des Deckgläschens von den

durch das Objektiv vorgegebenen Werten beeinflussen insbesondere bei Fluoreszenz-Korrelations-Messungen die ermittelten Diffusionszeiten maßgeblich [48]. Daher wurden alle lichtmikroskopischen Experimente (konfokale Laser Scanning Mikroskopie und Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie) mit eigenhändig hergestellten Hochpräzisions-Mikroskopiekammern durchgeführt.

Eine im Durchmesser 3 cm große Kulturschale (Greiner) besaß in ihrer Mitte eine Ausbohrung mit einem Durchmesser von 1,8 cm. Ein dicken-korrigiertes Hochpräzisionsdeckglas ($170 \pm 5 \mu\text{m}$, $22 \times 22 \text{ mm}$; Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurde in einem ersten Schritt in Isopropanol (VWR, Darmstadt, Deutschland) in einem Ultraschallbad für 15 Minuten gereinigt, gefolgt von einem zweifachen Reinigungsschritt mit hochreinem Wasser, ebenfalls zweimal 15 Minuten in Ultraschall. Diese chemisch und mechanisch gereinigten Deckgläser wurden in einen Edelstahlrahmen überführt und weiter in einem Niederdruck-Plasmaofen (Diener Elektronik, Ebhausen, Deutschland) für 3 Minuten gereinigt. Dies führte zu Deckgläsern mit extrem sauberer und gleichzeitig hydrophiler Oberfläche. Nach der Reinigungsprozedur wurde das Deckglas gegen die Unterseite der vor gebohrten Kulturschale geklebt. Als Kleber wurde kreuzvernetztes Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet, hergestellt aus einem vinylterminierten PDMS-Polymergemisch und einem Methylhydroxiloxan-Dimethylsiloxan-Copolymer mit Katalysator in einem Verhältnis von 10:1 w/w (Sylgard 184; Dow Corning Co., MI, USA). Die Aushärtung erfolgte über Nacht bei 60°C . Vor der Beschichtung mit Fibronectin (FN) und dem Aussäen der Zellen wurden die Schalen mit UV-Licht sterilisiert.

2.2 Lipide

Grundlage aller Versuche mit Liposomen, Riesenvesikeln und unterstützten Lipiddoppelschichten waren diverse nicht-fluoreszente und fluoreszenzmarkierte Lipide sowie synthetische, amphipatische Moleküle. Dieses Kapitel soll einen Überblick über die wichtige Nomenklatur und die entsprechenden Abkürzungen sowie die Strukturformeln der verwendeten Moleküle geben. Bei den fluoreszenzmarkierten Lipiden wird zusätzlich der Emissionsbereich des entsprechenden Fluorophores angegeben.

Alle Spektren wurden mit einem Fluoreszenzspektrophotometer in liposomaler Form aufgenommen (Fluorolog-3; HORIBA Jobin Yvon, Edison NJ, USA). Dazu wurden die markierten Moleküle zu *1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-Phosphocholin* (*DOPC*) in einem Verhältnis von *DOPC/DiIC₁₈(γ)*, *DOPC/ β -Bodipy FL-C₁₂HPC* und *DOPC/Bodipy-cholesteryl ester* von 200:1 (mol/mol) gemischt und Liposomen präpariert (siehe Kapitel 2.3.1). Die Gesamtlipidkonzentration betrug nach Präparation 2 mg/ml in 20 mM (*2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure*) Puffer (HEPES; VWR, Darmstadt, Deutschland). Alle Lipide befanden sich bei Auslieferungszustand entweder in Chloroform gelöst

oder lagen als lyophilisiertes Pulver vor, wobei die Lipide vor Versuchsbeginn in Chloroform (Merck) aufgenommen wurden.

2.2.1 Neutrale Lipide

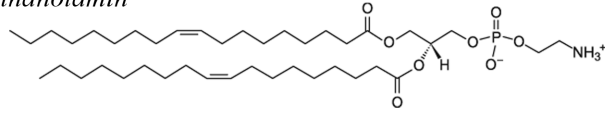
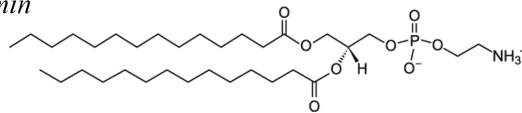
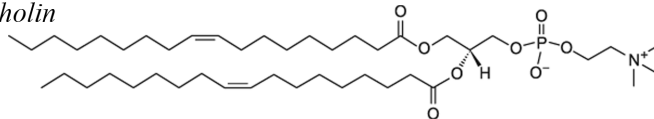
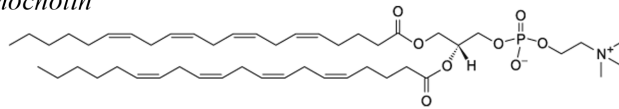
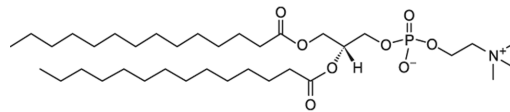
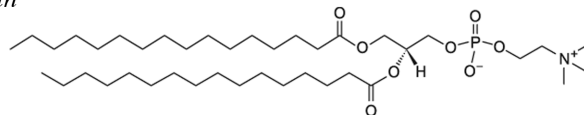
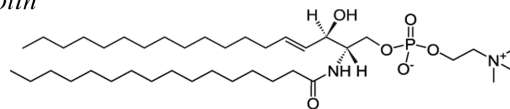
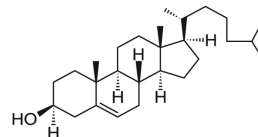
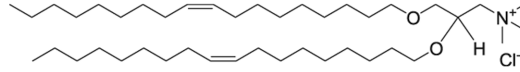
1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin(DOPE)
MW = 744 g/mol*1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin*(DMPE)
MW = 636 g/mol*1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin*(DOPC)
MW = 786 g/mol*1,2-Diarachidoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin*(DAPC)
MW = 846 g/mol*1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin*(DMPC)
MW = 678 g/mol*1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin*(DPPC)
MW = 734 g/mol*N-Palmitoyl-D-Erythro-Sphingosylphosphorylcholin*(SM)
MW = 703 g/mol*Cholesterol*(Chol)
MW = 386 g/mol

Abbildung 2.1: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten, neutralen Lipide. Angegeben sind IUPAC-Name, Molekulargewicht (MW) sowie Strukturformel.

2.2.2 Positiv-geladene Lipide und biotinylierte Lipide

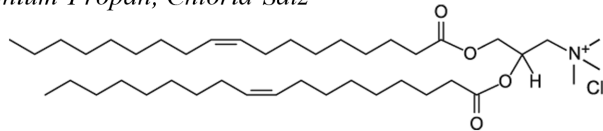
1,2-Di-O-Octadecenyl-3-Trimethylammoniumpropan, Chlorid-Salz

(DOTMA)
MW = 670 g/mol



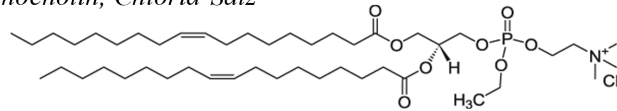
1,2-Dioleoyl-3-Trimethyl-Ammonium-Propan, Chlorid-Salz

(DOTAP)
MW = 698 g/mol



1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Ethylphosphocholin, Chlorid-Salz

(DOEPC)
MW = 850 g/mol



Biotinyliertes Lipid

1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(cap biotiny), Chlorid-Salz

(CapBio-DHPE)
MW = 1105 g/mol

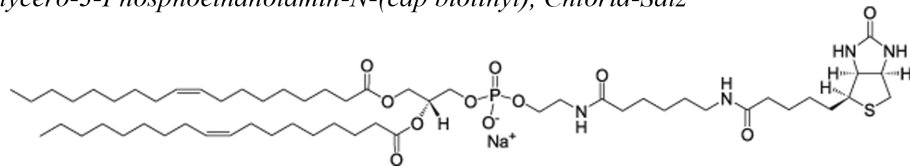


Abbildung 2.2: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten, positiv geladenen Lipide sowie biotinylierten Lipide. Angegeben sind IUPAC-Name, Molekulargewicht (MW) sowie Strukturformel.

2.2.3 Kettenmarkierte Lipide

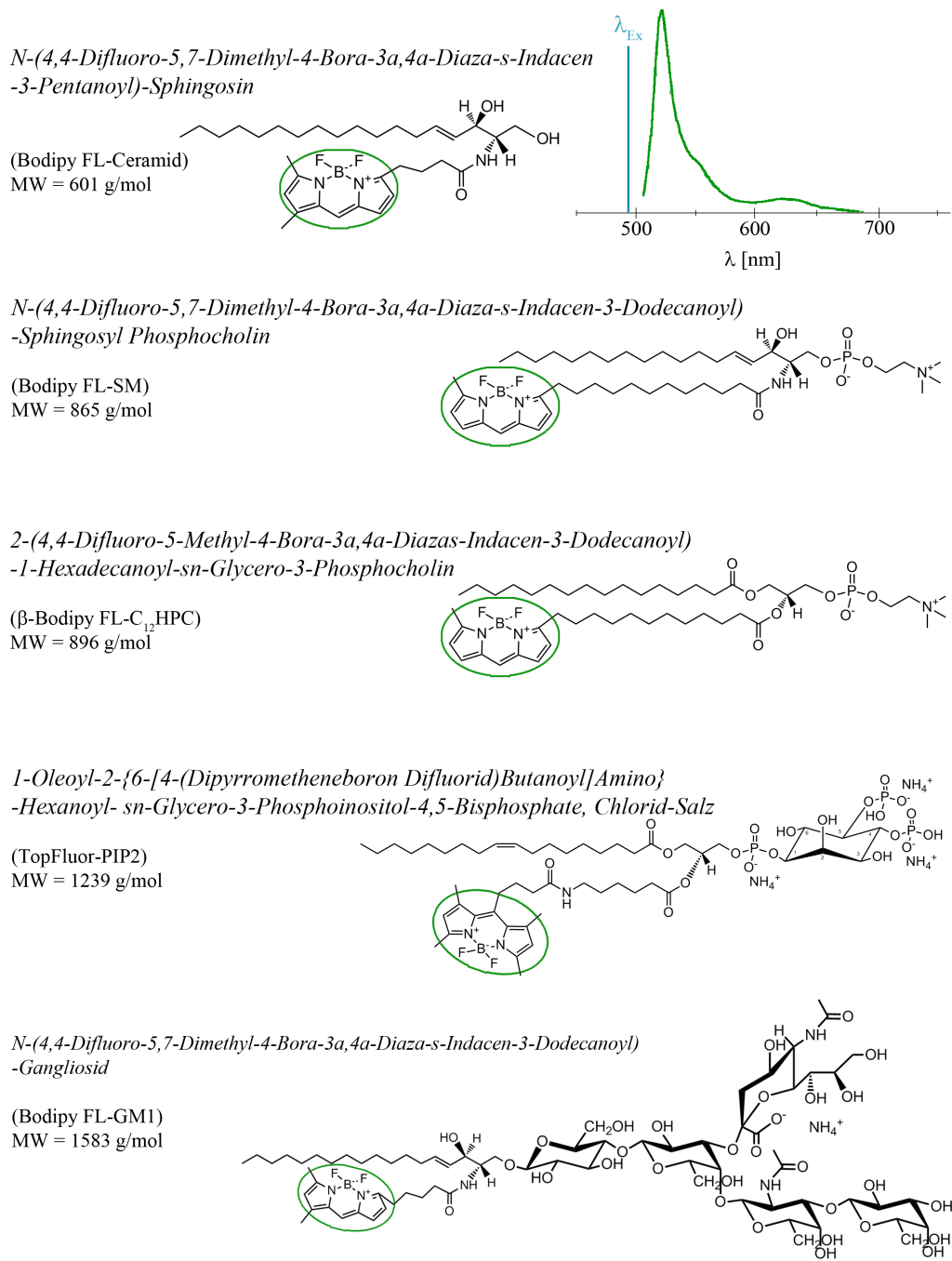
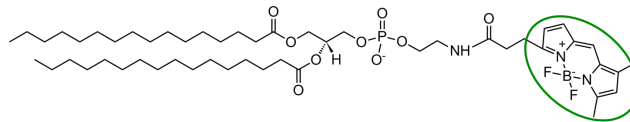


Abbildung 2.3: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten kettenmarkierten Lipide. Angegeben sind IUPAC-Name, Molekulargewicht (MW), Strukturformel sowie das Emissionsspektrum des *Bodipy FL*-Fluorophors. Der TopFluor-Fluorophor besitzt ein annähernd identisches Emissionsspektrum wie *Bodipy*. Das Intensitätsmaximum liegt bei 503 statt 520 nm.

2.2.4 Kopfmakierte Lipide, markierte Sterole und synthetische, amphipatische Moleküle

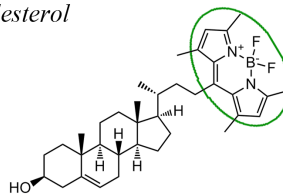
N-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacen-3-Propionyl)-
-1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin, Triethylammonium-Salz

(Bodipy FI-DHPE)
MW = 1067 g/mol



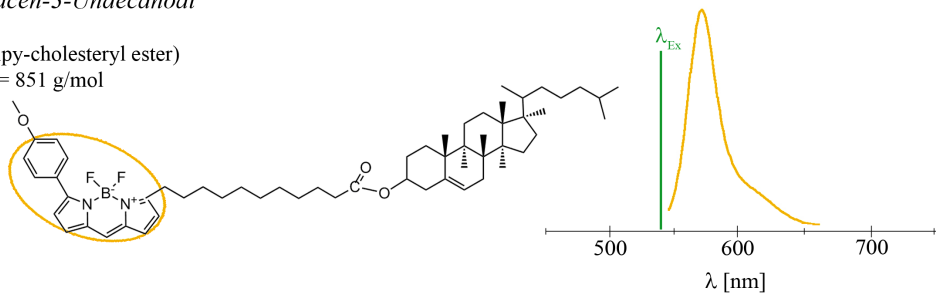
23-(Dipyrro-Metheneboron Difluorid)-24-norcholesterol

(TopFluor-Cholesterol)
MW = 577 g/mol



Cholesterol 4,4-Difluoro-5-(4-Methoxyphenyl)-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-
-Indacen-3-Undecanoat

(Bodipy-cholesteryl ester)
MW = 851 g/mol



1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanin Iodid

(DiIC18(7))
MW = 1013 g/mol

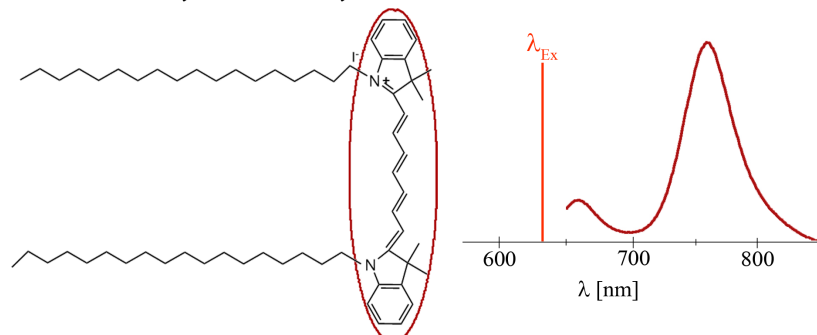


Abbildung 2.4: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten kopfmakierten Lipide, markierte Sterole und *DiIC*₁₈(7). Angegeben sind IUPAC-Name, Molekulargewicht (MW), Strukturformel sowie die Emissionsspektrum des *Bodipy*-Fluorophors und von *DiIC*₁₈(7), gemessen in liposomaler Form.

2.3 Fusogene Liposomen

Grundlage fast aller Lebendzelleexperimente waren fusogene Liposomen (FLs) [37, 99], welche zur Lipidinterkalation in Plasmamembranen in unterschiedlichen Zusammensetzungen hergestellt und analysiert wurden. In diesem Kapitel wird die Herstellung fusogener Liposomen ausgehend von den Lipid- bzw. aromatischen Molekülkomponenten vorgestellt, welche in dieser Doktorarbeit verwendet werden. Die im experimentspezifischen Zusammenhang verwendeten FLs werden dann an entsprechender Stelle kurz vorgestellt und beschrieben.

2.3.1 Herstellung fusogener Liposomen

Eine positiv geladene Lipidkomponente (e.g. *DOTAP*; siehe Kapitel 2.2.2) und eine neutral geladene Lipidkomponente (e.g. *DOPE*; siehe Kapitel 2.2.1) wurden in einem Verhältnis von 1:1 (w/w) in Chloroform:Ethanol (20:1 v/v) in einer totalen Lipidkonzentration von 1 mg/ml aufgenommen. Zu dieser Basis wurden entweder eine fluoreszenzmarkierte Komponente (beispielsweise *Bodipy FL-Ceramid*; siehe Kapitel 2.2.3) oder zwei fluoreszenzmarkierte Komponenten (beispielsweise *Bodipy FL-Ceramid* und *DiIC₁₈(7)*; siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4) in einem totalem Gewichtsanteil von 3-5% bezogen auf die Basis-Lipidkomponenten hinzugefügt. Gemäß dieser Mischungsgrundlage konnten folgende Lipid- bzw. Molekülmischungen experimentell hergestellt werden:

$$\begin{array}{l} \textit{DOPE} / \textit{DOTAP} / \textit{Molekül}_{\text{fluoreszent}} \\ 1 / 1 / 0.1 \text{ (w/w)} \end{array}$$

oder

$$\begin{array}{l} \textit{DOPE} / \textit{DOTAP} / \textit{Molekül A}_{\text{fluoreszent}} / \textit{Molekül B}_{\text{fluoreszent}} \\ 1 / 1 / 0.05 / 0.05 \text{ (w/w)} \end{array}$$

oder

$$\begin{array}{l} \textit{DOPE} / \textit{DOTAP} / \textit{Molekül A}_{\text{fluoreszent}} / \textit{Molekül B}_{\text{fluoreszent}} \\ 1 / 1 / 0.09 / 0.01 \text{ (w/w)} \end{array}$$

Nachdem die Basislipide und die fluoreszierenden Moleküle gemäß der oben angegebenen Verhältnisse gemischt wurden, wurde die Chloroform/Ethanol-Lösung unter Vakuum für 0,5 bis 1 h evaporiert. Der trockene Lipidfilm wurden sofort in 20 mM HEPES-Puffer pH

7,4 dispergiert, wobei durch Zugabe des entsprechenden Puffer-Volumens eine Gesamtlipidkonzentration von 2,1 mg/ml eingestellt wurde. Die Lösung wurde anschließend für 1-2 min auf einem Vortex-Mixer geschüttelt, wobei hauptsächlich multilamellare Liposomen entstanden. Die multilamellaren Liposomen wurden 10 min im Ultraschallbad in Zugabe von Eis homogenisiert, wodurch hauptsächlich kleine, unilamellare Liposomen entstanden. Die FLs wurden nach der Herstellung bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.2 Fusion von Liposomen mit der Plasmamembran tierischer Zellen

Auf eine mit adhärenierten Zellen bewachsene Fläche von ca. 2,5 cm² wurden 5 µl FLs in 500 µl 4°C kaltem Zellkultur-Medium (z.B. *DMEM*) zugegeben. Vor Zugabe der FLs wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS-Puffer gewaschen, dieser abgenommen und die kalte FL-*DMEM*-Lösung auf die Zellen pipettiert und für maximal 10 min bei 37°C inkubiert. Die Fusionseffizienz wurde am Mikroskop kontrolliert. Um nicht-fusionierte FLs weitestgehend entfernen zu können, wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit frischem Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Proben wurden anschließend bei 37°C mit einem cLSM analysiert.

2.3.3 Herstellung von Lipid/Rinderserum-Albumin - Komplexen

100 µM fluoreszenzmarkierter Lipide in Chloroform (25 µl) und 1 mM *DiIC₁₈(7)*-Stammlösung (2,5 µl) wurden in einem Glasröhrchen gemischt und unter Vakuum 1 h getrocknet. Die getrockneten Moleküle wurden in 200 µl Ethanol aufgenommen. Zwischenzeitlich wurden 3,4 g entfettetes Rinderserum-Albumin (BSA; Merck KGaA) einer HBSS/HEPES-Lösung zugefügt (10 mL HBSS und 10 mM HEPES, pH 7.4). Die Lipid-Ethanol Lösung (200 µl) wurde unter schnellem Rühren in die HBSS/HEPES Lösung (10 mL) injiziert. Dies führte zu einer finalen Konzentration von 250 nM fluoreszenzmarkiertem Lipid, 250 nM *DiIC₁₈(7)*, 5 µM BSA und 2% (v/v) Ethanol. Bei Färbung mit Lipid/BSA-Komplexen wurden adhärenente Zellen 30 min mit 2 ml der Lösung bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und mit frischem Kulturmedium weitere 4 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen konnten danach mit dem cLSM analysiert werden.

2.4 Modellsysteme

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit stellten die Experimente an biomimetischen Modellsystemen dar. Zum einen konnten solche Modellsysteme als definiertes Kalibrierungssystem

bei FCS-Messungen verwendet werden. Zum anderen konnten aufgrund der bekannten Zusammensetzung definierte Zustände geschaffen werden, um Effekte, welche bei den zellbiologischen Experimenten beobachtet wurden, nachbilden und somit deren mögliche Ursache verstehen zu können.

Um die phasenabhängige Separation von fluoreszenzmarkierten Lipiden zu überprüfen, wurden mit Hilfe der *Langmuir-Blodgett* Technik künstliche Lipiddoppelschichten auf Deckgläsern aufgebracht (*engl. Supported lipid bilayers; SLBs*). Unilamellare Riesenvesikel (*engl. Giant unilamellar vesicles; GUVs*) wurden einerseits zur Kalibrierung bei FCS-Messungen und andererseits zur Diffusionsanalyse in phasenseparierten GUVs hergestellt.

2.4.1 Langmuir-Blodgett-Technik

Die Langmuir-Blodgett Technik stellt eine Methode dar, um eine oder mehrere Lagen organischer Moleküle auf ein festes Substrat übertragen zu können. Sie wurde 1917 von Irving Langmuir vorgestellt und 1934 von Katherine Blodgett weiterentwickelt, um monomolekulare Filme von Fettsäuren auf Glasoberflächen physisorbieren zu können [17, 18]. Das Prinzip dieser Transfer-Methode ist in Abbildung 2.5 gezeigt.

Amphipatische Moleküle, z.B. Lipide in Chloroform, werden auf eine Subphase, z.B. Wasser, aufgetropft. Diese richten sich gemäß ihrer hydrophilen Kopfgruppen in Kontakt mit der Subphase an der Grenzfläche Subphase/Luft aus. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet ist, komprimiert eine Teflonbarriere die frei beweglichen Moleküle soweit, bis eine gewisse Oberflächenspannung erreicht ist. Diese Spannung wird mit einem Drucksensor gemessen. Der Drucksensor ist in diesem Fall ein Wilhelmy-Plättchen, aufgehängt an einer Feinwaage (nicht gezeigt) und misst die Verringerung der Oberflächenspannung. Nach erfolgter Komprimierung wird das zuvor gereinigte und in die Subphase eingetauchte Deckglas mit Hilfe eines Schrittmotors, an welchem ein Haltearm befestigt ist (*engl. dipper*), langsam und kontinuierlich aus dieser heraus gezogen. Dabei schiebt die Barriere in gleichem Maße den monomolekularen Film weiter nach. Auf diese Weise erhält man bei dem sog. 1. Transfer eine Monoschicht der zuvor aufgetropften Moleküle auf dem Träger.

Diesen Vorgang kann man in umgekehrter Richtung wiederholen, d.h. der beim 1. Transfer beschichtete Träger wird durch eine komprimierte Molekülschicht „zurück“ in die Subphase geschoben. Dies wird als 2. Transfer bezeichnet. Dabei entsteht folglich eine bimolekulare Schicht. Diese Schicht kann sich in ihrer Zusammensetzung von der ersten unterscheiden. Eine alternative des 2. Transfers stellt die in dieser Arbeit verwendete *Langmuir-Blodgett-Langmuir-Schäfer* Technik dar [31]. Hier ist der Träger horizontal orientiert mit der ersten monomolekularen Schicht parallel zur Wasser-Luft Grenzfläche

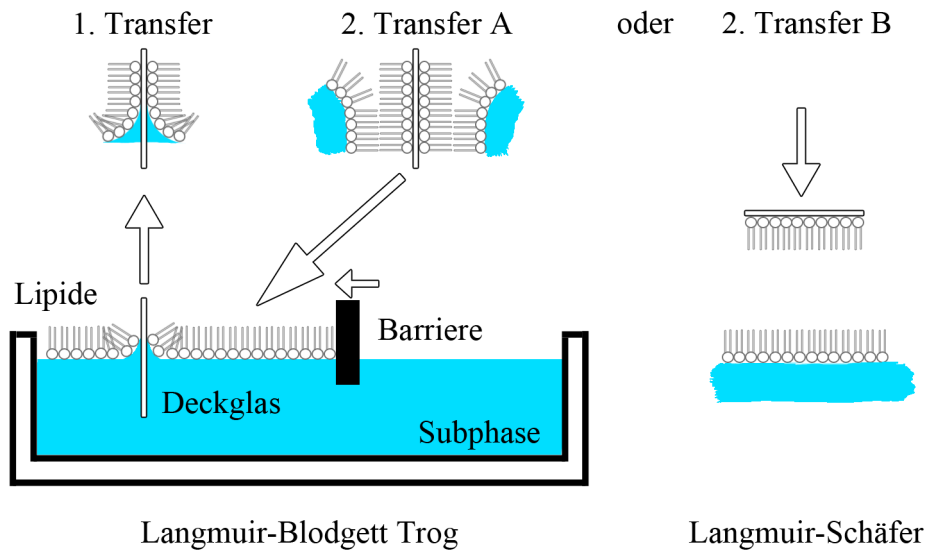


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Langmuir-Blodgett bzw. Langmuir-Schäfer Technik. Amphipatische Moleküle werden dabei auf eine Subphase (z.B. Wasser) aufgetropft. Sie orientieren sich dabei gemäß ihres chemischen Interaktionspotential auf der Subphase. Eine Barriere komprimiert die Moleküle zu einem monomolekularen Film. Wird nun ein fester Träger (z.B. ein Deckglas) aus der Subphase gezogen, wird der komprimierte Film dabei auf den Träger übertragen. Der 2. Transfer erfolgt in umgekehrter Reihenfolge entweder durch Wiedereintauchen in die Subphase mit orthogonal zur Luft/Wasser-Grenzfläche orientiertem Deckglas oder parallel zur Grenzfläche. Die letztere Methode wird als Langmuir-Schäfer Technik bezeichnet.

ausgerichtet. Auf der Subphase befindet sich die bereits komprimierte zweite Schicht. Nun wird der Träger langsam Richtung Grenzfläche bewegt und bei Kontakt mit dieser schnell in die Subphase gedrückt. Dabei wird die zweite Schicht auf die Erste übertragen. Derart hergestellte Doppelschichten eignen sich hervorragend, um bspw. Phasenübergänge in biomimetischen Membranen [62] oder die Bildung von Lipid-Mikrodomänen genauer analysieren zu können [40].

2.4.1.1 Präparation von unterstützten Lipiddoppelschichten

Unterstützte Lipiddoppelschichten (engl. *supported lipid bilayers*; SLBs) wurden mit der oben beschriebenen Langmuir-Blodgett-Langmuir-Schäfer Technik mit Hilfe einer Filmwaage (Nima, Coventry, Großbritannien) hergestellt. Als Träger wurde ein dickenkorrigiertes und wie in Kapitel 2.1.7 beschrieben gründlich gereinigtes Deckglas verwendet.

Die Filmwaage wurde zu Beginn jedes Versuchstages mit Chloroform-getränkten Tüchern gewischt und anschließend zehnmal mit hochreinem Wasser gespült. Danach wurde die Wanne mit hochreinem Wasser gefüllt und das Deckglas, angebracht an dem Haltearm des Schrittmotors, langsam in die Subphase bewegt. Anschließend wurden die Lipide des 1. Transfers aufgetropft. Hierzu wurde eine Lipidmischung aus *DOPC/SM/Chol* (1/1/1 mol/mol; Volumen $v = 20 \mu\text{l}$; Gesamtlipidkonzentration $\beta = 1 \text{ mg/ml}$) verwendet. Nach zehnminütiger Evaporationsphase wurde die Barriere mit einer Geschwindigkeit von 20 mm/min bewegt, um die Lipide bis zu einer Oberflächenspannung von 25 mN/m zu komprimieren. Um potenzielle Defekte ausheilen zu lassen, wurde die komprimierte Membran 30 min bei dieser Oberflächenspannung belassen. Die Membran wurde anschließend bei einer Geschwindigkeit von 5 mm/min auf das Deckglas übertragen. Die transferierte Membran wurde an Luft gehalten, bis die zweite Membran ebenfalls mit einer Oberflächenspannung von 25 mN/m auf der Subphase komprimiert war. Die Lipidmischung der zweiten Membran bestand aus *DOPC/SM/Chol/Molekül A_{fluoresz.}/Molekül B_{fluoresz.}* (1/1/1/0.001/0.001 mol/mol; $v = 20 \mu\text{l}$; $\beta = 1 \text{ mg/ml}$). Die auf dem Deckglas befindliche Membran wurde mit Hilfe einer Teflonpinzette parallel zur Luft/Wasser-Grenzfläche ausgerichtet und vorsichtig in Nähe der komprimierten Membran gebracht. Bei Kontakt mit dieser wurde das gesamte Deckglas schnell in die Subphase gedrückt. Danach wurde das Deckglas mit der Lipiddoppelschicht unter Wasser in einen mit Wasser gefüllten Edelstahlrahmen eingebaut und konnte danach transportiert und mikroskopisch analysiert werden.

2.4.2 Unilamellare Riesenvesikel (GUVs)

Mit unilamellaren Riesenvesikeln (*engl. Giant unilamellar vesicles; GUVs*) lässt sich ein biomimetisches System herstellen, bei dem man ein definiertes inneres und äußeres Milieu schaffen [123], Adhäsionsstudien durchführen [124, 125] oder die phasenabhängige Separation von Lipiden beobachten kann [147]. Somit eignen sich GUVs hervorragend als Modellsystem zur Untersuchung der zellulären Membran. Durch den großen Durchmesser von 10 bis 50 μm lassen sich die Vesikel lichtmikroskopisch analysieren. Die Adhäsion von GUVs an ein Deckglas kann über die Interaktion von Biotin und Neutravidin (NAV) realisiert werden. NAV ist ein tetrameres Protein mit jeweils zwei Bindungsstellen für Biotin auf jeder Seite des Proteins [138]. Biotin bindet an eine der NAV-Bindungsstellen über zehn Wasserstoffbrücken sowie einen übelagerte, hydrophobische Wechselwirkung. Dies führt zur stärksten momentan bekannten spezifischen Interaktion mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-15} M [115]. Um eine feste Adhäsion der GUVs an ein Deckglas zu ermöglichen, wurde den GUVs *CapBio-DHPE* (siehe Kapitel 2.2.2) zugefügt. Das Deckglas wurde mit Neutravidin beschichtet. Dadurch konnten GUVs stabil an das Deckglas

adhäriert werden, was zu geringen Membranfluktuationen führte.

2.4.2.1 Herstellung von GUVs

GUVs wurden nach der Elektroschwellmethode von Dimitrov et al. hergestellt [41]. Die Parameter des Schwellprozesses wurden nach Dimova et al. angepasst, um auch phasenseparierte Vesikel mit einem Durchmesser $> 30 \mu\text{m}$ erfolgreich herstellen zu können [42]. Für Kalibrierungsmessungen mit dem ConfoCor 3-Modul wurden GUVs aus *DOPC/ β -Bodipy C_{12} HPC* (1/0,0002 mol/mol) hergestellt. Phasenseparierte GUVs für FCS-Messungen wurden aus

$$\begin{aligned} & \textit{DOPC/SM/Chol/CapBio-DHPE/DiIC}_{18}(\gamma)/\textit{Molekül } B_{\text{fluoresz.}} \\ & (1/1/1/0,003/0,005/0,0002 \text{ mol/mol}; \beta = 1 \text{ mg/ml}) \end{aligned}$$

hergestellt, wobei *DiIC*₁₈(γ) als Marker für die flüssig-ungeordnete (*engl. liquid-disordered; L_D*) Phase verwendet wurde [14]. Phasenseparierte GUVs für Aufnahmen mit dem cLSM wurden aus

$$\begin{aligned} & \textit{DOPC/SM/Chol/CapBio-DHPE/DiIC}_{18}(\gamma)/\textit{Molekül } B_{\text{fluoresz.}} \\ & (1/1/1/0,003/0,005/0,005 \text{ mol/mol}; \beta = 1 \text{ mg/ml}) \end{aligned}$$

hergestellt. Dazu wurden 50 μl der in Chloroform befindlichen Lipide auf zwei Indiumzinnoxid-beschichtete Glasscheiben aufgetropft und mit einer gereinigten Pasteurpipette verteilt. Das Chloroform wurde für 60 min im Vakuum abgedampft. Die beiden Glasscheiben wurden anschließend in einen Teflonrahmen eingebaut, welcher einen Abstand von 1 mm zwischen den Glasscheiben ermöglichte. Der Versuchsaufbau wurde auf 48°C erwärmt, 2 ml einer vorgewärmten Sukroselösung (280 mOsm/l) wurden zupipettiert. An die Glasscheiben wurden anschließend zwei Elektroden angelegt und über einen Funktionsgenerator eine Wechselspannung von 0,2 V bei 10 Hz für 10 min angelegt. Auf diese Vorschwell-Phase folgte eine Erhöhung der Spannung auf 0,5 V für 20 min, während dieser Hauptschwell-Phase wurde die Spannung alle 20 min um 0,5 V bis auf 2 V erhöht. Diese Spannung wurde weitere 60 min beibehalten, worauf eine Abtrennungsphase der Vesikel vom Glas bei 2 V und 5 Hz für 5 min folgte. Dieses Protokoll führte zu großen GUVs mit einem Durchmesser von ca. 40 μm . Die GUVs wurden im letzten Schritt langsam über Nacht auf Raumtemperatur gekühlt und in die in Kapitel 2.4.2.2 beschriebenen Vesikel-Mikroskopiekammern transferiert.

2.4.2.2 Vesikel-Mikroskopiekammern

Mikroskopieschalen für Vesikelexperimente mussten über dickenkorrigierte Deckgläser, geeignet für FCS-Experimente, verfügen. Zusätzlich war bei diesen eine größtmögliche Gasdichte zur Evaporationseinschränkung gefragt. Aus diesem Grund wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Guillermo Beltramo (ICS-7) und Dieter Strobel (mechan. Werkstatt und Konstruktion; ICS-TAK) Polypropylenkammern mit Silikondichtringen entworfen und hergestellt. Alle Experimente an Riesenvesikeln wurden in speziell für diesen Versuch hergestellten und verschließbaren Mikroskopiekammern durchgeführt. Die Kammer hatte den Vorteil, dass zum einen optisch sehr hochwertige Deckgläser verwendet werden konnten, zum anderen konnten durch Verdunstung des Puffers bedingte Änderungen in der Osmolarität und somit eine dadurch bedingte Vesikeldeformation über einen Zeitraum von 2 Tagen größtmöglich ausgeschlossen werden.

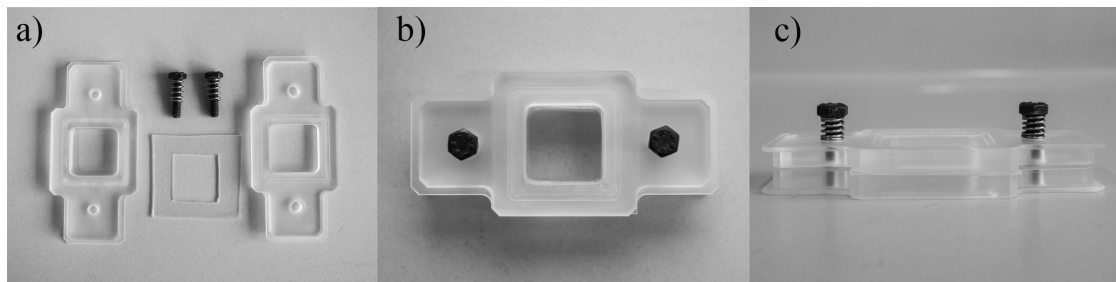


Abbildung 2.6: a) Komponenten der Vesikel-Mikroskopiekammern: Oberer und unterer PP-Teil, Silikondichtring, federgestützte Schrauben (M5). b) Aufsicht und c) Seitenansicht der zusammengebauten und befüllten Kammer.

Die Kammer bestand aus einem oberen und unteren Polypropylen-Teil (PP) mit einem gegen den unteren PP-Teil geklebten und gereinigtem Deckglas (Reinigung und Klebung siehe Kapitel 2.1.7). Um die Vesikeladhäsion zu gewährleisten, wurden die Deckgläser vor Vesikelzugabe mit Neutraavidin (NAV; Life Technologies) beschichtet. Dazu wurde kristallines NAV in PBS mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt. 300 μ l dieser Proteinlösung wurden auf die Mitte des Deckglases pipettiert und 1 h physisorbiert. Nicht-physisorbiertes NAV wurde anschließend durch 5-maliges Spülen mit Glukoselösung (280 mOsm/l) entfernt. Die Kammer wurde anschließend durch Zugabe von 1,9 ml Glukoselösung (280 mOsm/l) vollständig gefüllt und 100 μ l der GUV-Suspension dazu pipettiert. Ein Dichtring aus Silikon wurde zwischen dem oberen und unteren Teil platziert und beide Teile wurden durch federgestützte Schrauben dicht miteinander verschlossen. Die GUVs wurden mind. 1 h vor Experimentbeginn in die Kammer pipettiert und nachfolgend im Dunkeln unbeweglich gelagert, um die Sedimentation und Adhäsion von GUVs auf die Glasoberfläche zu gewährleisten.

2.5 Mikroskopie

Mit fusogenen Liposomen behandelte Zellen, GUVs und SLBs wurden, neben den in den Experiment-spezifischen Kapiteln vorgestellten Methoden, allesamt durch räumlich hochauflösende, konfokale Mikroskopie (cLSM) und zeitlich hochauflösende Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) untersucht. So konnte mit Hilfe des cLSMs eine genaue Charakterisierung der räumlichen Verteilung fluoreszenzmarkierter Moleküle bei Lebendzellmessungen oder in phasenseparierten GUVs durchgeführt werden. Durch FCS Messungen konnten biophysikalische Informationen über Kinetik und mögliche Wechselwirkungen der untersuchten Moleküle gewonnen werden. Im folgenden Kapitel werden wichtige Grundlagen zu molekularer Fluoreszenz und den lichtmikroskopischen Methoden cLSM und FCS besprochen.

2.5.1 Physikochemische Grundlagen der molekularen Fluoreszenz

Molekulare Fluoreszenz ist ein dreistufiger Prozess, der typischerweise bei aromatischen Molekülen auftritt. Derartige Moleküle werden als Fluorophore oder Fluorochrome bezeichnet. Fluorophore sind in der Lage, Licht zu absorbieren und wieder zu emittieren. Die Prozesse zwischen Absorption und Emission werden typischerweise durch ein Jablonski-Diagramm dargestellt (siehe Abbildung 2.7)[82].

Ein relaxierter Fluorophor befindet sich ohne Anregung mit hoher Wahrscheinlichkeit im Schwingungsniveau $v=0$ des S_0 -Grundzustands [106] und kann durch Absorption von Strahlung in einen angeregten Singulettzustand (S_1) versetzt werden. Die Absorption von Photonen erfolgt meist auf sehr kurzen Zeitskalen von etwa 10^{-15} bis 10^{-14} s [156]. Das Molekül erfährt nach Anregung Stöße mit seiner Umgebung. Dabei gibt es Energie ab (*engl. vibrational relaxation*), wodurch es auf der Leiter seiner Schwingungsniveaus (v_i) immer weiter nach unten klettert, bis es im Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands angekommen ist (siehe Abb.2.7, S_1, v_0). Im Fall von Fluoreszenz (dem strahlende Übergang) kann die Umgebung den großen Energiebetrag nicht aufnehmen, der nötig wäre, um das Molekül in den elektronischen Grundzustand zurückkehren zu lassen. Daher wird die verbleibende Anregungsenergie durch eine schnelle, spontane Emission abgegeben, was als Fluoreszenz bezeichnet wird [7]. Der Prozess der Fluoreszenz erfolgt in der Regel in einem Zeitrahmen zwischen 10^{-9} und 10^{-7} Sekunden [60]. Anschließend befindet sich das Molekül wieder im elektronischen Grundzustand. Da die Emission erst nach teilweiser Abgabe der Energie an die Umgebung stattfindet, ist die emittierte Strahlung etwas energieärmer als die Anregungsstrahlung. Dies führt dazu, dass die Emission im Vergleich zur Anregung in den langwelligeren Spektralbereich verschoben ist. Diese Differenz in den Wellenlängen zwischen Anregung und Emission wird

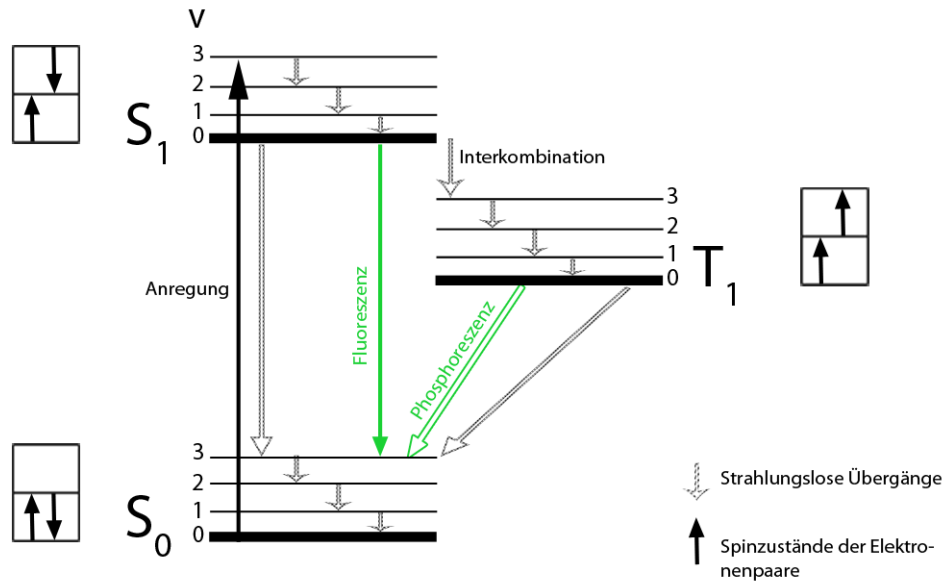


Abbildung 2.7: Jablonski-Diagramm als vereinfachte Darstellung der elektronischen Energieniveaus eines Moleküls. Durchgezogene Pfeile: Übergänge zwischen unterschiedlichen Energieniveaus, bei denen ein Photon absorbiert (Anregung) oder emittiert (Fluoreszenz, Phosphoreszenz) wird. Gepunktete Pfeile: Strahlungslose Übergänge, z.B. Schwingungsrelaxation oder *intersystem crossing*. Kurze, schwarze Pfeile: Spinzustände der Elektronenpaare. S_i : Singulettzustände; T_i : Triplettzustand; v_i : Schwingungszustände. Verändert nach Atkins 2006 [7].

als Stokes-Verschiebung bezeichnet [164]¹. Während der Anregung eines Elektrons kann es seinen Spinzustand behaltend auf ein höheres Energieniveau gelangen, auf den so genannten angeregten Singulettzustand. Wenn aber sein Spinzustand verändert wird, kommt es in einen angeregten Triplettzustand. Ein Singulett/Singulett-Übergang (S_0 - S_1) ist viel wahrscheinlicher als ein Singulett/Triplett-Übergang (S_0 - T_1). Jedoch ist es möglich, dass ein Elektron ohne Aussendung von Strahlung von einem angeregten Singulettzustand in einen weniger energiereichen Triplett-Zustand kommt. Dieser Prozess wird als Interkombination (*engl. intersystem crossing*) bezeichnet. Im Schwingungsgrundzustand des Triplettzustands ist das Molekül zeitweise gefangen, da seine Energie unter der des Singulettzustands liegt. Die Anregungsenergie ist zu groß, um von der Umgebung aufgenommen zu werden und die Abgabe der Energie in Form von Strahlung ist in diesem Zustand sehr unwahrscheinlich, wodurch die Rückkehr in den Grundzustand nur langsam erfolgt. Dieser strahlende Übergang wird als Phosphoreszenz bezeichnet und

¹Die Stokes-Verschiebung ist somit eine der Hauptgründe für das hohe Signal/Rausch-Verhältnis in der Fluoreszenzmikroskopie, da durch die Wellenlängenverschiebung das Anregungslicht durch geeignete Filter optimal von dem emittierten Licht getrennt werden kann.

kann lange anhalten, nachdem die Anregung abgeschaltet ist [7]. Der Übergang aus einem Triplettzustand in den Grundzustand erfolgt mit Halbwertszeiten zwischen 10^{-4} und 10^2 Sekunden [60]. Wie oben beschrieben, kann ein angeregtes Molekül sowohl durch mehrere strahlungslose als auch durch Photonen emittierende Schritte in seinen Grundzustand zurückkehren. Der bevorzugte Weg zum Grundzustand ist derjenige, der die Lebensdauer des angeregten Zustands minimiert. Ist die Deaktivierung durch Fluoreszenz im Vergleich zu strahlungslosen Prozessen schnell, werden solche Emissionen beobachtet. Besitzt andererseits der strahlungslose Weg die günstigere Geschwindigkeitskonstante, dann tritt Fluoreszenz nicht relevant auf [156]. Abbildung 2.7 fasst die elektronischen Energieniveaus, die strahlenden und strahlungslosen Übergangsmöglichkeiten eines Moleküls zusammen.

2.5.1.1 Extinktionskoeffizient, Quantenausbeute und Fluoreszenz-Lebensdauer

Bei fluoreszenzbasierten Messungen sind drei Fluorophor-spezifische Faktoren von besonderer Bedeutung: Der Extinktionskoeffizient, die Quantenausbeute und die Fluoreszenz-Lebensdauer.

Der Extinktionskoeffizient ε ist ein Maß dafür, wie viel elektromagnetische Strahlung eine spezielle Substanz in molarer Konzentration bei einer Durchtrittslänge von 1 cm und bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert [184]. ε erhält man über Gleichung 2.1 mit der Extinktion E_λ (Verminderung der Intensität des gemessenen Lichts im Photometer), der Stoffmengenkonzentration c der Lösung in der Messküvette, und der Schichtdicke d der Messküvette (1 cm). E_λ wiederum wird abgeleitet vom Lambert-Beerschen Gesetz 2.2, wobei I_0 der Intensität des einfallenden Lichts und I_1 der Intensität des transmittierten Lichts entspricht.

$$\varepsilon = \frac{E_\lambda}{cd} \quad (2.1)$$

$$E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) \quad (2.2)$$

ε stellt somit ein Maß für die Eigenschaft eines Fluorophores dar, wie viele Photonen mit diskreter Energie durch 1 Mol der Fluorophore auf einem optischen Weg von 1 cm absorbiert werden können. Es hat die Einheit $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$. Herkömmliche Fluorophore haben einen molaren Extinktionskoeffizient zwischen 5000 und 250,000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Generell werden Fluorophore mit möglichst hohem Extinktionskoeffizienten bevorzugt, da bei einem Fluorophor mit höherem ε im Vergleich zu einem Fluorophor mit niedrigerem ε (aber gleicher Quantenausbeute) die Anregungsintensität geringer sein kann und dadurch zell-

biologische Proben geschont werden (vgl. auch Kapitel 2.5.1.3).

Die Quantenausbeute (*engl. Quantum yield; QY*) beschreibt die Anzahl an emittierten Photonen im Verhältnis zur Menge absorbiertes Photonen neben anderen Relaxationsprozessen [106]. Bei der Fluoreszenzmikroskopie verwendete Farbstoffe haben eine Quantenausbeute zwischen 0,1 und 1,0, wobei ein Farbstoff mit einer hohen QY von 1 ein sehr effektiver Fluorophor ist und für mikroskopische Untersuchungen bevorzugt wird. Zum Beispiel die AlexaFluor-, Bodipy- oder Di-Serien von Life Technologies sind solche Fluorophore. Der in dieser Arbeit häufig verwendete Fluorophor *Bodipy* besitzt, gemessen in einer Lipiddoppelschicht, eine Quanteneffizienz von 0,9 [80], während DiIC₁₈(7) in Methanol eine Quanteneffizienz von 0,07 besitzt [133]. Generell werden Fluorophore mit einer hohen Quantenausbeute bevorzugt. Vereinfacht lässt sich sagen, dass Fluorophore mit höherer Quantenausbeute höhere Emissionen erzeugen.

Die dritte wichtige Eigenschaft eines Fluorophores ist die Fluoreszenz-Lebensdauer. Sie gibt die mittlere Zeit an, die ein Fluorophor in einem angeregten Zustand bleibt, bevor er ein Photon emittiert und damit in den Grundzustand zurückkehrt (vgl. Abb. 2.7). Dabei ist zu beachten, dass es sich bei Fluoreszenz um einen zufälligen Zerfall handelt und somit auch die angegebene Fluoreszenz-Lebensdauer nur einen mittleren Wert darstellen kann bei dem der Fluorophor vom angeregten in den Grundzustand unter Aussendung von Photonen zurückkehrt [106].

2.5.1.2 Fluoreszenz-Löschung und Excimerbildung

Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts kann durch unterschiedliche Prozesse verringert werden. Allgemein werden solche, die Fluoreszenzintensität verringernden Prozesse, als Fluoreszenz-Löschung (*engl. quenching*) bezeichnet, wobei die zur Löschung führenden Prozesse sehr unterschiedlich sein können. In verdünnten Lösungen hängt die Fluoreszenzintensität linear von der Anzahl der angeregten Fluorophore ab. Bei höheren Konzentrationen gilt diese Linearität nicht mehr, unter anderem daher, dass sich in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass angeregte Moleküle kollidieren und ein strahlungsloser Energieübergang auftritt, der die Fluoreszenzintensität reduziert [80, 156]. In diesem Fall spricht man von der Fluoreszenz-Selbstlöschung (*engl. self-quenching*). Aber auch andere in der Lösung befindlichen Moleküle sind in der Lage, durch Kollision mit angeregten Fluorophoren diese in den Grundzustand zu versetzen. Solche Moleküle werden als *quencher* bezeichnet. Typische Fluoreszenz-Löschler sind zum Beispiel molekularer Sauerstoff, Halogenide, Amine oder Elektronen-defiziente Moleküle wie Acrylamid [106]. In beiden beschriebenen Fällen, der Löschung und Selbst-Löschung, werden die kollidierenden Moleküle strukturell nicht verändert. Strukturelle molekulare Veränderungen können die Fluoreszenzintensität selbstverständlich auch verringern, allerdings handelt

es sich dabei um dauerhaftes Fluoreszenz-Löschen, da der Fluoreszenz-Löcher den Fluorophor im Grundzustand beeinflusst und keine diffusiven Prozesse oder molekulare Kollisionen ausschlaggebend sind.

Ein Spezialfall der Selbstlöschung ist die Excimerbildung. Die Bezeichnung Excimer leitet sich aus der Kurzform von "*excited dimer*" (angeregtes Dimer) her. Definitionsgemäß besteht das Excimer-Molekül aus zwei oder mehreren Molekülen der gleichen Art. Die Besonderheit gegenüber einem normalen Molekül besteht darin, dass das Excimer nur gebildet werden kann, wenn ein Molekül im angeregten Zustand $(M)^*$ mit dem gleichen Molekül im Grundzustand (M) zusammen stößt: ${}^1M^* + {}^1M \rightleftharpoons (MM)^*$. Die Überschussenergie des einen Partners wird auf beide Moleküle zu gleichen Teilen verteilt. Völlig analog zur Resonanzstabilisierung kovalenter Bindungen kommt es aufgrund der quantenmechanischen Verteilung der Energie von einem auf zwei Moleküle zur Energieabsenkung. Verliert dieses Excimer seine Anregungsenergie, trennen sich die Bindungspartner und kehren in den Grundzustand zurück [168]. Dabei wird die emittierte Energie des Excimers immer bei höheren Wellenlängen detektiert als die des Monomers. Im Grundzustand haben die vormaligen Bindungspartner eine abstoßende Wechselwirkung miteinander.

Die Excimerbildung ist ein konzentrationsabhängiger und durch Diffusion kontrollierter Prozess. Die Bildungspartner müssen während des Anregungszustandes eines Moleküls miteinander durch Zusammenstoßen in Kontakt treten können. Die Wahrscheinlichkeit einer Excimerbildung ist umso höher, je höher die Monomerkonzentration und dementsprechend kürzer der Diffusionsweg ist. Excimer-bildende Fluorophore werden häufig als Sensoren für Veränderungen in der Fluorophorkonzentration oder in der molekularen Packung der Umgebung verwendet. Viele aromatische Hydrokarbone wie Naphtalen oder Pyren sind excimerbildende Fluorophore. Der in der vorliegenden Arbeit häufig verwendete Fluorophor *Bodipy* ist ebenfalls ein potenzieller Excimer-Bildner. Die konzentrationsabhängige Emissionsverschiebung wurde dabei erstmals von Pagano 1991 beschrieben [131]. Paganos Arbeit leitete den Grundstein für weitere zellbiologische Untersuchungen ein, bei denen konzentrationsabhängige Emissionsverschiebungen Rückschlüsse auf die Verstoffwechslung und Anreicherung bioaktiver Moleküle schließen ließen [34, 118, 130, 181]. Abbildung 2.8 zeigt die konzentrationsabhängige Zunahme der Excimeremissionen von Bodipy FL [118].

Der generelle Mechanismus, welcher zur Excimer-Bildung führt, ist noch nicht eindeutig geklärt und die Bildung von Grundzustand-Dimeren wird in dieser Arbeit nicht weiter erläutert.

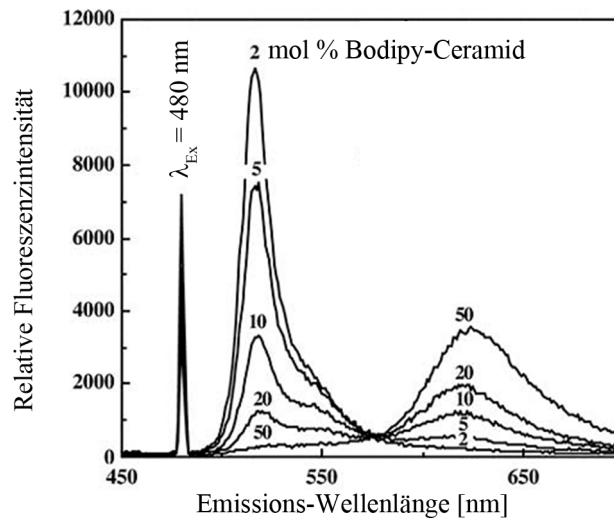


Abbildung 2.8: Fluoreszenz-Emissionsspektren von Liposomen (Grundlipid hierbei POCP), welche unterschiedliche Mengen Bodipy-Ceramid enthalten. Mit höherer Bodipy-Ceramid Konzentration verschiebt sich das bei 2 mol % ausschließlich bei 515 nm auftretende Maximum sukzessive zu einem zweiten und bei 50 mol % ausschließlich auftretendem Maximum bei 620 nm. (Verändert nach Marks et al. 2008 [118])

2.5.1.3 Photobleichen und Phototoxizität

Neben den zuvor beschriebenen Mechanismen, welche zu unerwünschten Intensitätsverlusten bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen führen können, sind Photobleichen (*engl. photobleaching*) und Phototoxizität zwei insbesondere in zellbiologischen Experimenten unerwünschte Phänomene. Beiden liegt der gleiche Prozess zu Grunde, nämlich der Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle als Ergebnis intensiver Lichtbestrahlung. Beide Phänomene lassen sich bei fluoreszenzmikroskopischen Analysen nicht gänzlich vermeiden, können aber durch genaue Kenntnis des Fluorophores, der Probe als auch der mikroskopischen Einstellungen minimiert werden.

Unter anderem ist die primäre Ursache beider Phänomene eine licht-induzierte Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)² durch angeregte Fluorophore zu sein [53, 159, 47]. $^1\text{O}_2$ ist ein hoch-reaktives Molekül mit einer Lebensdauer von circa 4 μs in Wasser, wobei diese Zeitspanne in Zellen aufgrund der Vielzahl an potenziellen Reaktionspartnern auf $< 0,5 \mu\text{s}$ verkürzt wird. Daher wird der Interaktionsradius in Zellen auf $< 50 \text{ nm}$ verkürzt. Letztendlich hat eine Reaktion von $^1\text{O}_2$ mit Fluorophoren eine irreversible Zerstörung

²Sauerstoff besitzt zwei unterschiedliche angeregte Zustände, die beide eine deutlich größere Energie als der Grundzustand besitzen. Bei beiden Zuständen sind die Spins der Elektronen entgegen der Hund'schen Regel antiparallel ausgerichtet. Der stabilere angeregte Sauerstoff wird nach der quantenmechanischen Bezeichnung für diesen Zustand auch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) genannt.

des konjugierten π -Elektronensystems und damit den Verlust der Fluoreszenz zur Folge [133]. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, kann die Anregungsintensität der Lichtquelle so niedrig wie möglich eingestellt werden. Weiterhin zeigen unterschiedliche Fluorophore in Abhängigkeit von ihrer Struktur mehr oder weniger starke Photobleich-Effekte bei gegebener Anregungsleistung [90], wodurch ein möglichst bleich-stabiler Fluorophor zu bevorzugen ist.

Ein weiterer negativer Aspekt des Auftretens von $^1\text{O}_2$ bei Lebendzelleexperimenten ist die Phototoxizität. Bei diesem Prozess, welcher mit dem Auftreten von Photobleichung unweigerlich einhergeht, werden zum Beispiel Proteine, Nukleinsäuren oder andere zellulären Strukturen beschädigt oder zerstört. Auch hier ist der effektive Wirkradius des $^1\text{O}_2$ räumlich stark eingeschränkt [64]. Dennoch kann Phototoxizität erhebliche Auswirkungen auf zelluläre Prozesse und Funktionen haben. Die extremste Konsequenz großer Mengen $^1\text{O}_2$ ist der Zelltod, allerdings können auch weniger eindeutige Phänomene auftreten, wie beispielsweise die lichtinduzierte Ausschüttung intrazellulären Calciums oder verminderter Zellteilungsrate [100], welche unbemerkt bleiben aber die Experimente maßgeblich beeinflussen können.

Die beschriebenen Phänomene der Photobleichung und der Phototoxizität spielen in Lebendzelleexperimenten eine entscheidende Rolle und sind zum Beispiel durch die Wahl geeigneter Fluorophore, möglichst niedrigen Anregungsintensitäten und möglichst den gesamten Emissionsbereich abdeckenden Emissionsfiltern so gering wie möglich zu halten.

2.5.1.4 Fluorophor-Sättigung

Der Effekt der Fluorophor-Sättigung tritt dann auf, wenn sich ein nennenswerter Teil der Fluorophore in dem beleuchteten Bereich einer Probe bereits im angeregten Singulettzustand befindet. Diese angeregten Moleküle absorbieren Licht bei völlig anderen Wellenlängen als solche im Grundzustand. Daher führt eine Erhöhung des Photonenflusses zu keiner linearen Steigung der Emissionsrate und die Zahl der absorbierten Photonen bleibt bei hohen Laserleistungen konstant. Insbesondere Proben unter konfokalen Mikroskopen, welche mit einer effektiven Laserstärke von mehr als einem mW arbeiten, sind davon betroffen. Zusätzlich findet die Sättigung von Fluorophoren hauptsächlich in der Mitte eines fokussierten Laserstrahls statt, wodurch relativ mehr Signal von den Rändern des angeregten Bereichs produziert wird. Das Signal wird somit durch Sättigung verfälscht und stellt kein Abbild der tatsächlichen Farbstoffkonzentration mehr dar [133]. Zusätzlich führt die Fluorophor-Sättigung auch zu einer Verschlechterung der axialen Auflösung eines konfokalen Mikroskops [173]. Analog zur Vermeidung des Photobleichens und der Phototoxizität lässt sich auch die Fluorophor-Sättigung durch möglichst niedrige Anre-

gungsintensitäten vermeiden, beziehungsweise gering halten.

2.5.2 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Der Grundaufbau der meisten Fluoreszenzmikroskope entspricht dem eines Auflichtmikroskops. Ein Unterschied ist, dass das zu beobachtende Objekt dabei nicht durchstrahlt, sondern durch das Objektiv beleuchtet wird. Die korrekte Bezeichnung lautet daher Epifluoreszenz-Mikroskop. Die angeregten Fluorochrome emittieren Licht, welches durch die Stokes-Verschiebung langwelliger als das anregende Licht ist. Als Lichtquellen werden in der Regel Quecksilberdampflampen, Laser oder LEDs eingesetzt. Quecksilberdampflampen emittieren Licht über das gesamte sichtbare Spektrum³ sowie im ultravioletten Bereich, ein Laser ist dagegen eine monochrome Lichtquelle. Bei Verwendung von Quecksilberlampen wird die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendige Wellenlänge mit optischen Filtern isoliert und das einfarbige Licht auf das Objekt geleitet, worauf dieses zu fluoreszieren beginnt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt. Im Strahlengang befindliche Farbteiler und Trennfilter trennen anschließend das Fluoreszenzlicht vom anregenden Licht und leiten es in das Okular des Mikroskops, auf eine Fotokamera oder auf einen Sekundärelektronenvervielfacher (*Photomultiplier*).

2.5.3 Konfokale Mikroskopie

Ernst Abbe hat bereits im 19. Jahrhundert die Grundlagen moderner Lichtmikroskopie beschrieben. Dabei erkannte er, wie das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops durch Lichtstreuung an der Probe und den Objektivlinsen beeinflusst wird und konnte dadurch maßgeblich zur Entwicklung beugungslimitierter Linsensysteme⁴ beitragen [1]. Gleichung 2.3 beschreibt diesen Zusammenhang, wobei d_{\min} dem minimal noch auflösbarem Abstand zwischen zwei parallelen Linien, λ_0 der verwendeten Wellenlänge im Vakuum und NA_{obj} und NA_{kond} der numerischen Aperturen des Objektivs beziehungsweise des Kondensors entsprechen.

$$d_{min} = \frac{1,22\lambda_0}{NA_{obj} + NA_{kond}} \quad (2.3)$$

Es wird deutlich, dass das Auflösungsvermögen für parallele Linien von der verwendeten Wellenlänge und von den numerischen Aperturen des Objektivs und des Kondensors

³Wobei ausgeprägte Spektrallinien bei 435 nm und 546 nm überwiegen.

⁴Anstelle der bis dato verwendeten und durch chromatische und sphärische Aberrationen limitierten Linsen.

abhängig sind. Ein anderer Ansatz, das Auflösungsvermögen eines Mikroskops zu beschreiben, ist die Verwendung beugungsbegrenzter Punkte anstelle von Linien. Ein endlich kleiner Punkt wird durch ein Lichtmikroskop nicht endlich klein dargestellt, sondern als kreisförmige Beugungsscheiben oder sog. *Airy-Ringe* mit einem zentralen Intensitätsmaximum und alternierenden, kontinuierlich schwächer werdenden hellen und dunklen Ringen (Nebenmaxima n-ter Ordnung). Der Radius des ersten dunklen Ringes um das zentrale Intensitätsmaximum wird durch Gleichung 2.4 beschrieben und ist abhängig von der Wellenlänge und der numerischen Apertur des Objektivs.

$$r_{Airy} = 0,61 \frac{\lambda_0}{NA_{Obj}} \quad (2.4)$$

Stellt man sich nun zwei nebeneinander liegende, beugungsbegrenzte, unendlich kleine Punkte in der Fokusebene des Objektivs vor, überschneiden sich deren Beugungsmuster und können, falls der Abstand d zwischen ihnen sehr klein ist, nicht mehr als getrennte Punkte aufgelöst werden.

All diese Überlegungen behandeln nur die Auflösung eines Mikroskops in der Fokusebene des Objektivs, also in x- und y- Richtung. In relativ dicken biologischen Proben ist allerdings die axiale Auflösung (in z-Richtung) von entscheidender Bedeutung. Die axiale Auflösung wird dabei als der minimale Abstand d betrachtet, bei dem zwei übereinander liegende, beugungsbegrenzte, endlich kleine Punkte getrennt aufgelöst werden können. Der Abstand zwischen dem zentralen Intensitätsmaximum und dem ersten axialen Intensitätsminimum wird beschrieben durch Gleichung 2.5, wobei η dem Brechungsindex des Objektes entspricht.

$$z_{min} = \frac{2\lambda_0\eta}{(NA_{Obj})^2} \quad (2.5)$$

Es wird deutlich, dass z_{min} mit dem Quadrat der numerischen Apertur des Objektivs invers-proportional kleiner wird, wohingegen d_{min} nur linear mit NA_{Obj} abnimmt. Dies führt zu dem Schluss, dass ein Objekt, welches sich nicht in der Fokusebene des Objektivs befindet, dennoch ein Signal produziert und den Kontrast des beobachteten Objektes deutlich verschlechtert.

Ein konfokales Mikroskop (cLSM) hingegen ist in der Lage, diese fokusfremden Signale weitestgehend zu diskriminieren. Die Grundlagen des cLSMs wurden 1957 von Marvin Minsky patentiert [122] und durch Brakenhoff 1979 entscheidend mit der Verwendung eines Lasers als Lichtquelle weiterentwickelt [19]. Der Schlüssel zu der beschriebenen *out of focus*-Diskriminierung liegt darin, eine sehr kleine Lochblende in der hinteren Fokalebene der Tubuslinse zu installieren, welche genau im Bildpunkt des Anregungslichtes liegen muss (siehe Abbildung 2.9). Bei einem cLSM wird ein Laser über Lichtleiter in

den Strahlengang eingekoppelt, von einem Farbteiler reflektiert und durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Der gewählte Bildausschnitt wird nun Pixel für Pixel mit der gewählten Pixel-Verweildauer gescannt, wobei eine längere Verweildauer zu einem besseren Signal-/Rauschverhalten führt, aber wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben auch zu einem stärkeren Bleichen der Fluorophore führen kann. Hochpräzise x- und y- Scanköpfe bewegen dabei den Laser Pixel für Pixel über den Bildausschnitt. Das von den Fluorophoren emittierte Licht wird vom gleichen Objektiv wieder eingefangen und passiert den Farbteiler, welcher von der Probe reflektiertes Laserlicht in dieser Richtung blocken kann. Das Fluoreszenzlicht wird durch Emissionsfilter gefiltert, bevor es zur Lochblende gelangt. Dort wird wie beschrieben Licht, welches von oberhalb und unterhalb der Fokalebene entstammt, diskriminiert. Das durch die Lochblende fallende Licht wird von Sekundärelektronenvervielfachern (PMTs) oder Avalanche Photo Dioden (APDs) detektiert und in Intensitätsinformationen umgerechnet. Ein kompletter Bildausschnitt wird letztendlich erzeugt, in dem jeder Pixel des Bildausschnittes auf diese Weise gescannt wird. Abbildung 2.9 beschreibt schematisch den Strahlengang eines cLSMs.

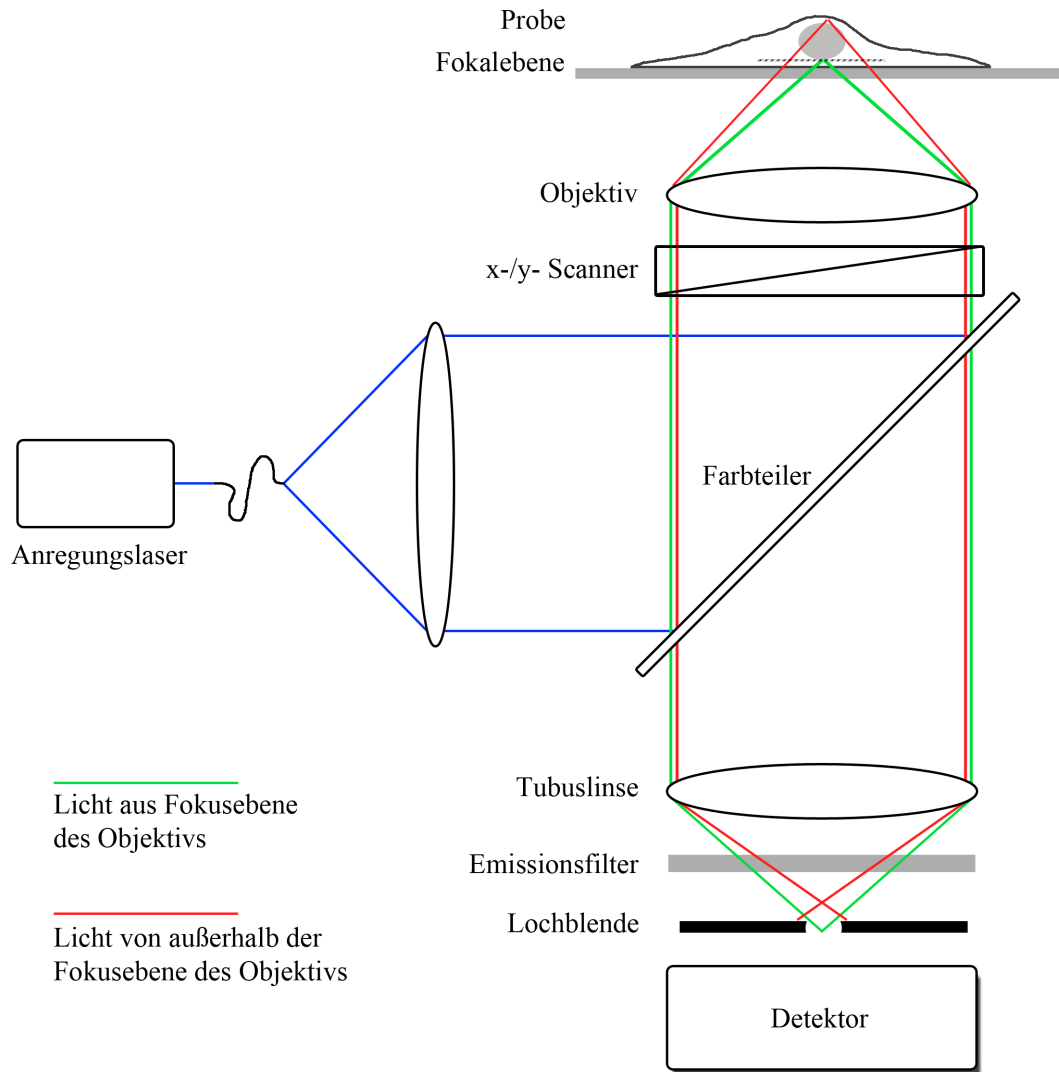


Abbildung 2.9: Schematisch dargestellter Strahlengang in einem konfokalen Lichtmikroskop. Durch die Lochblende (*engl. pinhole*) wird Licht, welches nicht aus der betrachteten Fokusebene stammt, diskriminiert.

Einstellungen und Parameter des cLSMs

Alle Untersuchungen wurden mit einem inversen konfokalen Mikroskop (LSM 710; Carl Zeiss Microimaging; Jena; Deutschland) durchgeführt, welches mit einem Argon-Ionen-Laser (458/488/514 nm) und zwei Helium-Neon-Lasern (HeNe; 543 und 633 nm) ausgestattet war. Bei Lebendzelleexperimenten wurde eine konstante Temperatur von 37°C um das Mikroskop durch Verwendung eines Inkubators (Incubator XL 2; Carl Zeiss) erreicht. Zusätzlich wurde ein Heizeinsatz (Heating Insert PS; Carl Zeiss), welcher di-

rekt an der Zellkulturschale anlag und ebenfalls auf 37°C temperiert war, verwendet. So konnten durch Temperaturschwankungen bedingte Veränderungen der Fokusslage weitestgehend eliminiert werden, was sich bei Langzeitaufnahmen und FCS-Messungen (siehe Kapitel 2.5.5) positiv auswirkte. Um den pH-Wert des Mediums während den Messungen konstant zu halten, wurden die Zellen zusätzlich mit CO₂-haltiger (5 %) und gesättigt feuchter Luft begast. Dazu wurde ein Begasungsaufsatz (Teil des Heating Insert PS; Carl Zeiss) verwendet, welcher passgenau auf den Heizeinsatz über die Probe gelegt wurde. Die Lebendzell-Aufnahmen wurden entweder mit einem EC Plan Neofluar 40x/1.3 Öl-Objektiv mit Phasenkontrast oder dem C-Apochromat 40x/1.2 Wasser-Objektiv aufgenommen. Alle Lipidtypen, die *Bodipy FL* als kovalente Gruppe entweder in Ketten- oder Kopfposition besaßen (siehe Kapitel 2.2.3), sowie *Lysotracker DnD 26* wurden mit der 488 nm-Linie des Argon-Ionen-Lasers angeregt. *Vybrant DiI* wurde mit dem 543 nm HeNe-Laser angeregt, *DiIC₁₈(7)* mit dem 633 nm HeNe-Laser. Bei allen Messungen wurde die Laserlinie, mit der die Fluorophore angeregt wurden, mit dem dichroitischen Hauptfarbteiler (HFT) 488/543/633 nm optisch vom Emissionsstrahlengang getrennt. Die Detektion erfolgte entweder mit einem oder mit beiden PMT's. Der erste Detektionskanal war mit einem Bandpassfilter ausgestattet, welcher sich stufenlos von 365 bis 599 nm einstellen ließ. Der zweite Detektionskanal war mit einem Langpassfilter ausgestattet, der sich variabel ab 365 nm einstellen ließ und immer bis zum Rande des sichtbaren Spektrums bei 812 nm detektierte. *Bodipy* und *Lysotracker DnD 26* wurden im ersten Detektionskanal von 490 bis 550 nm detektiert und *Vybrant DiI* zwischen 490 und 599 nm. Im zweiten Detektionskanal wurde *DiIC₁₈(7)* ab 700 nm aufgenommen. Die mit *Bodipy FL* markierten Lipide wurden mit dem ersten Detektionskanal von 490 bis 550 nm detektiert, was der Emission des Monomers entspricht. Bei den qualitativen Fusionsanalysen wurde auch die Emission des Excimers mit dem zweiten Detektionskanal ab 605 nm detektiert. Wichtig dabei war, das Monomer- sowie Excimeremission durch Anregung mit dem 488 nm Laser erreicht werden konnte. Die Emission des Excimers wurde aufgenommen, da der *Bodipy* Farbstoff einen Wechsel der Emission in den langwelligen Bereich zeigte, wenn er in Bereichen in sehr hoher Konzentration vorlag (siehe Kapitel 2.5.1) und [131]).

Alle Einzelbilder wurden gemäß des Nyquist-Shannon-Kriteriums⁵ bei einer für den Bildausschnitt optimalen Auflösung, einer Pixelverweilzeit von 3,15 µs und einer Farbtiefe von 8 bit aufgenommen. Um kürzere Aufnahmezeiten zu erreichen, wurden Zeitreihen mit einer Auflösung von 512x512 Bildpunkten, einer Pixelverweilzeit von 1,58 µs und einer Farbtiefe von 8 bit aufgenommen. Zeitreihen mit mehr als einem Kanal wurden im Linienscan-Modus aufgenommen, sodass nahezu zeitgleiche Aufnahmen auf beiden

⁵Für mikroskopische Systeme hat sich eine Pixelgröße von der Hälfte der gemäß der Abbe'schen Theorie zu erwarteten Auflösung des optischen Systems etabliert.

Kanälen möglich waren.

2.5.4 Bestimmung der Position von Fokalkontakten mittels Interferenz-Reflexions-Mikroskopie

Mit der Aufnahme eines Reflexionsbildes, welches ein Abbild der Zellunterseite auf dem Substratboden lieferte, konnten Informationen über den räumlichen Abstand der Plasmamembran vom Substrat gewonnen werden [172]. Die Technik basiert auf Reflexio-

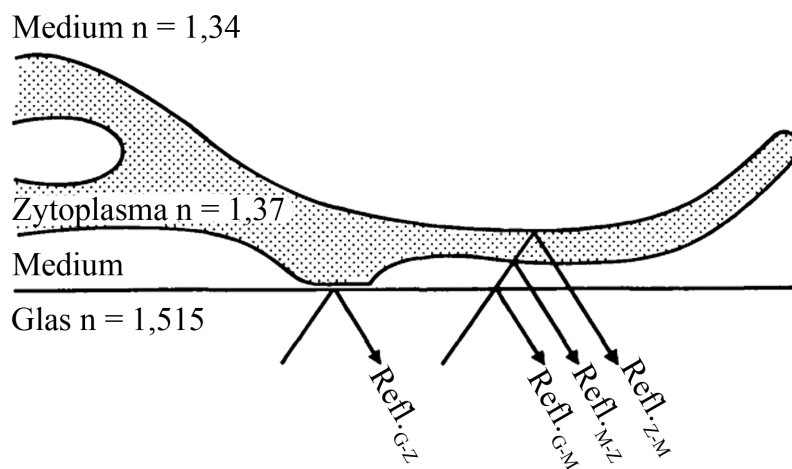


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine Zelle, adhärert auf einem Deckglas, und der an den verschiedenen Grenzflächen auftretenden Reflexionen. *Refl.G-Z* zeigt eine Position, an der die Zellmembran in unmittelbarer Nähe zum Deckglas ist. Bei *Refl.G-M* und *Refl.M-Z* ist ein mit Medium gefüllter Abstand zwischen den Grenzflächen. Die dort entstehenden Reflexionen können miteinander interferieren, ebenso die an der oberen Zellmembran entstehende *Refl.Z-M*. Die Intensität monochromatischen Lichts, welches an der Unterseite der Zelle reflektiert wird, enthält demnach Informationen über den Abstand der Membran zum Deckglas. n gibt die optische Dichte der entsprechenden Umgebung an.

Verändert nach Verschueren 1985 [172]).

nen, welche an Grenzflächen auftreten. In biologischen Proben sind Grenzflächen oftmals Übergänge zwischen Medien unterschiedlicher Brechungsindices, beispielsweise der Übergang von Deckglas zum Kulturmedium, oder zwischen Medium und Zellmembran. Mittels Interferenz-Reflexions-Mikroskopie (IRM) ließen sich Fokalkontakte eindeutig als dunkle Ovale identifizieren, während sich nicht-adhärenente Membranbereiche durch eine

höhere Intensität unterschieden [81]. Zur Bestimmung der Position von Fokalkontakten IRM wurde die 514 nm Linie des Argon-Ionen-Lasers verwendet. Als Hauptfarbteiler wurde der MBS T80/R20 eingesetzt. Dieser lenkte den Laserstrahl in 80 % seiner Intensität auf die Probe und ließ nur 20 % des vergleichsweise intensitätsstarken Reflektionslicht zum Detektor gelangen. Das reflektierte Licht wurde mit dem ersten Detektionskanal zwischen 495 und 550 nm detektiert.

2.5.5 Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie

Methodisch basieren viele Experimente innerhalb dieser Arbeit auf der Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie. Einerseits sind zahlreiche Analysen fluoreszenzmarkierter Lipide bezüglich deren Kinetik innerhalb der zellulären Plasmamembran und besonders im Hinblick auf proteinreiche Domänen innerhalb dieser zu nennen. Des Weiteren wurden Messungen an phasenseparierten GUVs und diversen SLBs durchgeführt. Somit hat die genaue Kenntnis und das Verständnis dieser Einzelmolekülspektroskopischen Methode einen besonderen Stellenwert. Die Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten sollen im folgenden Kapitel erläutert werden.

FCS (engl. Fluorescence correlation spectroscopy; FCS) ist eine Methode, um extrem niedrig konzentrierte, fluoreszenzmarkierte Moleküle räumlich sowie zeitlich analysieren zu können. Im Gegensatz zu anderen Fluoreszenz-Techniken (z.B. der konfokalen Mikroskopie) wird nicht die Intensität der Emission an sich, sondern die Fluktuationen der Intensität statistisch analysiert (Schwille1999c). Die Methode wurde das erste Mal von Magde, Elson und Webb 1972 vorgestellt [116] und experimentell erfolgreich zur Untersuchung der Bindungsrate von Ethidiumbromid an DNA angewandt, wobei die Autoren zu dem Schluß gelangten, die Präzision der Methode noch deutlich verbessern zu müssen. Dies gelang entscheidend durch die Arbeit von Schätzel, Drewel und Stimac im Jahr 1988, die durch ihre theoretischen Überlegungen die Messgenauigkeit insbesondere bei großen Korrelationszeiten bei gleichzeitig deutlich kürzeren Messzeiten verbessern konnten [144].

Im Gegensatz zur konventionellen konfokalen Mikroskopie, bei der wie oben beschrieben der Bildausschnitt pixelweise gerastert wird, wird bei FCS-Messungen ein ortsfester Laserstrahl verwendet. Somit werden nur Fluorophore im statischen Anregungsvolumen detektiert. Die Fluorophore oder an Fluorophore gebundene Moleküle diffundieren in und aus einem sehr kleinen konfokalen Beobachtungsvolumen (ca. 10^{-15} l) und emittieren dabei Photonen. Der Wechsel von Anwesenheit und Abwesenheit der Fluorophore führt zu Fluktuationen der emittierten Photonenzahl (siehe Abbildung 2.11 rechts). Die Photonen werden dabei mit hochsensitiven Detektoren (*Avalanche Photo Dioden*; APDs), über die Messzeit detektiert [141, 10]. Mit den APDs wird also ein detektierbares Signal

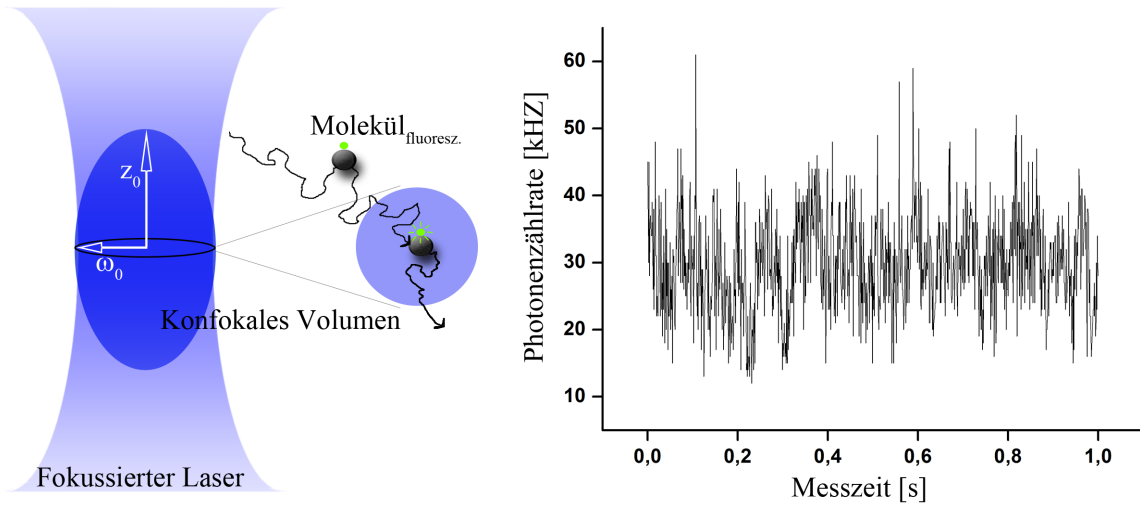


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung zur Entstehung von Fluoreszenzfluktuationen bei FCS-Messungen. Fluoreszenzmarkierte Moleküle können beispielsweise durch passive Diffusionsprozesse in das konfokale Volumen des fokussierten Lasers gelangen. Dabei werden sie angeregt und emittieren Photonen, welche vom Detektor registriert werden. Da der Laser dabei statisch auf der Probe verweilt, verlässt das Molekül in Abhängigkeit von der Art und Geschwindigkeit des diffusiven Prozesses das konfokale Volumen nach einer charakteristischen Zeitspanne (linke Darstellung). Werden eine Vielzahl solcher Prozesse über den Messzeitraum registriert, führt dies zu Intensitätsfluktuationen (rechts). Um quantitative Aussagen über Diffusionskonstanten machen zu können, müssen Geometrie und räumliche Ausdehnung (axialer Radius z_0 ; lateraler Radius w_0) bekannt sein (siehe auch Kapitel 2.5.5.3). (Rechte Darstellung: Photonenzählratenhistogramm von TopFluor-Cholesterol in der Plasmamembran von kardialen Myofibroblasten nach Interkalation durch fusogene Liposomen).

erzeugt, sobald Photonen eintreffen. Dazu wird ein einzelnes Paar von Ladungsträgern (Elektronen-Lochpaar) durch die Absorption des Photons erzeugt, was durch den sog. *avalanche breakdown*-Effekt [179] zu einem großen detektierbaren Signal selbst bei sehr niedrigen Fluorophorkonzentrationen führt. Die Fluktuationen selbst variieren dabei zum einen mit der Anzahl N der im konfokalen Volumen befindlichen Moleküle und zum anderen mit der mittleren Zeitkonstante τ_D , die sie benötigen, um sich durch das konfokale Volumen hindurch zu bewegen. Da relative Fluktuationsveränderungen mit steigender Anzahl an angeregten Molekülen im konfokalen Volumen immer kleiner werden, ist es entscheidend, die Konzentration der zu messenden Moleküle möglichst gering zu halten. Konzentrationsbereiche zwischen 10^{-9} M und 10^{-6} M fluoreszenzmarkierte Moleküle haben sich als optimal erwiesen [145, 6].

2.5.5.1 Die Autokorrelationsfunktion

Um entscheidende Parameter wie die Diffusionszeit τ_D oder die Molekülkonzentration N bestimmen zu können, muss der ermittelte Fluktuationsverlauf mit theoretischen Modellen, welche Diffusionsprozesse einzelner, fluoreszenzmarkierter Moleküle beschreiben, analysiert werden. Diese theoretische Betrachtung bei FCS-Messungen prüft die zeitliche Persistenz der Signale in dem ermittelten Fluktuationsverlauf mittels einer Autokorrelationsfunktion (*ACF*) [58]. Mit dieser werden die ermittelten Photonen-Zählraten beziehungsweise deren Fluktuationen auf die Selbst-Ähnlichkeit des Signals untersucht. Die normalisierte ACF $G(\tau)$ eines fluktuierenden Signals $I(t)$ ist beschrieben als [174]

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \times \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2.6)$$

wobei $\delta I(t)$ und $\delta I(t + \tau)$ die Amplituden der Fluktuationen vom Mittelwert zum Zeitpunkt t beziehungsweise $t + \tau$ und $\langle I(t) \rangle$ der Durchschnittswert des Fluoreszenzsignals sind. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten zum Zeitpunkt t werden demnach mit einer zeitlich verschobenen Intensität ($t + \tau$) bei verschiedenen Verzögerungszeiten τ multipliziert. Die ACF berechnet somit über einen ermittelten Fluktuationsverlauf die Wahrscheinlichkeit, ein Signal, gemessen an Zeitpunkt t , zum Zeitpunkt $t + \tau$ wiederzufinden.

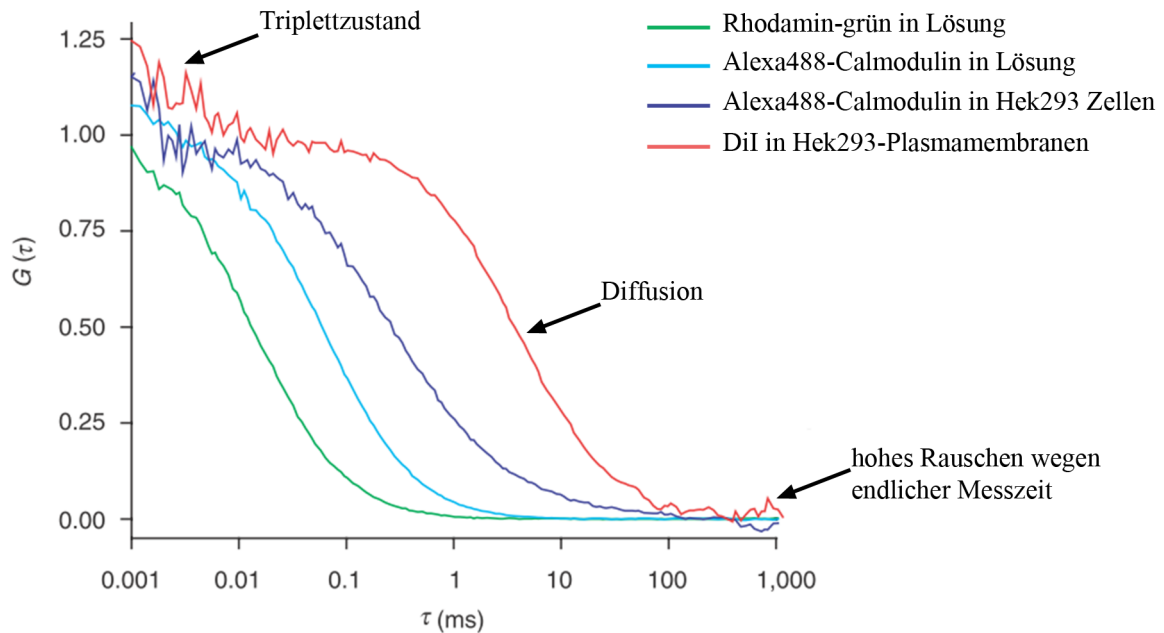


Abbildung 2.12: Autokorrelogramme verschiedener Fluorophore mit ähnlichem Molekulargewicht, jedoch in unterschiedlichen Umgebungen. Rhodamin-grün, also reiner Fluorophor in Lösung, zeigt bereits nach sehr kurzen Verzögerungszeiten τ (logarithmisch skaliert) einen Abfall, welcher auf eine schnelle Diffusion des Moleküls schließen lässt. Das Lipid-Analog DiI (*1, 1'-Dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-Tetramethylinocarbocyanin Perchlorat*), welches in der Plasmamembran einer HEK293-Zelle lokalisiert ist, zeigt hingegen aufgrund der ausschließlich zweidimensionalen Diffusion, des höheren Molekulargewichts und der niedrigeren Fluidität der Plasmamembran eine deutlich längere zeitliche Persistenz. Gleiches gilt für Alexa488-Calmodulin in Lösung und im Zytosol von Zellen. Die ACFs wurden zu visuellen Vergleichszwecken normiert. Jede Kurve stellt eine Mittelung aus sechs Einzelmessungen über je 10 s dar. (Verändert nach Kim, Heinze 2007 [95])

Abbildung 2.12 zeigt beispielhaft Autokorrelogramme von Fluorophoren sowie Fluorophormarkierten Proteinen und die deutlichen Veränderungen des Autokorrelogramms in Abhängigkeit der Umgebung beziehungsweise der intrazellulären Lokalisation. Rhodamin-grün, ein Farbstoff mit einem Molekulargewicht (MW) von ca. 0,6 kDa, kann in wässriger Lösung in drei Dimensionen relativ schnell und frei diffundieren (grünes Autokorrelogramm). In diesem Fall klingt das Autokorrelogramm schnell ab und eine Diffusionszeit von etwa 10 μ s kann bestimmt werden. Wenn ein Farbstoff (Alexa488) an einem Protein gebunden ist, hier an Calmodulin (ein Calcium-bindendes Protein; MW ca. 17 kDa), bewegt es sich langsamer und die Korrelation der Diffusionsbewegung verschiebt sich zu längeren Zeiten (hellblaues Korrelogramm). Das gleiche Heterodimer diffundiert noch

langsamer, wenn es statt in wässriger Umgebung in Zytoplasma vorliegt, einer höher viskosen, biologischen Matrix (dunkelblaues Korrelogramm). Noch langsamer können Moleküle in einer dicht gepackten Umgebung, wie zum Beispiel der Zellplasmamembran diffundieren, wie hier DiI. Das wird im roten Korrelogramm deutlich sichtbar: die Korrelationszeit ist vom Mikrosekunden- in den Millisekunden-Bereich verschoben.

Alle Autokorrelogramme in Abbildung 2.12 zeigen neben den beschriebenen, unterschiedlichen zeitlichen Verläufen, weitere, für FCS-Messungen typische Charakteristika. Der im Kapitel 2.5.1 beschriebene Singulett/Triplett-Übergang (S_0 - T_1) - Übergang und die folgende Relaxation aus dem Triplett- in den Grundzustand zeigt sich als charakteristische Schulter bei kurzen Korrelationszeiten. Erst darauf folgt der durch Diffusion bedingte Abfall des Autokorrelogramms. Bei sehr langen Korrelationszeiten können aufgrund der endlichen Messzeit und der damit verbundenen niedrigen Anzahl an mittleren Intensitätswerten leichte Anstiege des Autokorrelogramms beobachtet werden. Insbesondere Messungen in Zellen oder fluktuierenden Membranen sind davon betroffen, da sich diese Bewegungen, verglichen mit molekularer Diffusion, auf viel längeren Zeitskalen abspielen. Somit stellen Messungen in lebenden und/oder sich bewegenden Systemem immer einen Kompromiss aus ausreichend statistisch-relevanten Messwerten und gleichzeitig kurzer Messzeit dar. Des Weiteren können Effekte wie das Nachglühen der APDs, Schwankungen in der Anregungsintensität und Vibrationen des Mikroskops zu Ungenauigkeiten führen und sind soweit wie möglich zu vermeiden.

Die Ausgabe der zu ermittelnden Parameter wie z.B. der mittleren Diffusionszeit τ_D oder der mittleren Partikelanzahl N erfolgt letztendlich durch Anpassung (*fit*) mit einem theoretischen Modell an die ermittelte Autokorrelationskurve. Der einfachste Fall ist die Brownsche Molekularbewegung einer einzigen molekularen Spezies in Lösung. Dieser Fall wird beschrieben durch Gleichung 2.7 [104].

$$G_\tau = \frac{1}{N} \frac{1}{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})} \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})(\frac{\omega_0}{z_0})^2}} \quad (2.7)$$

Dabei entspricht N der mittleren Anzahl Moleküle im konfokalen Volumen, τ_D der mittleren Diffusionszeit über das Volumen und ω_0 und z_0 dem radialen beziehungsweise axialen Durchmesser des konfokalen Volumens (siehe auch Abbildung 2.11). Diese Gleichung kann durch den in Kapitel 2.5.1 und Abbildung 2.11 beschriebenen Anteil an Molekülen im Triplettzustand erweitert werden, was zu Gleichung 2.8 [124] führt:

$$G_\tau = \frac{1}{N} \frac{1 - T(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{trip}}})}{(1 - T)} \frac{1}{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})} \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})(\frac{\omega_0}{z_0})^2}} \quad (2.8)$$

Hier entspricht T dem Anteil der Moleküle im Triplettzustand und τ_{trip} der Relaxationszeit in den Grundzustand. Innerhalb dieser Arbeit wurden ausschließlich FCS-Messungen an membranständigen Lipiden und amphipatischen Molekülen durchgeführt, weshalb ermittelte Autokorrelogramme mit zweidimensionalen Fitmodellen analysiert wurden. Eine 1-Komponenten Diffusion in zwei Dimensionen wird beschrieben durch Gleichung 2.9 [146]:

$$G_\tau = \frac{1}{N} \frac{1 - T(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{trip}}})}{(1 - T)} \frac{1}{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})} \quad (2.9)$$

In besonderen Fällen kann die Diffusion eines fluoreszenzmarkierten Moleküls durch Dimerisierungsprozesse oder Verstoffwechslungsvorgänge beeinflusst werden, wobei nicht zwangsweise alle Moleküle im konfokalen Volumen gleichermaßen beeinflusst sein müssen und somit unterschiedliche Fraktionen gemessen werden. Ohne ein erweitertes Modell würde die Datenanpassung nur zu ungenauen, über die Fraktionen gemittelten Werten führen. Aus diesem Grund kann das Fit-Modell aus 2.9 um eine zweite Komponente erweitert werden, was zu Gleichung 2.10 führt:

$$G_\tau = \frac{1}{N} \frac{1 - T(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{trip}}})}{(1 - T)} \left\{ \frac{f_1}{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})} + \frac{f_2}{1 + (\frac{\tau}{\tau_D})} \right\} \quad (2.10)$$

Konsequenterweise entspricht f_i den unterschiedlichen Fraktionen. Gleichung 2.10 gilt dabei nur für Fälle, bei denen die Fluorophore gleiche Quanteneffizienzen besitzen oder es sich um den gleichen Fluorophor in unterschiedlichen Zuständen oder unterschiedlichen Wechselwirkungen handelt. Die zu ermittelnden Parameter wie die Diffusionszeit τ_D oder die mittlere Partikelzahl N werden aus diesen Modellen gewonnen. Die Diffusionskonstante D wird schließlich gemäß Gleichung berechnet und steht in direktem Zusammenhang mit τ_D :

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (2.11)$$

2.5.5.2 Einstellungen und Parameter des ConfoCor-3 Moduls

Alle FCS-Messungen wurden mit einem kommerziellen ConfoCor3 System (Carl Zeiss Microimaging; Jena) durchgeführt. Dieses besaß zwei Detektionskanäle, welche jeweils mit einer APD (APD; Perkin Elmer; Waltham; MA; USA) ausgestattet waren. *Bodipy*-markierte Lipide wurden mit der 488 nm Linie des Argon-Ionen-Lasers und DiR mit dem 633 nm HeNe-Laser angeregt. 488 nm Laserlicht wurde mit einem HFT 488 reflektiert und durch ein C-Apochromat 40x/1.2 Wasser-Objektiv auf die Probe fokussiert. Die Emission wurde durch einen Bandpassfilter (505-530 nm) auf die APD geleitet. Der 633 nm He-Ne Laser wurde mit einem HFT 633 reflektiert und ebenfalls durch das C-Apochromat

40x/1.2 Wasser-Objektiv auf die Probe fokussiert. Emittiertes Fluoreszenzlicht wurde durch einen Langpassfilter (650 nm) auf die APD geleitet. Zur Positionierung der Membran ins Zentrum des konfokalen Volumens wurde der Laserstrahl in vertikaler (z) Richtung so lange bewegt, bis die maximale Photonenzählrate erreicht war. Alle Messungen wurden bei einer *AOTF*-Transmission (*acousto optical tunable filter*; akusto-optischer Kristall, mit dem sich u.a. die Intensität des gebeugten Laserlichts einstellen lässt) von 10 % durchgeführt. Dabei wurde eine absolute Laserleistung von 0,1 mW auf Probenebene nie überschritten (vergleiche Tabelle 2.2 und 2.3). Das von den APDs detektierte Signal wurde von einem Software-Autokorrelator (Carl Zeiss Microimaging; Jena) unter Verwendung des Multi- τ -Algorithmus analysiert. Die Korrelator-Zeitinkrementbasis betrug 200 ns, was der vierfachen Abtastrate von 50 ns entsprach, vorgegeben durch die Totzeit der APDs. Die Zählraten wurden über eine Sekunde als gemittelte Zählrate in Photonen/Sekunde in Echtzeit dargestellt. Jede Messung bestand insgesamt aus sechs bis zehn Wiederholungen zu jeweils 10 s und einer Vorbleich-Dauer von drei Sekunden mit 100 % Laserintensität. Die jeweils erste der sechs Wiederholungen wurde aufgrund potenzieller Zählratenzunahmen durch das vorherige Bleichen verworfen.

2.5.5.3 Bestimmung des konfokalen Volumens

Ein besonders wichtiger Aspekt bei FCS-Messungen ist die Kenntnis über die räumliche Ausdehnung des konfokalen Volumens. Das konfokale Volumen beschreibt die räumliche Verteilung der energiedichte des fokussierten Laserstrahls (siehe Abbildung 2.13). Da der radiale Durchmesser ω_0 und der axiale Durchmesser z_0 des konfokalen Volumens wie im vorherigen Kapitel beschrieben als Größen in die Analyse bei quantitativen FCS-Messungen einfließen, ist die genaue Bestimmung dieser beiden Parameter unerlässlich.

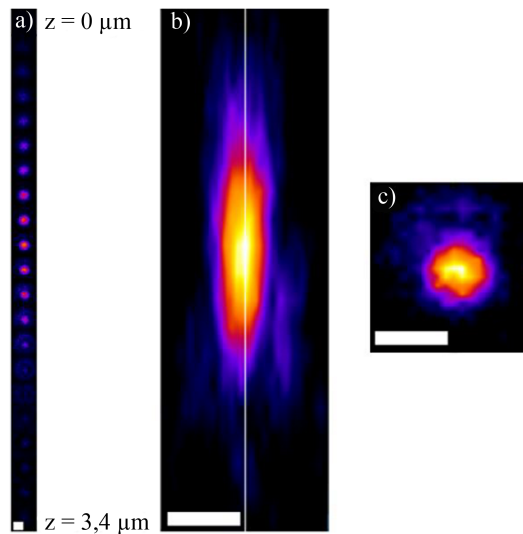


Abbildung 2.13: a)-c): Dreidimensionale Darstellung einer beugungsbegrenzten, fluoreszierenden Kugel in Falschfarbendarstellung. Über die dargestellte Intensitätsverteilung wird die räumliche Ausdehnung und Geometrie des konfokalen Volumens berechnet. a) Darstellung der Kugel in unterschiedlichen Höhen von z . b) Darstellung aller Bilder von a) in x - und z - Richtung, c) und in x - und y - Richtung. Maßstab $0,5 \mu\text{m}$. Verändert nach [96]. Bildrecht: D. Kirchenbüchler, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

Der Fokusbereich des 488 nm Argon- und des 633 nm HeNe-Lasers wurde mit fluoreszierenden Kugeln (*Crimson Beads*; Life Technologies) bestimmt, welche einen definierten Durchmesser von $175 \pm 5 \text{ nm}$ besaßen und somit unter der Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops lagen. Die Stammlösung (2 % Feststoffanteil) wurde im Verhältnis 1:10 000 in PBS verdünnt, 500 μl der Lösung 5 min auf Glasbodenschalen physisorbiert, der Überstand abgenommen und wieder mit 500 μl PBS überschichtet. Am Mikroskop wurden Schnittbildaufnahmen benachbarter Ebenen (z -stacks) eines $35 \times 35 \mu\text{m}$ großen Bildausschnittes gemacht. Pro Bildausschnitt wurden ca. 10 einzeln liegende Kugeln so aufgenommen, dass die obere und untere Basis der Punktspreizfunktion entlang der optischen Achse die Grenzen des Stapels bildeten [128]. Mit dem Matlab Programm „*getfluodots.m*“ (Eigenentwicklung von Dr. N. Kirchgeßner; IBN-4) wurden die Koordinaten der Kugeln bestimmt. Anschließend wurde mit dem Programm „*FCS_PSFdet.m*“ (Eigenentwicklung von Dr. N. Kirchgeßner; IBN-4) an den zuvor ermittelten x - und y - Koordinaten das Intensitätsmaximum in z -Richtung bestimmt und an die ermittelte Helligkeitsverteilung eine 3D-Gaussfunktion angepasst, um den Fokusbereich ($1/e^2$ -Wert bei gaussförmiger Intensitätsverteilung) bestimmen zu können. Alle Einzelwerte wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Die Bestimmung des Fokusbereiches-

sers des 488 nm Argon-Ionen-Lasers erfolgte auf gleiche Weise durch Cornelia Monzel, ICS-7. Tabelle 2.1 fasst alle ermittelten Parameter zusammen.

$\lambda = 488 \text{ nm}$		$\lambda = 633 \text{ nm}$	
Radius	#	Radius	#
FWHM	$294 \pm 6 \text{ nm}$	FWHM	$350 \pm 25 \text{ nm}$
ω_0	$251 \pm 9 \text{ nm}$	ω_0	$302 \pm 21 \text{ nm}$
z_0	$1219 \pm 14 \text{ nm}$	z_0	$1450 \pm 32 \text{ nm}$

Tabelle 2.1: Ergebnisse der Bestimmung der räumlichen Ausdehnung des konfokalen Volumens.

2.5.5.4 Bestimmung der Laserleistung mit dem ConfoCor-3

Die Laserleistung im FCS-Modus wurde mit Hilfe eines optischen Leistungsmessgerätes (Modell 1916-C, Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt, Deutschland) auf Ebene der Probe bestimmt. Dazu wurde das Leistungsmessgerät an eine freie Stelle des Objektivrevolvers eingebaut und mind. eine Stunde thermisch equilibrieren gelassen. Das ConfoCor-Modul wurde auf eine Einzelmessdauer von 30 sek. ohne Vorbleich-Phase eingestellt. Unter verschiedenen *AOTF*-Einstellungen wurde die Laserleistung des 488 nm-Argon-Lasers und des 633 nm-HeNe-Laser bestimmt. Tabelle 2.2 und 2.3 geben einen Überblick über die ermittelten Werte.

488 nm Argon-Ionen-Laser	AOTF 100 %	AOTF 10 %	AOTF 1 %
Laserintensität [%]	Laserleistung [$\mu\text{W}/\text{cm}^2$]		
100	2670	202	18,8
50	1300	49,6	4,3
20	510	17	1,5
10	250	8,1	0,7
5	124	4	0,3
3	74,3	2,4	0,2
2	50,5	1,7	0,1
1	25,6	0,8	0,07

Tabelle 2.2: Auf Probenebene gemessene Laserleistung des 488 nm Argon-Ionen-Lasers unter verschiedenen *AOTF*-Einstellungen.

633 nm HeNe-Laser	AOTF 100 %	AOTF 10 %	AOTF 1 %
Laserintensität [%]	Laserleistung [$\mu\text{W}/\text{cm}^2$]		
100	1270	90,4	8,6
50	621	20,8	1,9
20	246	7,2	0,6
10	123	3,5	0,3
5	61,3	1,8	0,1
3	36,3	1,1	0,09
2	24,1	0,7	0,06
1	11,9	0,3	0,03

Tabelle 2.3: Auf Probenebene gemessene Laserleistung des 633 nm HeNe-Lasers unter verschiedenen *AOTF*-Einstellungen.

2.6 Durchflusszytometrie

Mittels der Durchflusszytometrie können große Mengen suspendierter Zellen einzeln auf ihre Streu- und Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. Dazu wird eine Zellsuspension durch Anlegung eines Unterdrucks in eine Mikrokapillare gesaugt. Innerhalb der Kapillare werden die Zellen durch Mikrofluidik weit genug voneinander separiert, um einzeln durch zwei Laser (488 nm und 640 nm) angeregt zu werden. Es wird zum einen das Streulicht unter 10° zum Laserstrahl (das sogenannte Vorwärtsstreulicht) sowie im 90° -Winkel zum Laserstrahl detektiert (das sogenannte Seitwärtsstreulicht). Teile des Seitwärtsstreulichtes werden durch dichroitische Spiegel abgelenkt und gelangen weiter zu verschiedenen Farbteilern, welche emittiertes Licht unterschiedlicher Wellenlänge zu den Detektoren passieren leiten, wo vorgeschaltete Bandpassfilter den Detektionsbereich weiter einschränken. Abbildung 2.14 stellt schematisch die Anregungslaser sowie die Detektionskanäle des verwendeten Durchflusszytometers (Guava Easyocyte 8HT, Merck KGaA) dar.

2.6.1 Probenvorbereitung für die durchflusszytometrische Analyse

Jeweils 20 000 CHO-K1 Zellen wurden auf Lebendzell-Mikroskopieschalen kultiviert und wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben mit Liposomen inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit dem cLSM mikroskopiert und anschließend bei 4°C gelagert, bis alle Proben mit Liposomen inkubiert und mikroskopiert waren. Die Zellen wurden anschließend mit 250 μl Trypsin/EDTA je Schale abgelöst, der Verdau mit 500 μl DMEM-F12 Medium

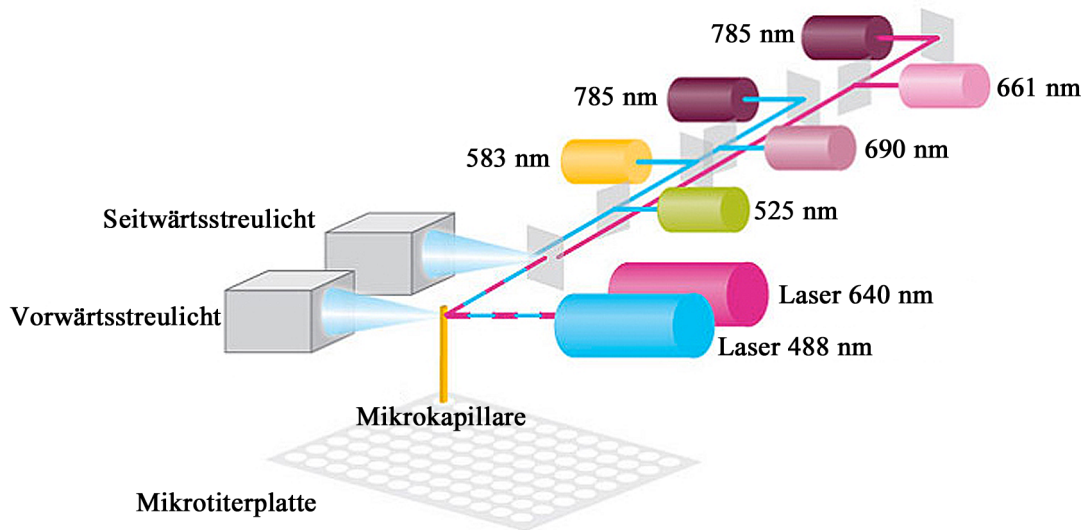


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des verwendeten Durchflusszytometers mit den verschiedenen Detektionskanälen.
Quelle: www.millipore.com/flowcytometry

gestoppt und für 5 min bei 500 g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, indem jedes Pellet in 500 µl einer 10 %igen Lösung von *Lösung A* (Merck Millipore) resuspendiert und für 15 min bei RT darin inkubiert wurde. Die fixierten Zellen wurden wieder für 5 min bei 500 g pelletiert und in 500 µl PBS resuspendiert. 200 µl dieser Zellsuspension wurden in jeweils eine der Wannen einer 96-Wannen Mikrotiterplatte überführt.

Einstellungen und Parameter des Durchflusszytometers

Aus jeder Wanne 10 000 Ereignisse gezählt. Im Forwärtsstreukanal wurde dazu ein Grenze gesetzt, welche Partikel und Zelltrümmer sowie größere, intakte Zellen voneinander unterscheiden konnten. Die ermittelte Ereigniswolke wurde weiter eingegrenzt, indem nur die Fluoreszenzsignale aus der annähernd gleich großen Verteilungswolke (den intakten Zellen) analysiert wurden. Im Fall von Proben, welche zuvor mit *Bodipy*-haltigen Liposomen inkubiert wurden, wurde der 488 nm Laser zur Anregung verwendet. Die Fluoreszenz des Monomers wurde in dem Grün-Kanal zwischen 510 und 530 nm detektiert und gegen die Fluoreszenz des Excimers, detektiert im Rot1-Kanal zwischen 665 und 715 nm, aufgetragen. Im Fall von *DiIC₁₈(7)*-haltigen Liposomen wurde der 640 nm Laser zur Anregung verwendet. Die Fluoreszenz wurde mit dem NIR2-Kanal zwischen 750 und 820 nm detektiert und gegen das Signal des Forwärtstreukanals aufgetragen.

2.7 Statistische Datenanalyse

Die ermittelten Diffusionskonstanten (siehe Kapitel 2.5.5) wurden mit dem Programm *Origin 8* (OriginLab; Northhampton; MA; USA) statistisch analysiert. Der Mittelwert (\bar{x}) wurde gemäß Gleichung 2.12

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (2.12)$$

bestimmt, wobei N der Anzahl der Einzelwerte und x_i den gemessenen Einzelwerten entsprach. Die Standardabweichung (σ_x) wurde gemäß Gleichung 2.13 ermittelt.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.13)$$

Das Konfidenzintervall wurde gemäß Gleichung 2.14 berechnet,

$$CI_x = t_{(N,P)} * \frac{\sigma_x}{\sqrt{N}} \quad (2.14)$$

wobei $t_{(N,P)}$ dem Student-Faktor bei gegebener Stichprobengröße N und dem Konfidenzniveau P entspricht. Gemittelte Messwerte wurden als $\bar{x} \pm \sigma_x$, der Standardabweichung der Verteilung, angegeben. Bei großen Stichprobenumfängen wurden gemittelte Messwerte als $\bar{x} \pm CI_x$, also dem 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert \bar{x} angegeben. Die t -Werte für verschiedene Freiheitsgrade N mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von $P = 95\%$ wurden entnommen aus *Tabellenwerk Statistik* (Klenke, 2011) [97].

Mit dem *Students-Test* wurden die Mittelwerte der Diffusionskonstanten \bar{D} bei Stichprobenumfängen ≥ 20 auf ihre Gleichheit bei einem Fehlerniveau von 0,21 %, 1 % und 5 % überprüft. Die Prüfgröße u wurde gemäß Gleichung 2.15 bestimmt,

$$u = \frac{\|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\|}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}} * \sqrt{N} \quad (2.15)$$

wobei die Varianz s_x^2 gemäß Gleichung 2.16 bestimmt wurde.

$$s_x^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1} \quad (2.16)$$

Mit dem *Lord-Test* wurden die Mittelwerte der Diffusionskonstanten \bar{D} bei Stichprobenumfängen ≤ 20 auf ihre Gleichheit bei einem Fehlerniveau von 0,29 %, 1 % und 5 % überprüft. Die Prüfgröße u wurde gemäß Gleichung 2.17 bestimmt.

$$u = \frac{\|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\|}{\frac{R_1 + R_2}{2}} \quad (2.17)$$

Dabei wird der Betrag der Differenzen der Mittelwerte \bar{x}_1 und \bar{x}_2 der beiden Verteilungen in Relation zur halben Summe der beiden Spannbreiten R_1 und R_2 gesetzt ⁶. Die Signifikanzschränke wurde aus *Einführung in die angewandte Statistik für Biowissenschaftler* (Kesel, 1999 [93]) entnommen.

In dieser Arbeit sind in einigen Abbildungen bei vergleichenden Analysen Symbole über den Graphen angegeben. Diese stellen die ermittelte Signifikanz in Abhängigkeit der Irrtumswahrscheinlichkeit dar. Dabei gilt: (*) entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %; (**) entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %; (***) entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,29 %.

Die ermittelten Autokorrelationskurven und Residuen wurden im Text-Format abgespeichert und mit *Origin 8* graphisch dargestellt.

⁶Die Spannweite gibt die Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Messwert an.

3 Etablierung fusogener Liposomen als hocheffizientes Lipid-Interkalationssystem in zelluläre Plasmamembranen

Große Teile der vorliegenden Arbeit basieren auf Experimenten mit fusogenen Liposomen (FLs). FLs wurden 2009 von Dr. Agnes Csiszar am Institut entwickelt und waren zu Beginn des Promotionsvorhabens kaum charakterisiert und noch nicht für zellbiologische bzw. medizinische Fragestellungen angewandt worden. Im folgenden Kapitel wird die Eignung von FLs als geeignetes Lipidinterkalationssystem für zellbiologische und medizinische Fragestellungen hinterfragt. Dazu werden biologisch relevante Lipide durch FLs interkaliert und die intrazelluläre Verteilung dieser Lipide untersucht. Die Effizienz der Interkalation über FLs im Vergleich zu konventionellen Methoden sowie potenzielle zytotoxische Effekte werden ebenfalls untersucht. Große Teile des folgenden Kapitels wurden in Kleusch et al., *Fluorescent lipids: functional parts of fusogenic liposomes and tools for cell membrane labeling and visualization* (*Molecules*, 2012) veröffentlicht [99].

3.1 Einleitung

Biologische Membranen sind seit einigen Jahrzehnten das Ziel intensiver Forschung. Dabei hat sich die Vorstellung über Struktur und Funktion sehr stark verändert [59, 154]). Fluoreszenzmarkierte Lipide wurden und werden intensiv zur funktionellen und strukturellen Erforschung der biologischen Membran eingesetzt. So konnten beispielsweise Zellkompartimente wie der Golgi Apparat (GA), das Endoplasmatische Retikulum (ER), Endosomen und Lysosomen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Lipiden lokalisiert und charakterisiert werden [165, 132, 157, 102]. Neben der Identifikation von Kompartimenten wurden fluoreszente Reportermoleküle auch zur Aufklärung zellulärer Prozesse, bei denen Membranlipide unmittelbar beteiligt sind, eingesetzt. So konnte beispielsweise die Bildung von Mikrodomänen, deren Zerfall und Reorganisation beobachtet werden [46, 112, 118, 155, 176, 109]. Neue Erkenntnisse aus dem Bereich der Protein-

Lipid-Wechselwirkungen konnten ebenfalls mit Hilfe markierter Lipide gewonnen werden [91, 142]. Neben zellbiologischen Fragestellungen wurden fluoreszenzmarkierte Moleküle auch erfolgreich zur Charakterisierung physikalischer Eigenschaften von Lipiddoppelschichten eingesetzt [89, 117]. So konnten Erkenntnisse über die Polarität, Fluidität, Lipidasymmetrie und Lipiddiffusion in biomimetischen Lipiddoppelschichten gewonnen werden [142, 146, 61, 88].

Somit basiert ein Großteil der gewonnenen Erkenntnisse über biologische Membranen auf der Verwendung fluoreszenzmarkierter Lipide sowie fluoreszenter, amphipatischer Moleküle. Biomimetische und biologische Membranen müssen allerdings fluoreszent markiert werden, um auf lichtmikroskopischen Methoden basierende Experimente zu ermöglichen, da sie von Natur aus keine Fluorophor-haltigen Moleküle besitzen. Damit Fluorophore in lichtmikroskopischen Experimenten sinnvoll eingesetzt werden zu können, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: Zum einen muss der Fluorophor in gängigen lichtmikroskopischen Systemen detektierbar sein, zum anderen muss das mit dem Fluorophor markierte Molekül die Eigenschaften des unmarkierten, nativen Moleküls so genau wie möglich widerspiegeln. Dabei scheinen sich diese beiden Bedingungen gegenseitig auszuschließen, da Fluorophore immer aus großen, aromatischen Gruppen bestehen und natürlich vorkommenden Membranlipiden solche Gruppen gänzlich fehlen. Dennoch werden fluoreszenzmarkierte Lipide seit Jahren erfolgreich in zahlreichen Forschungszweigen zur Aufklärung der Funktion und Struktur von Membranen eingesetzt (siehe oben).

Die zelluläre Membran besitzt neben ihren Struktur-gebenden Eigenschaften auch eine Barrierefunktion, mit der sie die Zelle vor zytotoxischen oder fremden Molekülen schützen kann. Somit ist die Interkalation fluoreszenzmarkierter Moleküle in die Membran lebender Zellen oftmals eine Herausforderung. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahrzehnten Methoden entwickelt, um Lipide in Zellen und Membranen interkalieren zu können. Die einfachste und uneffektivste Art der Lipidinterkalation stellt die Inkubation von Zellen mit Medium dar, dem fluoreszenzmarkierte Lipide zugefügt wurden. Die zugefügten Moleküle werden dann mittels Endozytose ins Zellinnere aufgenommen oder durch energieabhängige Flippasen in die Plasmamembran (PM) interkaliert [136]. Diese Methode funktioniert sehr gut für das GA-Markermolekül *Bodipy FL-Ceramid*. Dieses reichert sich bei Inkubation mit adhären Zellen hauptsächlich im GA, dem Speicherort für Ceramide, und in geringem Maße auch im ER, dem Syntheseort, an [131, 54]. Aus diesem Grund wird dieses fluoreszenzmarkierte Ceramid häufig für Markierung und Identifikation dieser Zellkompartimente verwendet [165].

Einige künstlich hergestellte, amphipatische Moleküle wie zum Beispiel *DiO* oder *Vybrant-DiD* oder komplizierte Funktions-Spacer-Lipid-Konstrukte können von adhären Zellen ebenfalls effizient aus Zellkulturmedium aufgenommen werden und werden folglich als PM-Marker verwendet [66, 76]. Bei diesen Molekülen handelt es sich um künstlich

hergestellte Moleküle, welche keine oder kaum Ähnlichkeit mit zelleigenen Molekülen aufweisen. Während die Flippasen-vermittelte Aufnahme für einige der bis hier beschriebenen Moleküle effizient funktioniert, lassen sich die meisten Membranlipide nicht über einfache Inkubation in Medium in Zellmembranen interkalieren.

Aus diesem Grund wurde von Lipsky und Pagano 1985 eine Protein-basierte Interkalationsmethode vorgestellt [114]. Diese Methode basiert auf der Komplexbildung fluoreszenzmarkierter Lipide an BSA. Adhärente Zellen werden hier bei 4°C mit dem Lipid/BSA-Komplex, verdünnt in Medium, für 30 min inkubiert. Darauf folgt eine schnelle Temperaturerhöhung auf 37°C. Dieser Vorgang führt zur Aktivierung zellschützender Prozesse als Antwort auf die sehr niedrige Inkubationstemperatur und generell stark verlangsamten Stoffwechselvorgängen. Während der Niedrigtemperaturphase adhären die Lipid/BSA-Komplexe passiv auf der Zellmembran. Bei dem nachfolgenden Temperaturanstieg kommt es zu einer schnellen, endozytotischen Aufnahme der Komplexe. Während dieses Prozesses werden die fluoreszenzmarkierten Lipide gemäß ihrer biologischen Funktion in unterschiedlichen Zellorganellen angereichert und können lichtmikroskopisch analysiert werden. Diese Methode erlaubte somit zum ersten Mal die Analyse von Lipidtransportprozessen in lebenden Zellen. Allerdings besitzt die Methode auch einige Nachteile. Beispielsweise werden protektive Prozesse als Antwort auf den Temperaturstress aktiviert [166, 160]. Zusätzlich ist die Effizienz der endozytotischen Aufnahme immer noch gering, was die Detektion des Fluoreszenzsignals bei niedriger Anregungsleistung schwierig gestaltet. Des Weiteren ist eine enzymatische Veränderung der Lipide während des endosomalen Transports nicht auszuschließen.

Aus diesem Grund wurde 2010 von Csiszar et al. am Institut ein neuartiges Lipid-Interkalationssystem entwickelt [37]. Dieses System basiert auf der Tatsache, dass Liposomen, welche aus neutral und positiv geladenen Lipiden und einem bestimmten Anteil fluoreszenzmarkierter Moleküle bestehen, in der Lage sind, effizient und schnell mit der Plasmamembran adhärenter Zellen zu fusionieren. Das neutral geladene Lipid ist in diesem Fall *DOPE* und das positiv geladene Lipid *DOTAP* (vgl. Strukturformeln in Kapitel 2.2.1). Derartige Liposomen werden als fusogene Liposomen (FLs) bezeichnet. Durch die beschriebene Membranfusion interkaliert die fluoreszente Liposommembran in die zelluläre Plasmamembran, in der sich die interkalierten Lipide schnell und effizient verteilen. Dabei sind keine weiteren Bedingungen wie zum Beispiel Temperatur- oder Osmolaritätsänderungen nötig.

Obwohl alle von den Autoren getesteten, fluoreszenzmarkierten Phospholipide in der Lage sind, Membranfusion auszulösen, wird dazu ein bestimmter Konzentrationsbereich von 2-5 mol% benötigt [37]. Diese relativ hohe Konzentration des fluoreszenzmarkierten Moleküls ist einerseits von Vorteil für lichtmikroskopische Analysen wie *FRAP* (engl. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*), mit denen sich die Diffusion und Bindungskine-

tik fluoreszenzmarkierter Moleküle untersuchen lässt [8, 162]. Die nötige Konzentration fluoreszenzmarkierter Moleküle kann dabei durch Interkalation mit FLs effizient erreicht werden [37]. Andere Methoden zur Analyse der Kinetik von Molekülen benötigen allerdings sehr niedrige Fluorophorkonzentrationen, wie die in dieser Arbeit angewendete Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie [145].

Um in der Lage zu sein, fluoreszenzmarkierte Moleküle über einen breiteren Konzentrationsbereich in tierische Zellmembranen interkalieren zu können, wurde in meiner Diplomarbeit ein erweitertes und verbessertes Fusionssystem entwickelt. Der entscheidende Unterschied ist hier die Verwendung eines synthetischen, amphipatischen Moleküls, welche die Fusion auslöst, ansonsten aber keine biologische Relevanz besitzt und schnell lysosomal abgebaut wird [98]. Die Konzentration dieses fusionsauslösenden Moleküls wird so angepasst, dass durch Zugabe des biologisch relevanten Lipids die von Csiszar et al. benötigten 2-5 mol% fluoreszenzmarkierter Komponenten erreicht werden. Ein Beispiel für den Vorteil des Systems ist die Interkalation von Cholesterol. Ein veränderter Cholesterolgehalt beeinflusst die Membransteifigkeit und die Bildung von Mikrodomänen [27]. Durch die verbesserten FLs können fluoreszenzmarkierte Moleküle in einer für die Fragestellung angepassten Konzentration interkaliert werden (zum Beispiel so wenig Cholesterol wie zur Detektion notwendig). Im folgenden Kapitel wurden derartige fusogene Liposomen eingesetzt, um biologisch relevante Glycerophospholipide, Sphingolipide, Glycosphingolipide, Sterole sowie synthetische, amphipatische Moleküle in tierische Plasmamembranen interkalieren zu können. Die intrazelluläre Verteilung der Lipide und der Einfluss der Interkalationsmethode auf die intrazelluläre Lokalisation wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Des Weiteren wurde die Effizienz des Systems im Vergleich zu konventionellen Interkalationsmethoden sowie potenziell zytotoxische Effekte analysiert.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Identifizierung von Zellorganellen durch Organell-spezifische Markermoleküle

Vor der Charakterisierung und Anwendung fusogender Liposomen für die Analyse zellulärer Lipidtransport- und Lipidinteraktionsprozesse, mussten potenzielle Zellorganellen, welche unmittelbar beim Fusions- oder dem Transportprozess beteiligt sind, identifiziert werden. Dies geschah mit Hilfe Organell-spezifischer Markermoleküle. Die Plasmamembran (PM) von *CHO-K1* Zellen wurde mit dem lipophilen Markermolekül *Vybrant-DiI* gefärbt (siehe Kapitel 2.1.4.1). Der Golgi Apparat (GA) und das endoplasmatische Retikulum (ER) wurden durch Inkubation mit einem *Bodipy FL-Ceramid*/BSA-Komplex

gefärbt (siehe Kapitel 2.1.4.2 und 2.3.3 zur Herstellung von Lipid/BSA-Komplexen). Lysosomen wurden mit dem Markermolekül *LysoTracker Green DND-26* markiert (siehe Kapitel 2.1.4.3). Sofort nach der Inkubation mit dem PM-Marker zeigte sich eine homo-

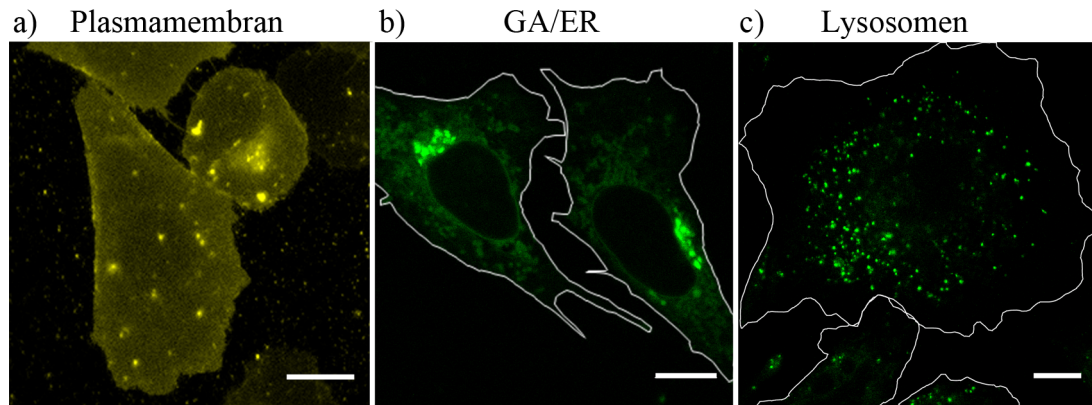


Abbildung 3.1: Identifizierung von Zellorganellen durch Organell-spezifische Markermoleküle.

a) Färbung der PM von *CHO-K1* Zellen durch *Vybrant-DiI*. b) Färbung des GA und ER mit *Bodipy FL-Ceramid/BSA*-Komplex. c) Markierung der Lysosomen durch *LysoTracker Green DND-26*. Die Zellumrandung wurde zur Visualisierung des Zellkörpers in b) und c) ausgehend von einem Phasenkontrastbild (nicht gezeigt) nachträglich eingezeichnet. Maßstab 10 µm. Verändert nach Kleusch et al. 2012 [99].

gen gefärbte Zelloberfläche (siehe Abbildung 3.1 a). Beim Fokussieren von Zellunterseite zur Zelloberseite war die Zellumrandung deutlich zu sehen mit fast keinem Signal im Zellinneren (nicht gezeigt). Dafür bildeten sich nach zwei bis drei Minuten zuerst kleine, intensiv fluoreszierende Punkte auf der Zelloberfläche und es bildete sich ein mit der Zeit stärker werdendes, intrazelluläres Signal.

Nach Inkubation mit dem *Bodipy FL-Ceramid/BSA*-Komplex zeigte sich ein intensiv fluoreszierendes Signal direkt am Zellkern anliegend (siehe Abbildung 3.1 b). Diese Struktur wurde als GA identifiziert. Zusätzlich war ein schwächeres, den gesamten Zellkörper ausfüllendes, filamentöses Signal zu sehen. Dies wurde als ER identifiziert. Die Signale des GA und ER ließen sich strukturell nicht voneinander unterscheiden. Dies gelang ausschließlich durch die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, da der Lipid/BSA-Komplex im GA stark angereichert wird [113].

Lysosomen konnten bis auf den Zellkern über den gesamten Zellkörper lokalisiert werden (siehe Abbildung 3.1 c). Sie zeigten sich als kleine, intensiv fluoreszierende Einschlüsse, welche sich teilweise im Zytoplasma bewegten. Allerdings war das Fluoreszenzsignal innerhalb von 10 min komplett verschwunden.

Die zelluläre Lokalisation dieser Organell-spezifischen Marker konnte nachfolgend mit

Signalen verglichen werden, die durch Interkalation von fluoreszenzmarkierten Lipiden mittels FLs erreicht wurden.

3.2.2 Kinetik der Plasmamembran-Färbung mittels fusogener Liposomen

Um die schnelle Kinetik der Membranfusion sichtbar zu machen, wurden primäre, kardiale Myofibroblasten (siehe Kapitel 2.1.2) mit FLs inkubiert, welche zum einen das fluoreszente, amphipatische Molekül *DiIC*₁₈(7) enthielten, um das fluoreszenzmarkierte Sphingolipid *Bodipy FL-SM* (vergleiche Strukturformeln in Kapitel 2.2.3) zu untersuchen. Von *DiIC*₁₈(7) und *Bodipy FL-SM* konnte in Vorexperimenten ausgeschlossen werden, dass diese Moleküle ohne spezielle Interkalationsmethode in zelluläre Membranen eingebaut werden konnten. Die Interkalation wurde mit FLs folgender Zusammensetzung getestet:

$$DOPE/DOTAP/DiIC_{18}(7)/Bodipy\ FL-SM = 1/1/0.05/0.05\ (w/w)$$

Die Zugabe der FLs zu den adhären Zellen erfolgte unter dem cLSM und wurde zeitgleich aufgezeichnet. Primäre, kardiale Myofibroblasten boten den Vorteil, dass sich bedingt durch den sehr flachen Zellkörper sowohl die obere als auch die untere PM im Fokus des Mikroskops befanden.

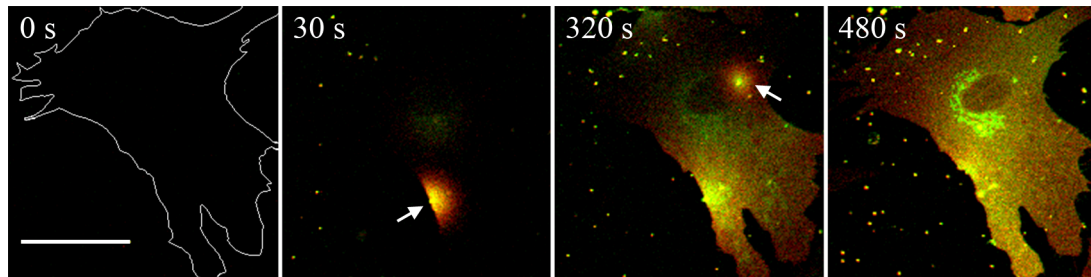


Abbildung 3.2: Inkubation primärer, kardialer Myofibroblasten mit FLs für 8 min.

FLs, welche *Bodipy FL-SM* und *DiIC*₁₈(7) enthalten, wurden zu adhären Zellen gegeben. Die Bildreihe stellt eine Überlagerung der beiden Detektionskanäle für *Bodipy FL-SM* (grün) und *DiIC*₁₈(7) (rot) dar. Gelbe Bereiche zeigen eine vollständige Signalüberlagerung beider Moleküle. Der Zellkörper wird im linken Ausschnitt durch die weiße Umrandung angedeutet (ausgehend vom Phasenkontrastkanal [nicht gezeigt]). Die Fusion einzelner FLs bei Kontakt mit der PM ist durch weiße Pfeile hervorgehoben. Maßstab 50 μ m. Aus Kleusch et al. 2012 [99].

Im Moment Zugabe der FLs konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abbildung 3.2, 0 s). Einige Sekunden nach Zugabe sedimentierten erste FLs (kleine, gelbe Punkte)

Richtung Substrat beziehungsweise in Richtung der adhärenen Zellen. Bei Kontakt erfolgte die Fusion zwischen Liposom und PM (siehe Abbildung 3.2, weiße Pfeile bei 30 s und 320 s). Danach wurden die fluoreszenzmarkierten Moleküle in der Membran sichtbar, wobei gelbe Signale auf eine Kollokalisierung der Moleküle hindeuteten. Dieser Prozess wiederholte sich während der Inkubationszeit von 8 min mehrere Male, bis die gesamte Zelle deutlich fluoreszent markiert war. Dabei war zu beobachten, dass sich die beiden fluoreszenzmarkierten Moleküle unterschiedlich schnell vom Fusionsursprung ausbreiteten. *Bodipy FL-SM* verteilte sich etwas langsamer als *DiIC₁₈(7)*. Diese Signalkopplung verschwand aber nach einigen Minuten (vergleiche Abbildung 3.1 a) und Abbildung 3.2, 320 s) und die PM erschien homogen gefärbt. Neben der homogen gefärbten PM wurde der GA nach einigen Minuten als intensives, grünes Signal angrenzend an den Zellkern sichtbar (vergleiche Abbildung 3.1 b) und Abbildung 3.2, 480 s). Während der Inkubation zeigten die Zellen keinerlei morphologische Veränderungen und blieben auf dem Substrat adhärert. Auch einige Stunden nach Inkubation waren keine negativen Auswirkungen auf die Zellmorphologie zu erkennen.

3.2.3 Zeitliche Analyse der intrazellulären Verteilung von *Bodipy FL-SM* und *DiIC₁₈(7)* nach Interkalation durch FLs

Um den zeitlichen Verlauf der Lipidverteilung über einen längeren Zeitraum beobachten zu können, wurde *Bodipy FL-SM* und *DiIC₁₈(7)* wie im vorherigen Kapitel durch FLs in adhärenen Zellen interkaliert. Diesmal wurden *CHO-K1* Zellen verwendet, um die Interkalation in diesen Zelltyp zu überprüfen. Die Signalverteilung wurde insgesamt über einen Zeitraum von 48 h verfolgt (siehe Abbildung 3.3).

30 min nach Vesikelfusion war der Großteil des Signals von *Bodipy FL-SM* zwischen PM und GA verteilt mit einer kleinen Fraktion im ER. Die Lipidverteilung unmittelbar nach Interkalation in primäre Myofibroblasten zeigte ein ähnliches Bild (vergleiche Abbildung 3.3, 0,5 h und 3.2, 480 s). Das Fluoreszenzsignal konnte über einen Zeitraum von 48 h detektiert werden, wobei die Signalintensität über die Dauer des Experiments aufgrund der starken Teilungsrate von *CHO-K1* Zellen (zwischen 24 und 48 h nach Interkalation annähernd 2 Mitosen; in Abbildung 3.4 unten zu sehen) deutlich abnahm (siehe Abbildung 3.3, 24 h & 48 h). Bemerkenswert war hier, dass das Signal des Sphingolipids über den gesamten Beobachtungszeitraum in der PM detektiert werden konnte. An dieser Stelle muss beachtet werden, dass zwar das Signal des Fluorophors detektiert werden konnte, es aber aufgrund einer Verstoffwechslung zu strukturellen Veränderungen des Lipids kommen könnte.

DiIC₁₈(7) wurde zeitgleich interkaliert und zeigte nach 30 min ein deutliches, homogenes Fluoreszenzsignal in PM, GA und vorallem ER. Dabei war das Signal bereits nach 24 h

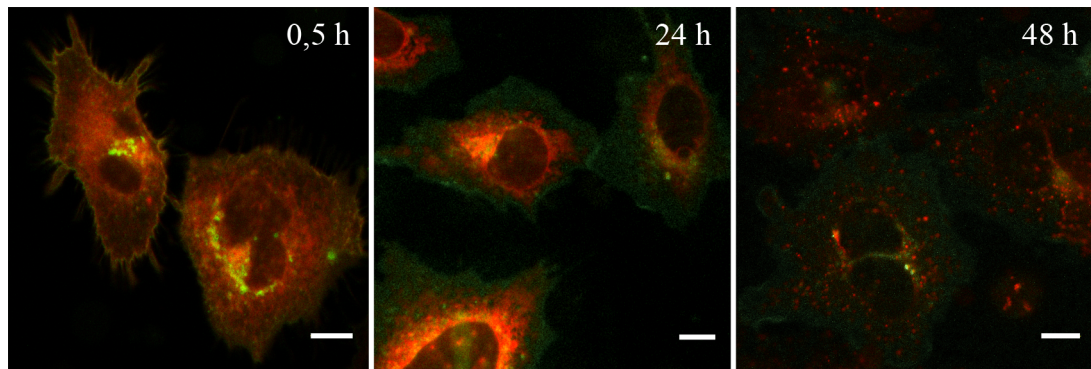


Abbildung 3.3: Interkalation von *Bodipy FL-SM* und *DiIC₁₈(γ)* in CHO-K1 Zellen durch FLs und Analyse der Signalverteilung über 48 h.

Die Signale von *Bodipy FL-SM* (grün) und *DiIC₁₈(γ)* (rot) wurden 0,5 h, 24 h und 48 h nach erfolgter Vesikelfusion mit dem cLSM analysiert. Die Bildreihe zeigt eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle. Um die Lokalisation beider Moleküle nach 24 h und 48 h dennoch sichtbar zu machen, wurden die Signal digital verstärkt. Maßstab = 10 μm . Aus Kleusch et al. 2012 [99].

ausschließlich im GA und ER detektierbar, wobei bereits erste lysosomale Strukturen markiert waren. Nach weiteren 24 h waren ein schwaches ER-Signal sowie eine Vielzahl lysosomaler Strukturen detektierbar.

3.2.4 Einfluss von FLs auf Proliferationsrate und potenziell zytotoxische Effekte

Potenziell zytotoxische Effekte, welche durch die Vesikelfusion auftreten können und den Einfluss auf Proliferationsraten wurden über einen Zeitraum von 48 h bestimmt. Der Anteil toter Zellen nach Vesikelfusion wurde durch eine Trypan Blau-Färbung bestimmt (siehe Kapitel 2.1.3). Gleichzeitig wurden absolute Zellzahlen zur Bestimmung der Proliferation ermittelt. Mit FLs behandelte Proben wurden mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen.

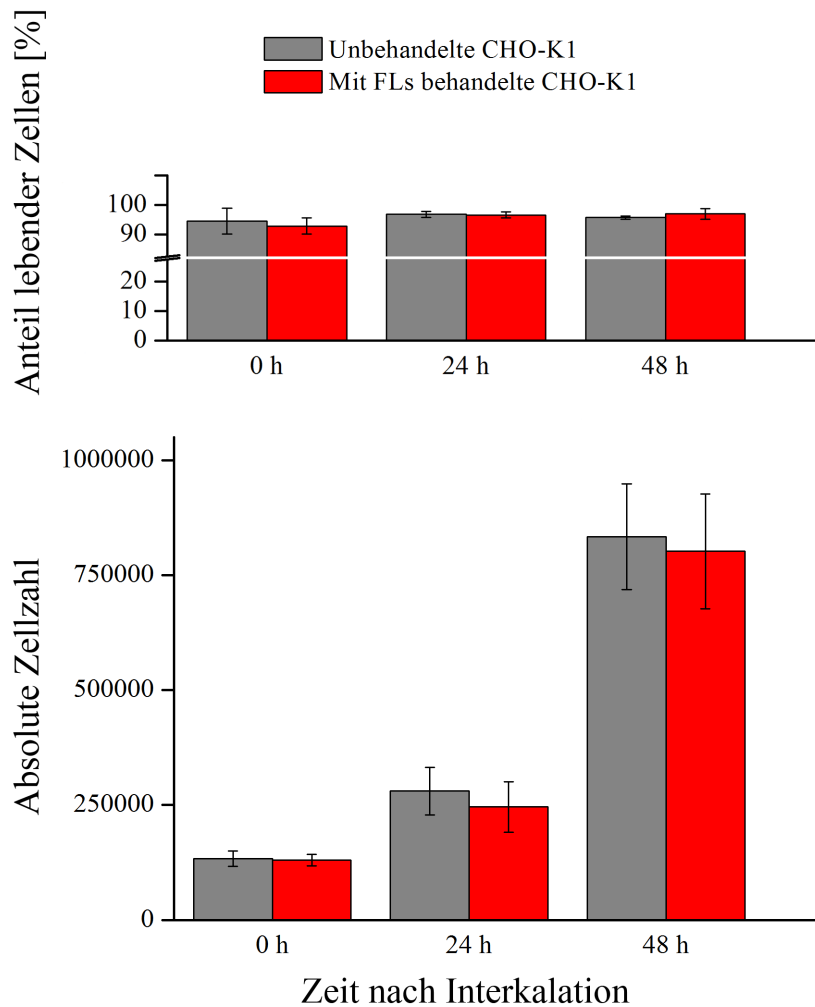


Abbildung 3.4: Potenziell zytotoxische Effekte nach Behandlung von CHO-K1 Zellen mit FLs im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle.

CHO-K1 Zellen wurden mit FLs behandelt und über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Der Anteil lebender Zellen wurde durch eine Trypan Blau-Färbung direkt nach Vesikelfusion, nach 24 h und 48 h bestimmt. Absolute Zellzahlen als Hinweis auf Veränderungen der Proliferationsrate wurden ebenfalls ermittelt. Gezeigt ist der Mittelwert \bar{x} , die Fehlerbalken geben die Standardabweichung σ_x an. $N = 5$.

Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, war der Anteil lebender Zellen bei den FL-behandelten Proben vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle (zwischen 94 und 97%). Auch die absoluten Zellzahlen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

3.2.5 Vergleich der Lipid-Interkalation durch fusogene Liposomen und Lipid/BSA-Komplexe

Um die Lipidinterkalation über FLs mit konventionellen, etablierten Methoden zu vergleichen, wurden CHO-K1 Zellen mit FLs sowie mit Lipid/BSA-Komplexen (Herstellung siehe Kapitel 2.3.3) inkubiert. Die Inkubationsbedingungen beider Methoden unterschieden sich deutlich. So wurden die Zellen für die Färbung mittels FLs 10 min bei 37°C mit den Liposomen inkubiert (detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 2.3.2). Bei Färbung mittels Lipid/BSA-Komplexen wurden die Zellen 30 min bei 4°C mit den Komplexen inkubiert und anschließend auf 37°C erwärmt und weitere 30 min inkubiert, wie von Lipsky und Pagano 1985 zum ersten Mal beschrieben [113].

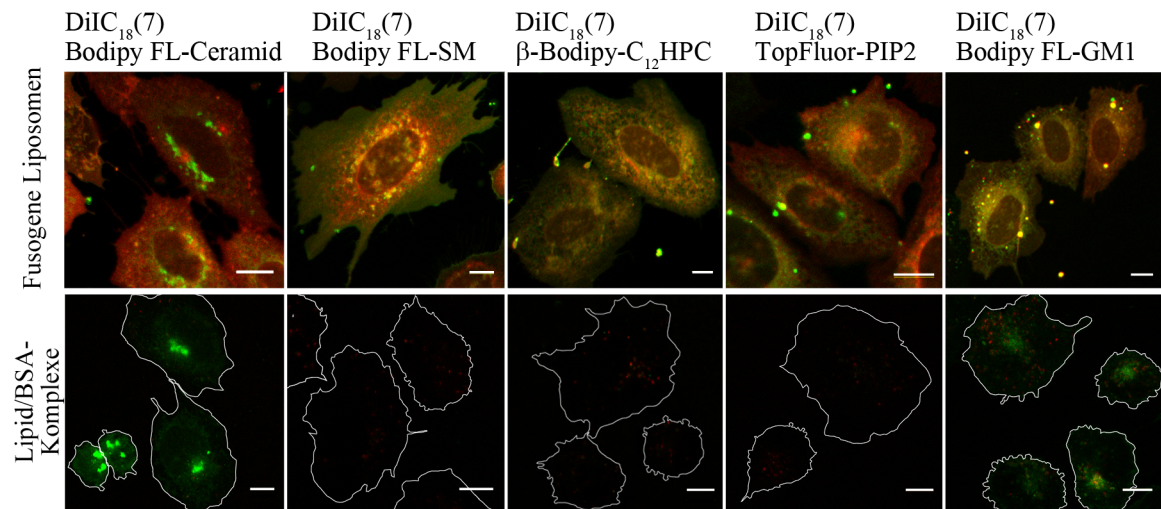


Abbildung 3.5: Vergleich der Lipidinterkalation in CHO-K1 Zellen mittels fusogener Liposomen und Lipid/BSA-Komplexen.

$DiIC_{18}(7)$ wurde in Kombination mit *Bodipy FL-Ceramid*, *Bodipy FL-SM*, β -*Bodipy FL-C₁₂HPC*, *Topfluor-PIP2* und *Bodipy FL-GM1* über FLs (obere Reihe) und Lipid/BSA-Komplexen (untere Reihe) in CHO-K1 Zellen interkaliert. Jedes Bild zeigt die Überlagerung des roten $DiIC_{18}(7)$ -Kanals und des grünen *Bodipy*- beziehungsweise *TopFluor*-Kanals. Jede Aufnahme wurde mit gleichen Mikroskop-Einstellungen gemacht. Jede Probe wurde mit exakt gleichen Mengen der fluoreszenten Moleküle inkubiert, um über die Signalintensität Vergleiche zur Interkalationseffizienz machen zu können. Der Zellkörper der CHO-K1 Zellen wurde in Proben schwacher Intensität nachträglich mit einer weißen Umrandung, basierend auf Phasenkontrastaufnahmen (nicht gezeigt), eingezeichnet. Maßstab 10 μ m. Verändert nach Kleusch et al. 2012 [99].

Wie in Abbildung 3.5 (obere Reihe) zu sehen ist, konnten über die Inkubation mit FLs alle getesteten Lipide zusammen mit $DiIC_{18}(7)$ erfolgreich in die Membran von CHO-K1 Zellen

interkaliert werden. Die Interkalation erfolgte dabei mit FLs folgender Zusammensetzung:

$$DOPE/DOTAP/DiIC_{18}(\gamma)/Lipid_{\text{fluores.}} = 1/1/0.05/0.05 \text{ (w/w)}$$

Die Signalintensität war in allen FL-Proben ausreichend für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Dabei blieb die Zellmorphologie über den gesamten Inkubations- und Beobachtungszeitraum unverändert. *DiIC₁₈(γ)* zeigte bei den mit FL-behandelten Proben ein PM-ständiges, homogenes Signal sowie ein intrazelluläres, ER- und GA-ständiges Signal. *Bodipy FL-Ceramid* konnte ausschließlich im GA und schwach im ER detektiert werden. *Bodipy FL-SM* war zum einen homogen in der PM und zum anderen deutlich im GA lokalisiert. *β -Bodipy FL-C₁₂HPC* war in der PM sowie im ER zu sehen. *Topfluor-PIP2* zeigte ein rein ER- und GA-ständiges Signal und war in der PM nur bis zu 15 min nach Fusion lokalisiert. *Bodipy FL-GM1* konnte in der PM sowie intrazellulär in GA und ER detektiert werden. Mit exakt der gleichen Menge fluoreszenzmarkierter Lipide wurde die Interkalation über Lipid/BSA-Komplexe getestet. Dabei zeigten, wie in Abbildung 3.5 (untere Reihe) zu sehen ist, alle Proben ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal. Das Signal war hauptsächlich in endosomal/lysosomal-artigen Kompartimenten lokalisiert. Einzig das getestete Ceramid sowie Gangliosid konnten intrazellulär lokalisiert werden. Insbesondere *Bodipy FL-Ceramid* zeigte ein deutliches, im GA lokalisierbares Membransignal. Auch das *DiIC₁₈(γ)*-Signal wurde wenn überhaupt nur in kleinen, lysosomalen Strukturen detektiert. Neben der allgemein sehr schwachen Fluoreszenzintensität zeigten alle Proben nach der langen Inkubationsphase eine rundliche Zellform mit teilweise ausgeprägten Membranvorwölbungen, wie durch die weißen Zellumrandungslinien zu erkennen ist. Diese Stress-Antwort wurde wahrscheinlich durch den Kälteschock bei der Inkubation induziert und verschwand nach einigen Stunden.

3.2.6 Interkalation fluoreszierender Cholesterol-Derivate

Neben den im vorherigen Kapitel beschriebenen Phospho- und Glycolipiden wurden zwei unterschiedliche, fluoreszente Cholesterol-Derivate in kardiale Myofibroblasten durch FLs interkaliert. Das fluoreszierende Cholesterol-Derivat *TopFluor-Cholesterol* (Struktur siehe Kapitel 2.2.4) wurde durch FLs folgender Komposition interkaliert:

$$DOPE/DOTAP/DiIC_{18}(\gamma)/TopFluor-Cholesterol = 1/1/0.05/0.025 \text{ (w/w)}$$

Unmittelbar nach Membranfusion konnte ein homogen grünes PM-Signal detektiert werden. Wie in Abbildung 3.6 a) zu sehen ist, war bereits einige Minuten nach Fusion das Signal zwischen PM, ER, GA und vesikulären Strukturen verteilt. Diese vesikulären

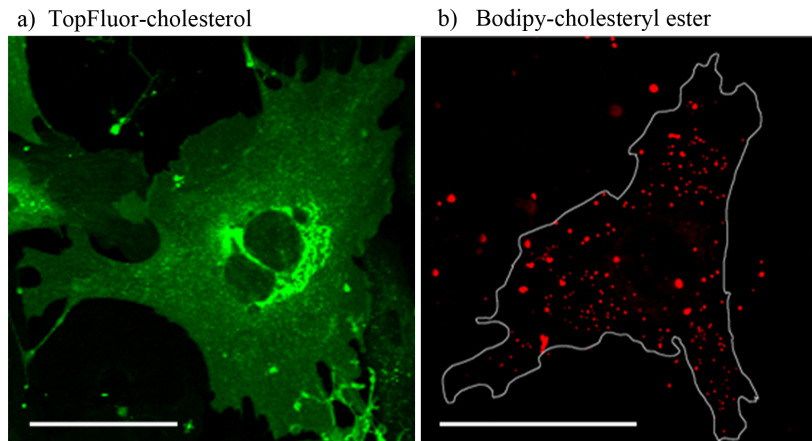


Abbildung 3.6: Interkalation fluoreszenter Cholesterol-Derivate in kardiale Myofibroblasten durch FLs.

a) *TopFluor-Cholesterol* wurde zusammen mit *DiIC₁₈(7)* in die PM interkaliert (der rote Kanal ist aus Gründen der besseren Übersicht nicht gezeigt). b) *Bodipy-cholesteryl ester* wurde ohne *DiIC₁₈(7)* interkaliert, da sich die Spektren der Fluorophore überlagern (siehe auch Kapitel 2.2.4). Der Zellkörper ist mit einer weißen Linie, ausgehend vom Phasenkontrastkanal (nicht gezeigt) nachgezeichnet. Maßstab 50 μm . Verändert nach Kleusch et al. 2012 [99].

Strukturen unterschieden sich deutlich von Strukturen, welche durch *LysoTracker Green Dnd-26* als Lysosomen identifiziert wurden (vgl. Abbildung 3.1 c). Sie waren kleiner und einheitlicher im Zellinneren verteilt.

Das veresterte Cholesterol-Derivat *Bodipy-cholesteryl ester* wurde über FLs folgender Zusammensetzung interkaliert:

$$\text{DOPE/DOTAP/Bodipy cholesteryl ester} = 1/1/0.1 \text{ (w/w)}$$

In diesem Fall wurde die Fusion durch das Derivat selbst ausgelöst. Auf die Zugabe von *DiIC₁₈(7)* wurde in diesem Fall verzichtet, da durch Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen diesem langwelliger emittierenden *Bodipy* und *DiIC₁₈(7)* das Signal des Cholesterylesters komplett ausgelöscht würde. Unmittelbar nach Fusion und Färbung der PM verschwand das Signal des *Bodipy cholesteryl esters* aus der Membran und erschien in lysosomalen, intrazellulären Strukturen (siehe Abbildung 3.6 b).

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde eine neuartige Interkalationsmethode für fluoreszenzmarkierte Lipide in Plasmamembranen lebender Zellen vorgestellt. Fluoreszenzmarkierte Glycerophospholipide (Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol-Biphosphat) Sphingolipide (Ceramid, Sphingomyelin), Glycosphingolipide (Gangliosid GM1), Sterole (Cholesterol, Cholesteryl-Ester) sowie synthetische, amphipatische Moleküle (*DiIC*₁₈(7)) wurden über kombinierte, fusogene Liposomen in zelluläre PMs interkaliert und mit konfokaler Mikroskopie analysiert. Es handelte sich um eine hoch-effiziente und gleichzeitig schonende Methode zur kontrollierten Membranfärbung. Die interkalierten Komponenten konnten beinahe sofort mikroskopisch analysiert werden bis zu einem Zeitraum von 2 Tagen.

Durch Organellen-spezifische Färbemethoden wurde in einem ersten Schritt die Morphologie einiger Zellkompartimente überprüft, um durch den Vergleich Rückschlüsse auf die intrazelluläre Verteilung der interkalierten Lipide ziehen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass kombinierte, fusogene Liposomen aus *DiIC*₁₈(7) und *Bodipy FL-SM* 30 min nach Fusion homogen in der PM lokalisiert sind sowie das Fluoreszenzsignal von *Bodipy* auch im GA detektiert werden kann. Die zeitliche Analyse derart behandelter Zellen über 48 h zeigte, dass *DiIC*₁₈(7) bereits nach 24 h komplett aus der PM verschwunden und im Endomembransystem angereichert ist. Nach weiteren 24 h sind Spuren des Signals nur noch in den Lysosomen detektierbar. *Bodipy FL-SM* ist während der gesamten Beobachtungsdauer als PM- und GA-ständiges Signal detektierbar.

Die Effizienz der Lipidinterkalation durch FLs wurde mit der etablierten Lipid/BSA-Komplexmethode verglichen. Hier wurden exakt gleiche Mengen von fluoreszenzmarkierten Ceramid, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol-Biphosphat und GM1 über FLs und Lipid/BSA-Komplexe in lebende Zellen interkaliert und die Fluoreszenzintensität sowie die intrazelluläre Anreicherung verglichen. Dabei zeigte sich, dass alle Lipide über FLs effizient interkaliert werden konnten und starke Fluoreszenzsignale in den Zellen detektierbar waren, während über Lipid/BSA-Komplexe nur Ceramid und GM1 in detektierbaren Konzentrationen eingebracht werden konnte. Zwei Sterol-Derivate, fluoreszenzmarkiertes Cholesterol sowie ein Cholesteryl-Ester wurden ebenfalls über FLs erfolgreich interkaliert.

Bei der Analyse potenziell zytotoxischer und Mitose-hemmender Effekte durch die Behandlung von Zellen mit FLs konnten keine Effekte beobachtet werden, welche die Zellvitalität und Proliferation negativ beeinflussen.

4 Fusionsanalyse durch systematischen Austausch der fusionsvermittelnden Lipide

Liposomen, welche aus *DOPE/DOTAP/Lipidfluoreszent* in einem bestimmten Molverhältnis hergestellt werden, sind wie im vorherigen Kapitel beschrieben in der Lage, mit zellulären Plasmamembranen zu fusionieren. Dabei ist der Mechanismus für die Fusionsfähigkeit dieser Lipidmischung unbekannt. Die Fusionskompetenz des Systems wird in diesem Kapitel durch systematische Variation der molekularen Zusammensetzung überprüft. Es sollen Rückschlüsse auf den der Fusion zu Grunde liegenden Mechanismus gezogen werden, indem die Fusionsfähigkeit bestimmter Lipidmischungen im Hinblick auf strukturelle Unterschiede der fusionsvermittelnden Komponenten diskutiert wird.

4.1 Einleitung

Eukaryotische Zellen nehmen ständig in Flüssigkeit gelöste Moleküle aus ihrer Umgebung auf. Die zellulären Aufnahmeprozesse, welche zu der stetigen Aufnahme von Flüssigkeit, größeren sowie kleineren Moleküle führen, werden als Endozytose bezeichnet. Endozytose findet somit an der Zelloberfläche statt und beinhaltet die Internalisierung von Plasmamembranbereichen zusammen mit den dazugehörigen Proteinen und Lipiden.

Bei der Endozytose werden zwei Arten unterschieden: Die Pinozytose umfasst die Aufnahme kleiner Endozytosevesikel ($\varnothing < 150 \text{ nm}$), während die Phagozytose die Aufnahme großer Partikel in sogenannten Phagosomen ($\varnothing > 250 \text{ nm}$) beschreibt [4]. Über die rezeptorvermittelte Endozytose können spezifische Moleküle aus der extrazellulären Flüssigkeit aufgenommen werden, indem sie an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche binden und in *Clathrin*-beschichteten Vesikeln in die Zelle gelangen [134]. Dabei müssen sich die *Clathrin*-beschichteten Vesikel von der PM abschnüren können, um ins Zellinnere zu gelangen. Hier kommt es in einem ersten Schritt zu einer Protein-vermittelten Krümmung der Membran, welche durch *BAR*-Proteine erzeugt wird [43]. Zur Abschnürung bereite Vesikel verbleiben an der PM bis zur Rekrutierung des Proteins *Dynamin*. *Dynamin* ist

eine GTPase, welche durch einen GTP-verbrauchenden Prozess eine Abschnürung des Vesikels von der PM bewirken kann [16]. Die über diesen Mechanismus aufgenommenen Moleküle werden in den abgeschnürten Endosomen sortiert und gelangen oftmals zum Abbau in die Lysosomen.

Endozytotische sowie sekretorische Vesikel müssen neben der beschriebenen Abschnürung aber auch in der Lage sein, mit anderen Membranen verschmelzen zu können. Ein Beispiel dafür ist die Verschmelzung von Lysosomen mit Endosomen, um diese weiter anzusäuern, oder die Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der PM. Zur Fusion müssen sich die Zielmembranen auf einen Abstand von 1,5 nm annähern, um miteinander verschmelzen zu können. Für diese Annäherung muss Wasser, welches sich in und auf dem hydrophilen Teil der Membran befindet, verdrängt werden [4]. Dabei ist dieser Prozess energetisch höchst unvorteilhaft. Aus diesem Grund katalysieren spezielle Proteine, die sogenannten *SNARE*-Proteine, in einem energieverbrauchenden Prozess die Annäherung und Fusion der Membranen [84]. Dabei kommt es nach der Annäherung erst zur Hemifusion der äußeren Lipidschichten beider Zielmembranen, wobei der sogenannte Fusions-Schaft (engl. *fusion stalk*) entsteht. *SNARE*-Proteine erzeugen (wahrscheinlich neben einer Vielzahl weiterer Proteine) die mechanische Kraft, um die Energiebarriere, bedingt durch die Verdrängung des Wasser, überwinden zu können. Im nächsten Schritt nähern sich die inneren Membranen an und fusionieren miteinander, wodurch die Fusionspore entsteht und erstmals das innere Milieu beider membranumhüllter Vesikel beziehungsweise Kompartimente miteinander in Kontakt tritt [84]. Somit sind die Lipiddoppelschichten beider Membranen durch die Funktion des proteinbasierten Fusionsapparats miteinander fusioniert.

Der genaue räumliche und zeitliche Ablauf, welcher zur Bildung der oben beschriebenen Fusionspore (der Zustand, bei dem beide Membranen fusioniert haben) führt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass kurz vor Ausbildung der Fusionspore Membran-Übergangszustände entstehen müssen, welche nicht mehr in der klassischen Lipiddoppelschicht-Konfiguration vorliegen. Diese Übergangszustände (engl. *non-bilayer transition states*) werden letztendlich durch Kräfte geleitet, welche zur Minimierung des Kontakts unpolare Bereiche der Lipidschicht mit Wasser führen [83].

Wie oben aufgeführt, ist die intrazelluläre Fusion oder die Pathogen-Wirt-Fusion von Proteinen, welche die Energiebarriere durch den Verbrauch von ATP oder GTP überwinden, gekennzeichnet. Dabei kann eine Membranfusion auch in Abwesenheit fusionsvermittelnder Proteine ablaufen [150, 149]. Arbeiten von Siegel et al. deuten darauf hin, dass eine biologische Membranfusion ähnlich ablaufen muss wie ein Phasenübergang von einer lamellaren Lipidphase (L_{α}) zu einer invers-hexagonalen (H_{II})- oder invers-kubischen (Q_{II}) Phase [150]. Das System transformiert dabei von einer planaren Lipiddoppelschicht (L_{α}) zu hexagonal angeordneten Röhren (H_{II}) aus Lipideinzelschichten beziehungsweise Li-

lipiddoppelschichten mit kubischer Anordnung (Q_{II}). Die ersten Schritte bei dem L_{α}/H_{II} - und L_{α}/Q_{II} -Übergang sind ebenfalls nur durch die Ausbildung von Intermembranverbindungen möglich, welche auch für von Jahn et al. beschriebenen Übergangszustände bei der biologischen Membranfusion nötig sind [35]. Abbildung 3.6 zeigt schematisch die Geometrien der beschriebenen Phasen.

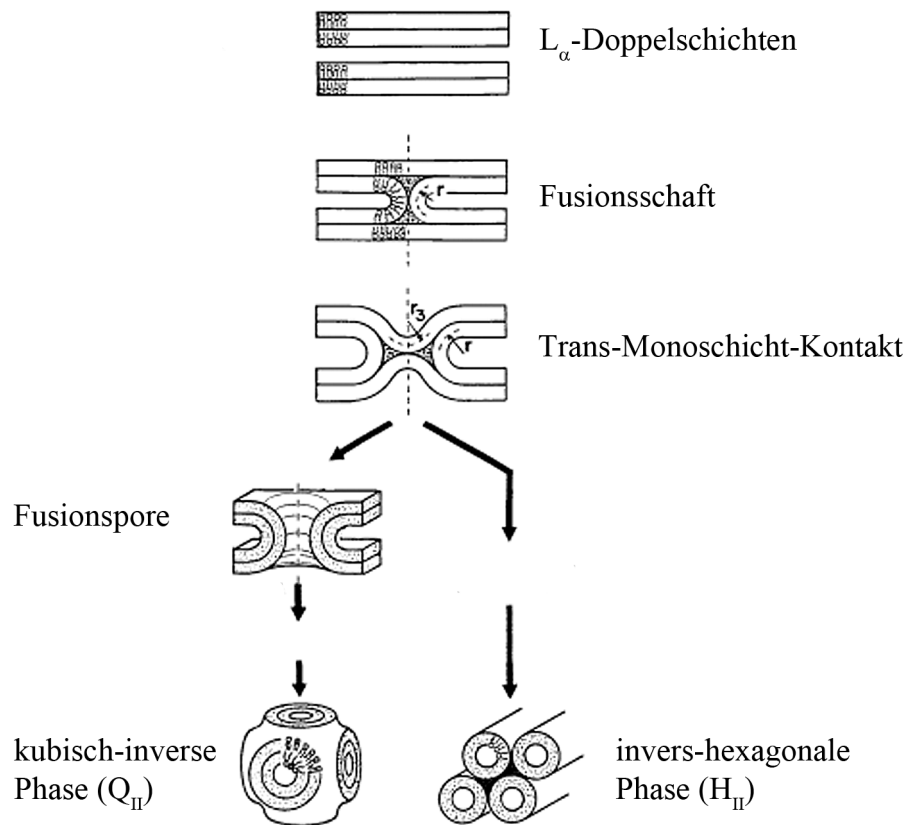


Abbildung 4.1: Übersicht über die möglichen Phasenübergänge, welche eine Membranfusion ermöglichen.
Verändert nach [149]

Der erste Schritt zur Membranfusion sowie zum L_{α}/H_{II} - und L_{α}/Q_{II} -Übergang ist geprägt durch die Ausbildung kleiner Verbindungen zwischen zwei sehr nahen Lipiddoppelschichten. Diese kleinen Intermembranverbindungen werden als Trans-Monoschicht-Kontakte (engl. *trans monolayer contacts*; TMCs) bezeichnet und aggregieren innerhalb der gegenüberliegenden Doppelschichten. Der Fusionschaft sowie die TMCs bilden den energetisch günstigsten Strukturzustand beim Fusions- beziehungsweise L_{α}/H_{II} - und L_{α}/Q_{II} -Übergang [150]. Die TMCs stellen demnach einen kritischen Zwischenzustand zur Membranfusion dar, da diese entweder in eine Fusionspore übergehen oder zur planaren

L_{α} -Phase zurückkehren können.

Die beschriebenen Phasenübergänge konnten für *DOPE*- und *DOPE/DOPC*-haltige Lipiddoppelschichten beobachtet werden [150, 149]. Da die PM aus unterschiedlichsten Lipid-Arten besteht, könnte eine mögliche Aufgabe von Fusionsproteinen neben der mechanischen Arbeit eine Sortierung gewisser Lipide sein, welche eine Ausbildung von TMCs ermöglichen. Arbeiten von Baumgart et al. an unilamellaren Riesenvesikeln konnten zeigen, dass Membranbereiche, welche stark gekrümmt werden, in der flüssig-ungeordneten Phase vorliegen und fluoreszenzmarkiertes DHPE dort angereichert wird [69]. Dies spricht für eine zusätzliche krümmungsbedingte Organisation von Lipiden in biologischen Membranen. Wird eine Membran durch die Aktivität bestimmter Proteine (beispielsweise den *BAR*-Proteinen) gekrümmt, kann es zu einer Anreicherung bestimmter Lipide kommen, welche ihrerseits die Ausbildung der oben beschriebenen *TMCs* und der Fusionspore ermöglichen könnten.

Es wird angenommen, dass für die Ausbildung eines Fusions-Zwischenzustandes die molekulare Form der Lipide wichtig ist. Dies zeigt sich in Untersuchungen zur spontanen Krümmung von Membran-Monoschichten, welche nur aus einer Lipidsorte bestehen [35]. Monoschichten aus dem kegelartig geformten Phosphoethanolamin (PE) krümmen sich in Richtung der Fettsäureketten und besitzen daher eine negative Membrankrümmung. Wird PE zwei aneinanderliegenden Lipid-Doppelschichten zugeführt, kommt es zur Hemifusion der Membranen, was darauf hindeutet, dass Zwischenzustände negativer Krümmung entstehen [35].

Im folgenden Ergebnisteil wird die Fusionskompetenz des Systems durch systematische Variation der molekularen Zusammensetzung überprüft. Die Analyse erfolgt zum einen qualitativ durch konfokale Mikroskopie und quantitativ durch eine neuartige, durchflusszytometrische Analyse, welche in der Lage ist, aufgrund spezieller Fluorophoreigenschaften verschiedene Aufnahmewege (Endozytose & Fusion) unterscheiden zu können. Die zur Fusion notwendigen Lipide werden mit strukturell ähnlichen Lipiden, welche keine Fusion auslösen, verglichen und der Fusionsmechanismus vor dem Hintergrund der beobachteten Unterschiede diskutiert.

4.2 Ergebnisse

Liposomen wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben hergestellt und mit adhärennten CHO-K1 Zellen inkubiert. Aus Gründen der notwendigen Vergleichbarkeit zur Fusionseffizienz wurde das etablierte Fusionsprotokoll (Details siehe Kapitel 2.3.2) bei den folgenden Liposom-Varianten genauestens eingehalten. Zum besseren Verständnis der strukturellen Unterschiede sind die Strukturformeln aller verwendeter Lipide in Kapitel 2.2.1 (neutrale Lipide), 2.2.2 (positiv geladene Lipide), 2.2.3 (kettenmarkierte Lipide) und 2.2.4 (kopf-

markierte Lipide und fluoreszente Moleküle) aufgeführt.

Die verwendeten, neutralen Lipide mit PE-Kopf waren *DOPE* und *DMPE*, und mit Phosphatidylcholin (PC)-Kopf *DAPC*, *DMPC* und *DPPC*. Positiv geladene Lipide waren *DOEPC*, *DOTAP* und *DOTMA*. Als fluoreszenzmarkierte Lipide wurde das an der Kopfgruppe markierte *Bodipy FL-DHPE* sowie das kettenmarkierte β -*Bodipy C₁₂-HPC* verwendet und das synthetische, amphipatische *DiIC₁₈(7)*. Aus diesen Lipiden wurden Liposomen aus allen möglichen Kombinationen mit einem neutralen, einem positiv geladenen sowie einem fluoreszenzmarkierten Molekül hergestellt und die Fusionseffizienz mit dem cLSM und dem Durchflusszytometer bestimmt. Insgesamt wurden 69 verschiedene Liposom-Varianten aus den oben aufgeführten Lipiden mitsamt Fluorophoren qualitativ und quantitativ analysiert. Aus Gründen der besseren Übersicht werden daher nur charakteristische Beispiele gezeigt.

4.2.1 Vergleich des Fluoreszenzsignals unterschiedlicher fusogener und nicht-fusogener Liposomen mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie

Um das Fluoreszenzsignal der Zellen nach erfolgter Inkubation mit den unterschiedlichen Liposomen beurteilen zu können und Rückschlüsse auf die Art der Aufnahme der Liposomen schließen zu können, wurden adhärente CHO-K1 Zellen mit verschiedenen Liposom-Typen inkubiert, die Probe mit dem cLSM mikroskopiert und die gleiche Probe anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Der verwendete *Bodipy*-Fluorophor ist in der Lage bei lokal sehr hohen Konzentrationen angeregte Dimere (sogenannte Excimere) zu bilden. Dies führte zu einer Verschiebung der Emission des ursprünglich grünen Signals in den langwelligeren, roten Spektralbereich. Die molekularen Details dieses Phänomens werden in Kapitel 2.5.1.2 näher beschrieben. Über die gleichzeitige Detektion des Signals zwischen 510-540 nm (grün) und 665-715 nm (rot) mit dem cLSM sowie dem Durchflusszytometer konnte die Verteilung und Anreicherung des fluoreszenzmarkierten Lipids untersucht und über den Vergleich zwischen mikroskopischer Aufnahme und durchflusszytometrischer Analyse Rückschlüsse auf die Art der zellulären Aufnahme gemacht werden.

Abbildung 4.2 zeigt repräsentative Ergebnisse dieser Analyse für die drei charakteristischen Aufnahmearten. Die aus *DAPC/DOTAP/Bodipy FL-DHPE* hergestellten Liposomen wurden, wie in den cLSM-Aufnahmen zu sehen, von den Zellen nicht aufgenommen. Im Durchflusszytometer waren in beiden Kanälen (BFL-Monomer & BFL-Excimer) bis auf die Autofluoreszenz der Zellen kein Signal detektierbar. Die Liposomen, hergestellt aus *DPPC/DOEPC/Bodipy FL-DHPE* wurden endozytotisch aufgenommen. In den LSM-Aufnahmen waren im Monomer- sowie Excimer-Kanal bedingt durch die hohe

lokale Konzentration des Fluorophors in den Endosomen deutliche Fluoreszenzsignale detektierbar. Gleiches galt für die Analyse im Durchflusszytometer, hier war insbesondere ein hohes Signal im Excimer-Kanal zu sehen, dafür war das Signal des Monomer-Kanals etwas schwächer. Die aus *DOPE/DOTMA/Bodipy FL-DHPE* hergestellten Liposomen fusionierten mit der PM der adhären Zellen. Durch die Verteilung des fluoreszenzmarkierten Lipids in der Zellmembran wurde keine lokal sehr hohe Konzentration erreicht, welche für eine intensive Excimeren-Bildung nötig gewesen wäre. Folglich war im Excimer-Kanal des cLSMs keine und im Durchflusszytometers schwache Signale detektierbar.

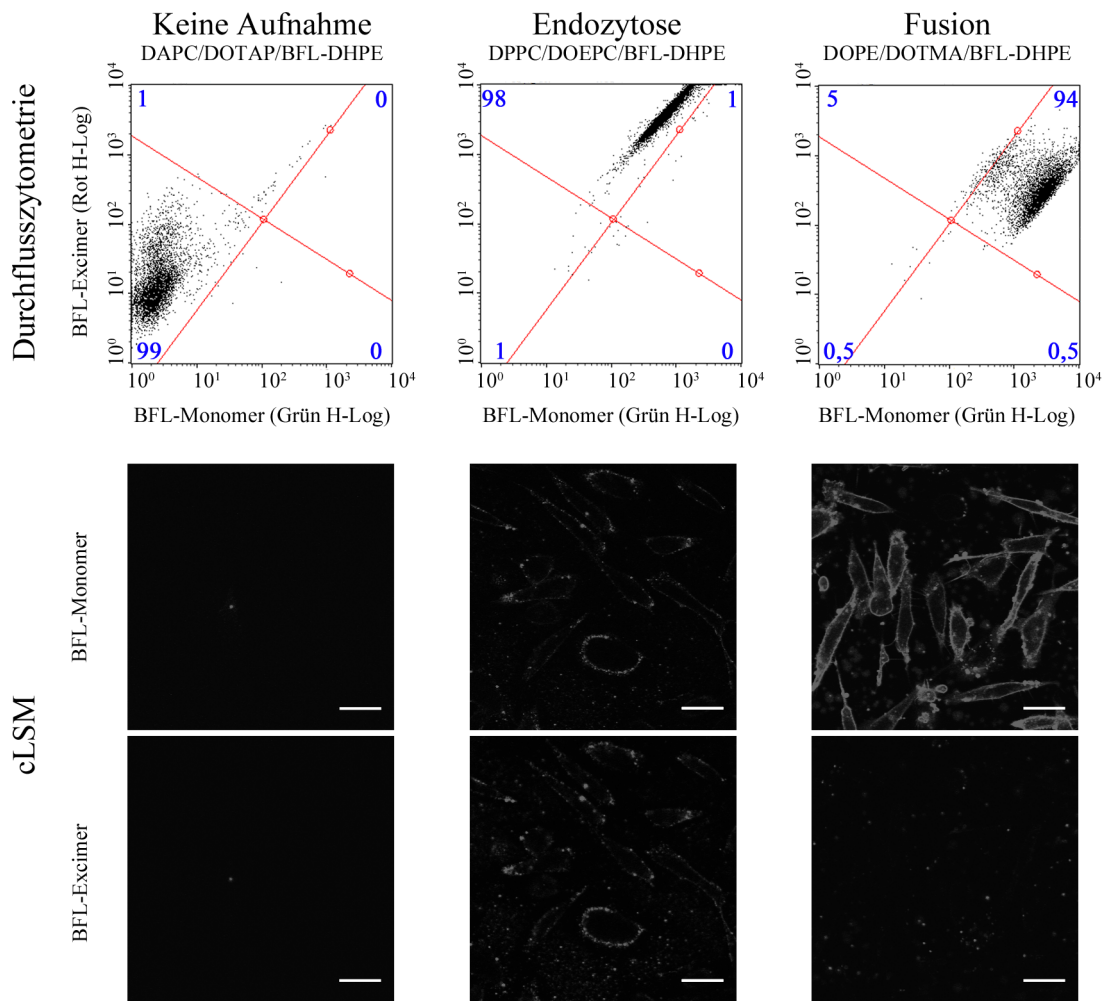


Abbildung 4.2: Überblick über die Signalverteilung im Durchflusszytometer (obere Reihe; logarithmische Auftragung) sowie im cLSM (mittlere und untere Reihe) unterschiedlicher potentiell fusogener Liposomen nach Inkubation mit adhärennten CHO-K1 Zellen. Die linke Spalte zeigt die Analyse eines Liposomen-Typs, welcher von Zellen nicht aufgenommen wurde. Im Durchflusszytometer ist im Bodipy FL-Monomer- sowie Excimer-Kanal bis auf die Autofluoreszenz der Zellen kein Signal detektierbar. Die mittlere Spalte zeigt einen Liposomen-Typ, welcher endozytotisch aufgenommen wurde. Die hohe, lokale Konzentration des Fluorophors bei dieser Art der Aufnahme führte zu einem ausgeprägten Excimer-Signal im Durchflusszytometer und cLSM. Die rechte Spalte zeigt das Signal von Liposomen, welche mit der PM fusionierten. Es war ein sehr hohes Monomer-Signal des Fluorophors im Durchflusszytometer sowie cLSM zu sehen, dafür war das Excimer-Signal vergleichsweise niedrig. Die blauen Zahlen geben die Anteile der detektierten Zellen in den einzelnen Sektoren in Prozent an. Alle Aufnahmen wurden mit gleichen Geräteeinstellungen gemacht. Maßstab 25 μm .

Die deutlichen Intensitätsmuster dieser Analyse konnten für die nachfolgend beschriebenen Liposom-Arten für die Charakterisierung der Fusionseffizienz beziehungsweise zur Unterscheidung des Aufnahmemechanismus verwendet werden.

4.2.2 Zelluläre Aufnahme von Liposomen aus neutralen und fluoreszenzmarkierten Lipiden

Um die mögliche Aufnahme beziehungsweise Fusionseffizienz neutral geladener Liposomen zu testen, wurde bei Präparation der Liposomen kein positiv geladenes Lipid hinzugefügt. Liposom-Varianten wurden aus *DOPE*, *DMPE*, *DAPC*, *DMPC* oder *DPPC* sowie *Bodipy FL-DHPE*, β -*Bodipy C₁₂-HPC* oder *DiIC₁₈(7)* hergestellt. Adhärente CHO-K1 Zellen wurden mit diesen Liposomen inkubiert, wobei nur die folgenden, repräsentativen Beispiele gezeigt werden:

$$\text{DOPE/Bodipy FL-DHPE} = 2/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

$$\text{DMPC/Bodipy FL-DHPE} = 2/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

$$\text{DMPE/Bodipy FL-DHPE} = 2/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

Die Proben wurden 10 min nach Inkubation mit dem cLSM mikroskopiert und anschließend mit dem Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 4.3 zeigt die Fluoreszenzintensität im *Bodipy FL*-Monomer sowie Excimer-Kanal des Durchflusszytometers und dem cLSM mit gleichen Geräteeinstellungen wie im vorherigen Abschnitt. Bei allen drei getesteten Liposom-Typen, welche nur aus einem neutralen Lipid sowie 5 mol% fluoreszenzmarkierten *Bodipy FL-DHPE* bestanden, konnte keine zelluläre Aufnahme, weder endozytisch noch durch Membranfusion, beobachtet werden. Auch die anderen getesteten, aber nicht gezeigten Varianten konnten keine Membranfusion auslösen.

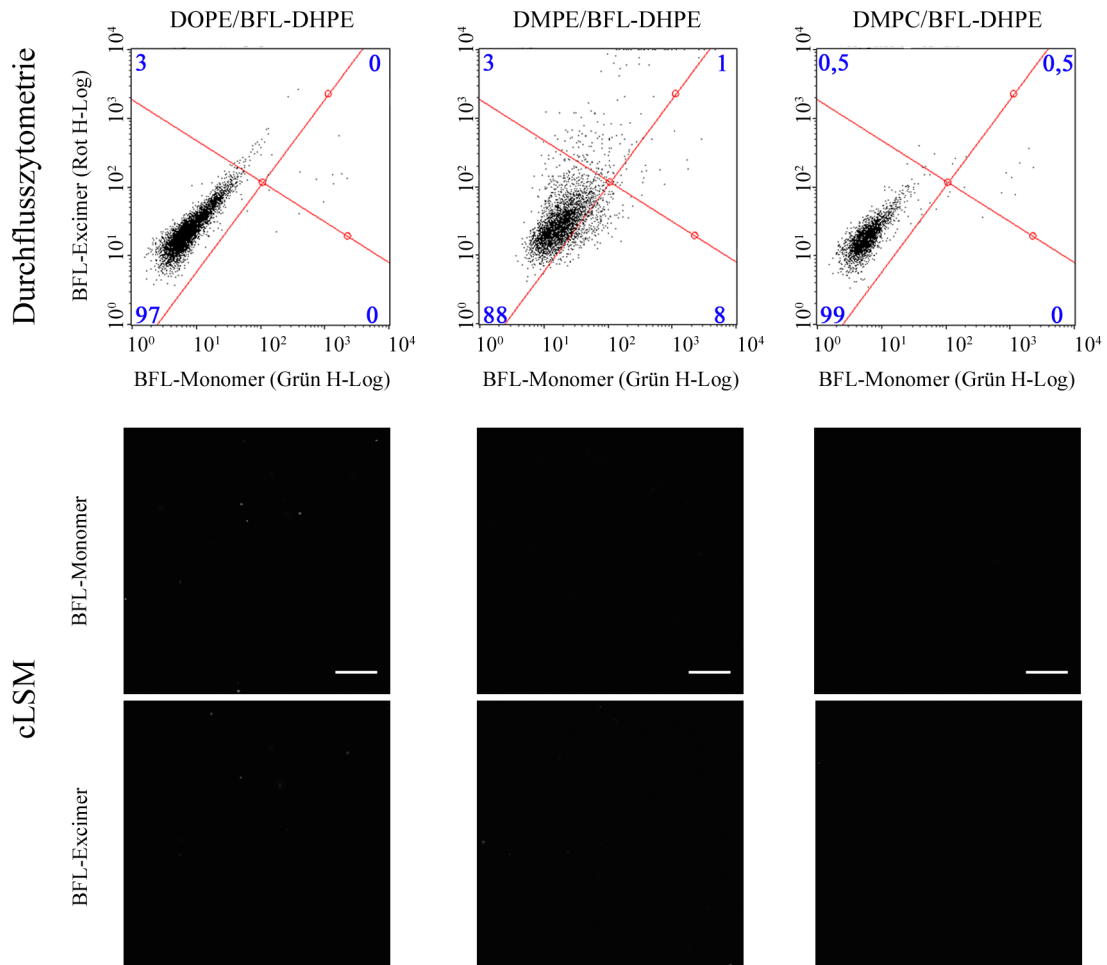


Abbildung 4.3: Überblick über die Signalverteilung im Durchflusszytometer (obere Reihe; logarithmische Auftragung *Bodipy*-Monomer- gegen Excimersignal) sowie im cLSM (mittlere und untere Reihe, ebenfalls Monomer und Excimer) neutral geladener Liposomen aus zwei Komponenten nach Inkubation mit adhärennten CHO-K1 Zellen. Unabhängig vom verwendeten, neutralen Lipid konnte weder bei *DOPE*-, *DMPE*- oder *DMPC*-haltigen Liposomen eine zelluläre Aufnahme im Durchflusszytometer sowie mit dem cLSM beobachtet werden. Die blauen Zahlen geben die Anteile der detektierten Zellen in den einzelnen Sektoren in Prozent an. Alle Aufnahmen wurden mit gleichen Geräteeinstellungen gemacht. Maßstab 25 μm

4.2.3 Zelluläre Aufnahme von Liposomen aus einem neutralen, positiv geladenen und fluoreszenzmarkierten Lipid

Um die Voraussetzungen für eine Fusion mit der PM bei bestimmten Liposomen, welche aus neutralen, positiv geladenen sowie fluoreszenzmarkierten Lipiden bestehen, genauer

definieren zu können, wurden unterschiedliche, positiv geladene Liposomen-Typen hergestellt. Zum einen wurde die Kopfgruppe des Helferlipids variiert, indem Phosphoethanolamin (PE)-Lipide gegen Phosphatidylcholin (PC)-Lipide ausgetauscht wurden. Weiterhin wurde die Sättigung der Fettsäurekette verändert, indem einfach oder mehrfach ungesättigtes Lipide mit gesättigten Lipiden verglichen wurden. Der Einfluß des positiv geladenen Lipids wurde untersucht durch den Austausch von einem positiv geladenen Phospholipid (*DOEPC*) gegen ein synthetisches Ester- (*DOTAP*) oder Eter- (*DOTMA*) Lipid. Letztendlich wurde der Einfluss der fluoreszenzmarkierten Lipide getestet. Hier wurde das kopfmarkierte *Bodipy FL-DHPE* durch das kettenmarkierte β -*Bodipy C₁₂-HPC* sowie das synthetische, amphipatische *DiIC₁₈(7)* ersetzt.

4.2.3.1 Variation in der Kopfgruppe des neutralen Helferlipids

Um den Einfluss der Kopfgruppe des neutralen Helferlipids auf die Fusionsfähigkeit bestimmter Liposomen untersuchen zu können, wurden Liposomen aus neutralen Lipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen hergestellt. Die getesteten neutralen Helferlipide waren *DOPE*, *DMPE*, *DAPC*, *DMPC* oder *DPPC*. Diese wurden jeweils mit den drei unterschiedlichen, positiv geladenen Lipiden *DOEPC*, *DOTAP* oder *DOTMA* kombiniert sowie jeweils mit *Bodipy FL-DHPE*, β -*Bodipy C₁₂-HPC* oder *DiIC₁₈(7)* getestet. Im folgenden werden nur die charakteristischen Liposomen folgender Zusammensetzung besprochen:

$$DMPC/DOTAP/Bodipy\ FL-DHPE = 1/1/0,1\ (\text{mol/mol})$$

$$DMPE/DOTMA/Bodipy\ FL-DHPE = 1/1/0,1\ (\text{mol/mol})$$

Derartige Liposomen wurden mit adhärenen CHO-K1 Zellen inkubiert, mit dem cLSM mikroskopiert und die selben Proben durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 4.4 zeigt die Fluoreszenzintensität, aufgenommen mit dem Durchflusszytometer sowie in Mikroskopaufnahmen. *DMPC*-haltige Liposomen wurden von den adhärenen Zellen endozytisch aufgenommen. Im Durchflusszytometer sowie dem cLSM war ein deutliches Signal im Excimer-Kanal erkennbar. Dagegen war das Monomersignal schwächer und keine homogen gefärbte Membran erkennbar. Liposomen mit *DMPE* als neutrales Lipid konnten hingegen mit der PM fusionieren. Das Monomersignal war ausgeprägter (Durchflusszytometer sowie cLSM) und homogen gefärbte Membranen waren in Mikroskopaufnahmen erkennbar.

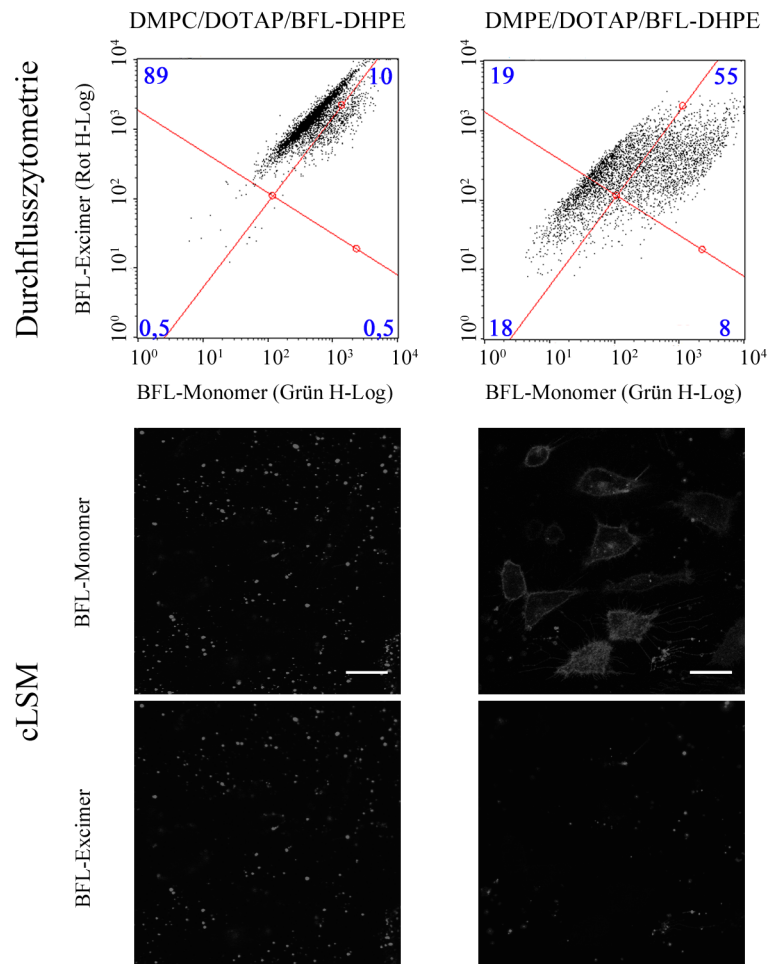


Abbildung 4.4: Überblick über die Signalverteilung im Durchflusszytometer (obere Reihe; logarithmische Auftragung *Bodipy*-Monomer- gegen Excimer-signal) sowie im cLSM (mittlere und untere Reihe, ebenfalls Monomer und Excimer) positiv geladener Liposomen nach Inkubation mit adhären- ten CHO-K1 Zellen. *DMPC*-haltige Liposomen (linke Spalte) wurden, wie in den cLSM-Kanälen zu sehen, endozytotisch aufgenommen. Im Durchflusszytometer sowie auf Mikroskopaufnahmen war ein hohes BFL-Excimer-signal detektierbar. *DMPE*-haltige Liposomen fusionierten mit der PM adhären- ter Zellen, wodurch diese ein homogenes Fluoreszenz-signal im cLSM und ein stärkeres Monomer-Signal im Durchflusszytometer zeigten. Das Excimer-signal war im cLSM-Bild fast nicht vorhanden und im Durchflusszytometer deutlich schwächer. Die blauen Zahlen geben die Anteile der detektierten Zellen in den einzelnen Sektoren in Prozent an. Alle Aufnahmen wurden mit gleichen Geräteeinstellungen gemacht. Maß- stab 25 μm

Weitere Phosphocholine, wie *DPPC* oder *DAPC* wurden ebenfalls getestet, verhinderten

aber wie *DMPC* eine Membranfusion (nicht gezeigt). Diese konnte nur bei *DMPE*- oder *DOPE*-haltigen Liposomen beobachtet werden.

4.2.3.2 Variation in der Kettensättigung des Helferlipids

Der Einfluss der Kettensättigung des neutralen Lipids wurde durch systematischen Austausch des gesättigten *DMPCs* oder *DPPCs* durch ein ungesättigtes *DOPE* und mehrfach ungesättigtes *DAPC* untersucht. Die Liposomen wurden mit adhären Zellen inkubiert, wobei die repräsentativen Ergebnisse mit Liposomen folgender Zusammensetzung gezeigt werden:

$$DAPC/DOTAP/Bodipy\ FL-DHPE = 1/1/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

$$DMPC/DOTAP/Bodipy\ FL-DHPE = 1/1/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

Abbildung 4.5 zeigt den Einfluss der Kettensättigung des neutralen Lipids. Im Fall des gesättigten *DMPCs* und der damit hergestellten Liposomen war nur eine endozytotische Aufnahme zu erkennen. Dies zeigte sich an den relativ hohen Excimersignalen in cLSM-Aufnahmen und im Durchflusszytometer. Eine mehrfach ungesättigte Fettsäurekette im Fall der *DAPC*-haltigen Liposomen hatte keinen positiven Einfluss auf die Membranfusion. Weder im cLSM noch im Durchflusszytometer konnten die für eine Membranfusion typischen Intensitätsmuster beobachtet werden.

Als gesättigte Lipide wurden des Weiteren Phosphoethanolamin-Lipide (wie *DOPE* oder *DMPE*) und *DPPC* (nicht gezeigt) getestet. Es konnte wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben nur bei *DMPE*- und *DOPE*-haltigen Liposomen eine Membranfusion beobachtet werden.

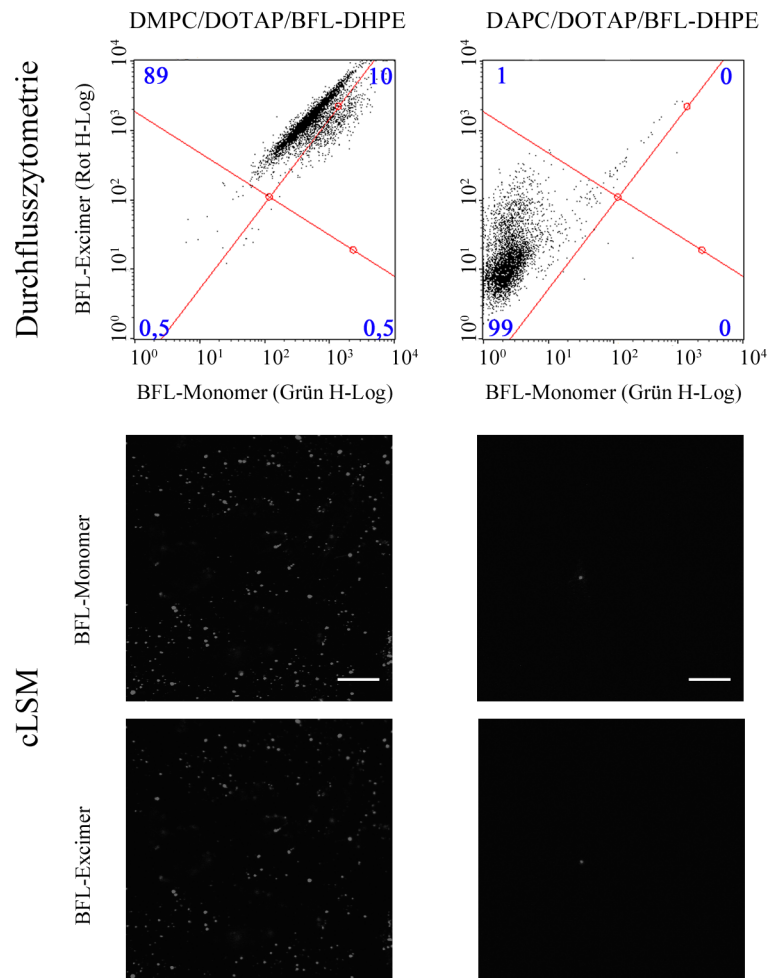


Abbildung 4.5: Überblick über die Signalverteilung im Durchflusszytometer (obere Reihe; logarithmische Auftragung *Bodipy*-Monomer- gegen Excimer-signal) sowie im cLSM (mittlere und untere Reihe, ebenfalls Monomer und Excimer) positiv geladener Liposomen, bei denen das Helferlipid entweder gesättigt (*DMPC*) oder mehrfach ungesättigt (*DAPC*) war. In Mikroskop-Aufnahmen sowie Analysen mit dem Durchflusszytometer der *DMPC*-haltigen Liposomen zeigte sich, dass diese nur endozytotisch aufgenommen wurden. Dies war an dem relativ starken Excimer-Signal bei den cLSM- sowie durchflusszytometrischen Analysen zu erkennen. *DAPC*-haltige Liposomen zeigten hingegen keinerlei zelluläre Aufnahme. Die blauen Zahlen geben die Anteile der detektierten Zellen in den einzelnen Sektoren in Prozent an. Alle Aufnahmen wurden mit gleichen Geräteeinstellungen gemacht. Maßstab 25 μm

4.2.3.3 Variation des positiv geladenen Lipids

Der Einfluss des positiv geladenen Lipids auf die potentielle Fusionsfähigkeit der Liposomen wurde durch Austausch von *DOTAP* gegen *DOEPC* sowie *DOTMA* getestet. *DOPE* wurde als neutrales Helferlipid verwendet sowie die fluoreszenzmarkierten Lipide *Bodipy FL-DHPE*, β -*Bodipy C₁₂-HPC* und *DiIC₁₈(7)*. Es werden die repräsentativen Ergebnisse folgender Liposomen-Zusammensetzung gezeigt:

$$\text{DOPE/DOEPC/Bodipy FL-DHPE} = 1/1/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

$$\text{DOPE/DOTAP/Bodipy FL-DHPE} = 1/1/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

$$\text{DOPE/DOTMA/Bodipy FL-DHPE} = 1/1/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

Abbildung 4.6 zeigt den Einfluss unterschiedlicher, positiv geladener Lipide auf die Fusionseffizienz. Das *DOEPC* besaß die niedrigste Fusionseffizienz. Zwar fusionierten, wie im cLSM-Monomerkanal zu sehen, einige Liposomen mit den Zellen, allerdings war die Färbung sehr schwach und viele unfusionierte Liposomen waren auf der Oberfläche zu sehen. Die *DOTAP*-haltigen Liposomen zeigten eine hohe Fusionseffizienz mit einer homogen gefärbten PM im Monomer-Kanal des cLSMs. Im Durchflusssystem wurde eine zweite, schwächer (auf dem Niveau der *DOEPC*-Probe) markierte Fraktion deutlich. Das verwendete *DOTMA* besaß die beste Fusionseffizienz aller drei getesteten, positiven Lipide. Alle Zellen auf der Oberfläche waren einheitlich homogen und stark markiert. Dies zeigte sich auch durch die große Population mit hohem Monomer-Signal und gleichzeitig niedrigem Excimer-Signal bei der durchflusssystemmetrischen Analyse. Gleiche Ergebnisse wurden auch bei Verwendung des kettenmarkierten β -*Bodipy C₁₂-HPC* und des synthetischen, amphipatischen *DiIC₁₈(7)* erzielt.

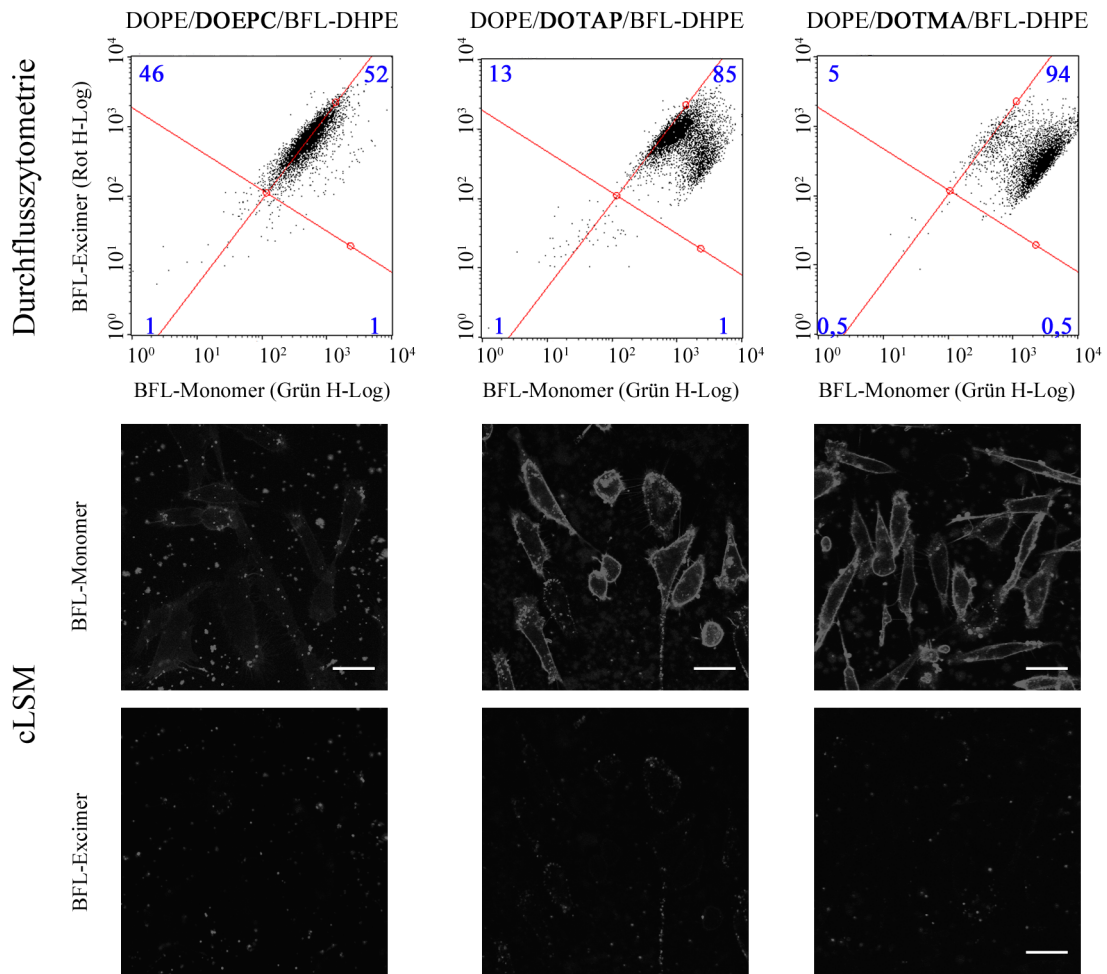


Abbildung 4.6: Überblick über die Signalverteilung im Durchflusszytometer (obere Reihe; logarithmische Auftragung *Bodipy*-Monomer- gegen Excimer) sowie im cLSM (mittlere und untere Reihe, ebenfalls Monomer und Excimer) positiv geladener Liposomen, bei denen die positiv geladenen Lipide variiert wurden. Generell waren alle drei Liposom-Varianten zur Membranfusion fähig, allerdings mit deutlich unterschiedlicher Effizienz. *DOEPC*-haltige Liposomen zeigten das schwächste Fusionspotenzial mit vielen, unfusionierten Liposomen auf der Zelloberfläche und dem schwächsten Monomer-Signal im Durchflusszytometer. *DOPE*-haltige Liposomen fusionierten effizient mit der PM adhärenter Zellen. In der durchflusszytometrischen Analyse ist weiterhin zu sehen, dass einige Zellen nicht sonderlich stark markiert waren. *DOTMA*-haltige Liposomen zeigten die stärkste Fusionseffizienz. Fast alle auf der Oberfläche befindlichen Zellen waren sehr stark markiert. Die blauen Zahlen geben die Anteile der detektierten Zellen in den einzelnen Sektoren in Prozent an. Alle Aufnahmen wurden mit gleichen Geräteeinstellungen gemacht. Maßstab 25 μm

4.2.3.4 Variation des fluoreszenzmarkierten Lipids

Das in den vorherigen Versuchsteilen verwendete, kopfmarkierte *Bodipy FL-DHPE* wurde gegen das kettenmarkierte β -*Bodipy C₁₂-HPC* sowie das synthetische, amphipatische *DiIC₁₈(7)* ausgetauscht, um den Einfluss des Fluorophors beziehungsweise seiner Position untersuchen zu können. Dazu wurden folgende Liposomen hergestellt:

$$DOPE/DOTAP/\beta\text{-Bodipy } C_{12}\text{-HPC} = 1/1/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

$$DOPE/DOTAP/\text{Bodipy } FL\text{-DHPE} = 1/1/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

$$DOPE/DOTAP/DiIC_{18}(7) = 1/1/0,1 \text{ (mol/mol)}$$

Abbildung 4.7 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen und cLSM-Analyse nach Inkubation adhärenter Zellen mit den verschiedenen Liposom-Typen. Alle drei getesteten Varianten waren zur Membranfusion fähig. Das kettenmarkierte sowie das kopfmarkierte Phospholipid zeigten im Durchflusszytometer annähernd gleich hohe Fluoreszenzsignale im Monomer-Kanal. Das kopfmarkierte *Bodipy FL-DHPE* besaß hingegen ein etwas stärkeres Excimersignal. Die mikroskopischen Aufnahmen unterschieden sich allerdings hinsichtlich der Signalintensität. So war die mit dem kettenmarkierten Lipid inkubierte Probe etwas schwächer fluoreszent. In den durchflusszytometrischen Analysen waren bei dem ketten- sowie kopfmarkierten Lipid zwei Zellpopulation zu sehen, welche sich hinsichtlich ihrer Monomer-Intensität unterschieden.

Da *DiIC₁₈(7)* keine Excimere bildet, wurde der langwellige Kanal gegen die Vorwärtstreueung aufgetragen. Es zeigte sich, dass fast alle Zellen mit Liposomen fusioniert werden konnten. Die Signalverteilung war allerdings deutlich breiter als bei den bisher verwendeten Liposom-Arten, welche Membranfusion zeigten.

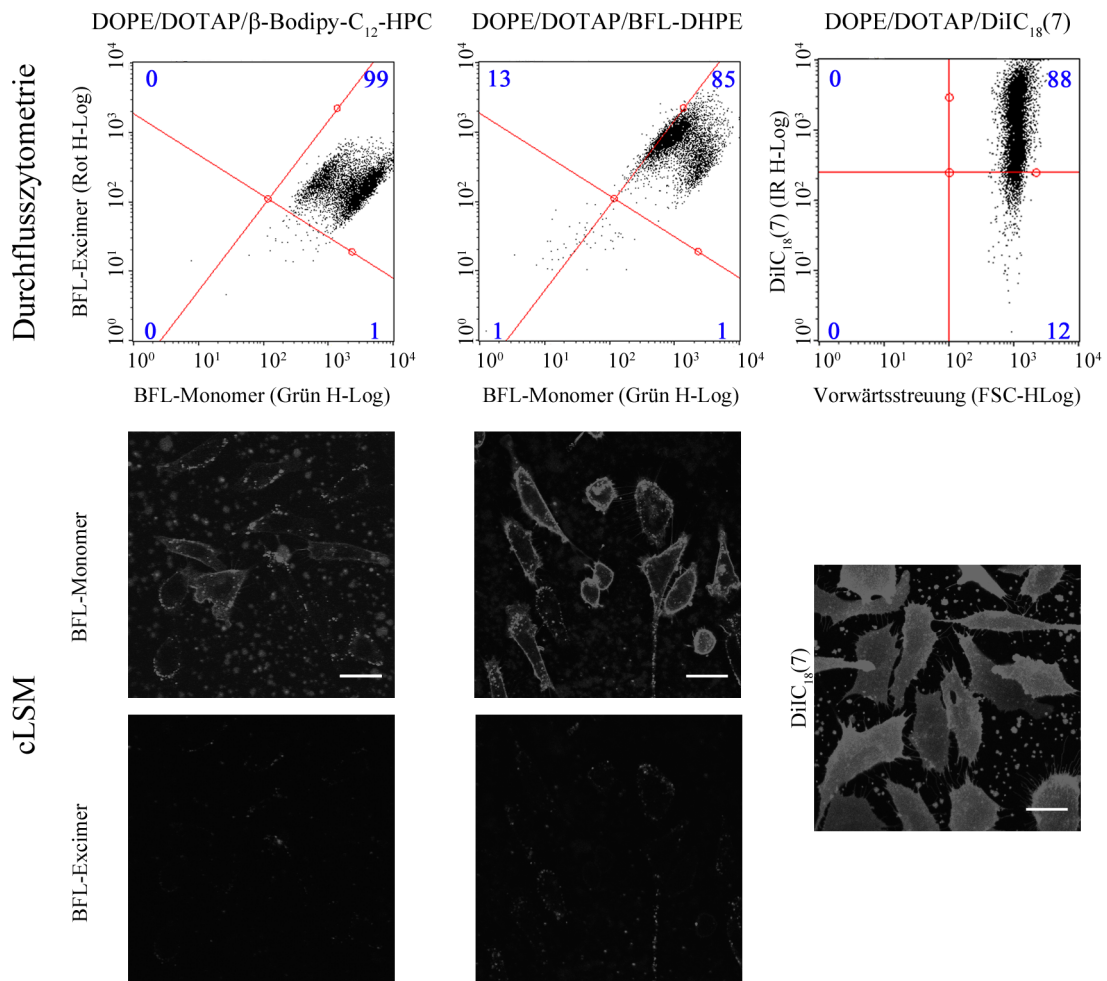


Abbildung 4.7: Überblick über die Signalverteilung im Durchflusszytometer (obere Reihe; logarithmische Auftragung *Bodipy*-Monomer- gegen Excimersignal) sowie im cLSM (mittlere und untere Reihe, ebenfalls Monomer und Excimer) positiv geladener Liposomen, bei denen die fluoreszenzmarkierten Komponenten variiert wurden. Liposomen mit einem kettenmarkierten Lipid (linke Spalte) und mit einem kopfmarkierten Lipid (mittlere Spalte) waren ebenso zur Membranfusion fähig wie Liposomen aus einem synthetischen, amphipatischen Molekül (rechte Spalte). Da $DiC_{18}(7)$ keine Excimere bildet, wurde hier nur der infrarote Kanal analysiert. Die mit *Bodipy FL-DHPE* markierten Zellen zeigten ein etwas höheres Excimersignal als die kettenmarkierte Probe. Im Durchflusszytometer zeigten die beiden Monomer-Kanäle annähernd gleich intensive Fluoreszenz. Die blauen Zahlen geben die Anteile der detektierten Zellen in den einzelnen Sektoren in Prozent an. Alle Aufnahmen wurden mit gleichen Geräteeinstellungen gemacht. Maßstab 25 μ m

4.2.4 Zelluläre Aufnahme von Liposomen aus positiv geladenen und fluoreszenzmarkierten Lipiden

Die Fusionsfähigkeit von Liposomen, welche nur aus einem positiv geladenen Lipid sowie 5 mol% des kopfmarkierten *Bodipy FL-DHPE*, des kettenmarkierten β -*Bodipy C₁₂-HPC* oder des synthetischen, amphipatische *DiIC₁₈(7)* bestanden, wurde mit dem Durchflusszytometer und dem cLSM untersucht. Es werden die repräsentativen Ergebnisse folgender Liposomen gezeigt:

$$DOEPC/Bodipy\ FL-DHPE = 2/0,1\ (\text{mol/mol})$$

$$DOTAP/Bodipy\ FL-DHPE = 2/0,1\ (\text{mol/mol})$$

$$DOTMA/Bodipy\ FL-DHPE = 2/0,1\ (\text{mol/mol})$$

Wie in Abbildung 4.8 zu sehen ist, waren alle drei, nur aus positiven und dem fluoreszenzmarkierten Lipid bestehenden Liposomen in der Lage, mit der PM adhärenter Zellen zu fusionieren. *DOEPC*-haltige Liposomen zeigten auch hier die niedrigste Fusionseffizienz und das schwächste Membransignal, sowohl im cLSM als auch im Monomer-Kanal des Durchflusszytometers. *DOTAP*- und *DOTMA*-haltige Liposomen färbten die PM durch Fusion gleichmäßig und stark fluoreszent an. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte die mit *DOTMA* behandelte Probe eine etwas stärkere Fluoreszenz. Insgesamt wurden die Zellen durch die Behandlung mit diesen Liposom-Varianten aber starkem Stress ausgesetzt. 15 min nach Fusion waren in gleichen Proben deutliche Membranausstülpungen zu sehen (siehe Abbildung 4.9).

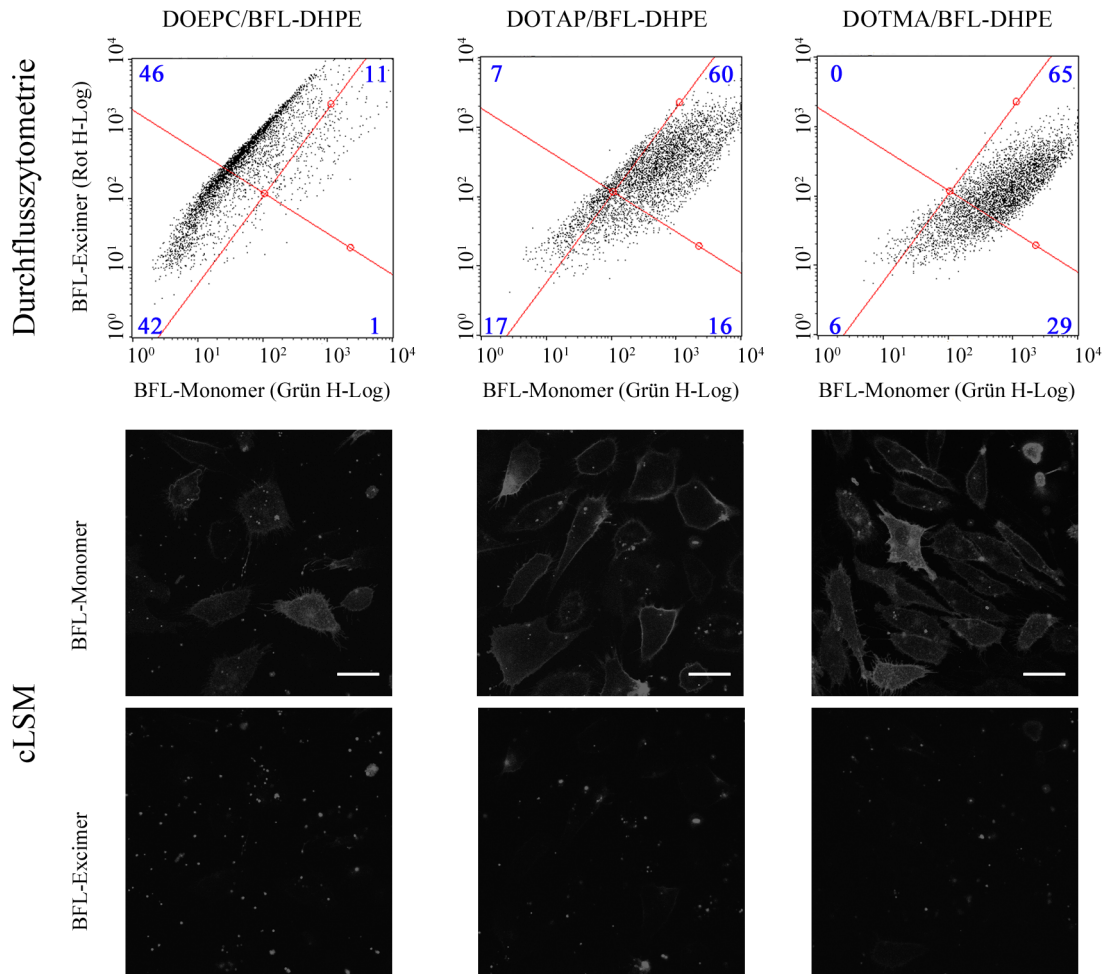


Abbildung 4.8: Überblick über die Signalverteilung im Durchflusszytometer (obere Reihe; logarithmische Auftragung *Bodipy*-Monomer- gegen Excimer-signal) sowie im cLSM (mittlere und untere Reihe, ebenfalls Monomer und Excimer) positiv geladener Liposomen aus zwei Komponenten nach Inkubation mit adhärennten CHO-K1 Zellen. Alle drei getesteten Liposom-Varianten waren zur Fusion mit zellulären PMs in der Lage. Dabei zeigte die *DOEPC*-Probe die niedrigste Fusionseffizienz, *DOTAP* und *DOTMA*-haltige Liposomen färbten die zelluläre PM wie in den cLSM-Aufnahmen zu sehen homogen. Es war kaum Excimer-Signal detektierbar. *DOTMA*-haltige Liposomen zeigten insbesondere in der durchflusszytometrischen Analyse das höchste Monomer-Signal der drei getesteten Varianten. Die blauen Zahlen geben die Anteile der detektierten Zellen in den einzelnen Sektoren in Prozent an. Alle Aufnahmen wurden mit gleichen Geräteeinstellungen gemacht. Maßstab 25 μm Die Aufnahmen wurde mit der Hilfe von Tobias Braun (ICS-7) erstellt.

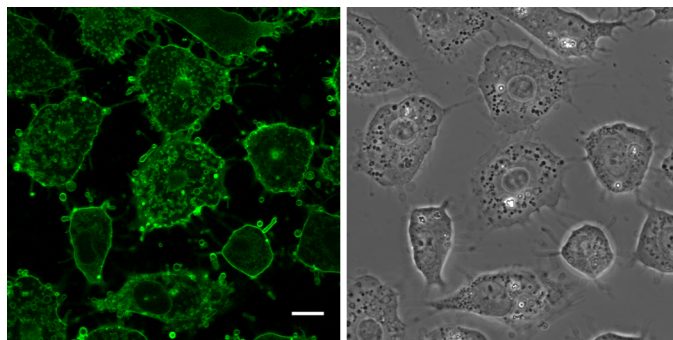


Abbildung 4.9: Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme von CHO-K1 Zellen 15 min nach Interkalation mit Liposomen aus *DOTAP/BFL-DHPE* (2/0,1 mol/mol). Maßstab 10 μm .

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde systematisch untersucht, welchen Einfluss die chemische Natur der beteiligten Moleküle auf die Effizienz des Fusion hat. Zur Quantifizierung der Effizienz wurde Durchflusszytometrie verwendet. Deren Ergebnisse wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die einzelnen Lipid-Komponenten, neutrales Lipid, positiv geladenes Lipid und Aromat-haltiges, amphipatisches Molekül wurden systematisch gegen Lipide mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgetauscht.

In einem ersten Schritt wurden Liposom-Varianten verglichen, welche grundlegend unterschiedliche Aufnahmearten zeigten. Hilfreich war dabei die Verwendung von Lipiden, welche mit dem *Bodipy*-Fluorophor markiert waren. Dieser zeigte eine Verschiebung der Emission hin zu längeren Wellenlängen, wenn derart markierte Lipide räumlich eng beziehungsweise hochkonzentriert vorliegen (Excimeren-Bildung; vergleiche Kapitel 2.5.1.2). Zum einen wurden Liposomen hergestellt, welche von Zellen nicht aufgenommen werden konnten und weder im cLSM noch im Durchflusszytometer detektierbar waren. Andere Liposom-Varianten wurden endozytotisch aufgenommen. Derart aufgenommen Liposomen zeigten starke Excimer-Signale und schwächere Monomersignale des *Bodipy*-Fluorophors. Liposomen, welche mit der PM fusionierten, zeigten hingegen schwache Excimer-Signale, dafür sehr starke Monomer-Signale. Durch die qualitative Analyse des Aufnahmemechanismus mit dem konfokalen Mikroskop konnten Rückschlüsse auf die Signalverteilung im Durchflusszytometer gezogen werden, mit dem die Fusions- beziehungsweise Aufnahmeeffizienz quantitativ bestimmt wurde.

Bei der Analyse von insgesamt 69 verschiedenen Liposom-Varianten zeigte sich, dass Liposomen, welche nur aus dem neutralen Lipid sowie dem fluoreszenzmarkierten Lipid hergestellt wurden, von Zellen nicht aufgenommen wurden. Die positive Ladung war notwendig, um eine zelluläre Aufnahme zu ermöglichen. Die Analyse von positiv-geladenen

Liposomen, bei denen die Kopfgruppe des neutralen Lipids variiert wurde, zeigte, dass nur neutrale Lipide mit Phosphoethanolamin-Kopfgruppe eine Fusion ermöglichen und ein Phosphatidylcholin-Kopf die Fusion verhindert. Variationen in der Kettensättigung des Helferlipids hatte keinen nennenswerten Effekt auf die Fusogenität. Bei Variationen des positiv geladenen Lipids in Kombination mit einem PE-haltigen, neutralen Lipid, konnten deutliche Unterschiede bezüglich der Fusionseffizienz festgestellt werden. Zwar waren alle getesteten, positiv geladenen Lipid-Varianten (in PE-haltigen Liposomen) fusogen, aber mit unterschiedlicher Effizienz. Das positiv geladene *DOEPC* besaß eine Ethylgruppe am Glycerin-Rückgrat und hatte die schwächste Fusionseffizienz. *DOTAP*-haltige Liposomen konnten mit einer 85 %igen Effizienz die PM der untersuchten Zellen stark markieren. Das kleinere *DOTMA* hingegen erreichte eine 94 %ige Fusionseffizienz bei gleicher Fluoreszenzintensität des *Bodipy*-Monomers in der PM. Der Einfluss der Fluorophore wurde ebenfalls analysiert. Dafür wurden Lipide mit markierter Kopfgruppe (*Bodipy FL-DHPE*), mit markierter Fettsäurekette (β -*Bodipy C₁₂-HPC*) und das synthetische, amphipatische *DiIC₁₈(7)* getestet. Die Position und Natur des Fluorophors hatte keinen Einfluss auf die Fusogenität, alle Varianten aus positiv geladenem Lipid und PE-haltigem, neutralen Lipid waren fusogen. Liposomen, welche nur aus positiv geladenen Lipiden mit einem fluoreszenzmarkierten Lipid hergestellt wurden, konnten ebenfalls mit der PM fusionieren. Allerdings bildeten sich dort nach ca. 15 min Membranausstülpungen und die Zellen verloren ihre natürliche Morphologie.

5 Diffusion von Phospholipiden und Mikrodomänen-assoziierten Lipiden in zellulären Membranen und Modellsystemen

Untersuchungen zur Diffusion von Membranlipiden sind ein zentrales Thema der vorliegenden Arbeit. Durch Interkalation über die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen fusogenen Liposomen konnten Phospholipide und Mikrodomänen-assoziierte Lipide effizient und kontrolliert in tierische Plasmamembranen eingebaut werden. Die Dynamik der interkalierten Lipide wurde mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zeitlich hoch aufgelöst analysiert, um die Wechselwirkung in der zellulären Plasmamembran quantifizieren zu können. Dabei standen proteinreiche Membranbereiche an Stellen, wo Zellen den Kontakt zum Untergrund herstellen, den sogenannten Fokaladhäsionen, im Fokus der Analysen. Vergleiche mit Lipiden in Modellsystemen konnten zur Erklärung beobachteter Wechselwirkungen bei Mikrodomänen-assoziierten Lipiden beitragen. Die Etablierung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zur Messung der Diffusion von Lipiden in zellulären Membranen war Teil meiner Diplomarbeit [98]. Es wurden dort bereits Messungen mit einem Phospho- sowie Sphingolipid durchgeführt, welche allerdings durch zu hohe Laserleistungen beeinflusst waren.

5.1 Einleitung

Viele Jahre, nachdem Singer und Nicolson ihre Vorstellung der biologischen Membran, dem bekannten Fluid-Mosaik-Modell, publiziert hatten, wurde die Lipiddoppelschicht nach wie vor als relativ unorganisierte, zweidimensionale Flüssigkeit peripherer und integraler Membranproteine in einer viskosen Phospholipid-Doppelschicht angesehen [154]. Experimente zur Zeit der Veröffentlichung des Fluid-Mosaik-Modells stellten bereits die mögliche Interaktion zwischen Lipiden und Membranproteinen in Aussicht stellten [178]. Während der letzten 20 Jahre hat sich die Sichtweise, in der Lipide eine rein strukturbil-

dende Funktion besitzen und die Membranproteine die zellulären Funktionen ausüben, grundlegend verändert.

Phasenseparation von Phospholipiden in biomimetischen Modellmembranen

Phospholipide bilden in wässriger Umgebung abhängig vom Lipid, der Temperatur (thermotroper Polymorphismus) und dem Wassergehalt (lyotroper Polymorphismus) verschiedenste Phasen aus [7]. Die Phase als solche ist dabei ein räumlicher Bereich, in dem die bestimmenden physikalischen Parameter (am Beispiel von Membranen die chemische Zusammensetzung, die Ordnung der Fettsäureketten [S] und die laterale Diffusionskonstante [D]) homogen sind. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit werden jedoch nur die für biologische Membranen relevanten, lamellaren Phasen berücksichtigt¹. Biomimetische Membranen als vereinfachtes Modell der biologischen Membran wurden und werden vielfach untersucht, um die Phasenseparation des Systems in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung und der Temperatur untersuchen zu können [110, 50, 121, 94]. Lipiddoppelschichten, welche aus zwei verschiedenen Arten von Phospholipiden hergestellt werden, separieren in eine feste (S_O)- und flüssig-ungeordnete (L_D) Phase, wenn die Temperatur des Systems oberhalb der Kettenschmelztemperatur (T_m) der einen Komponente und unter der T_m der anderen Komponente liegt. Lipide mit niedrigen T_m s haben kurze, gesättigte Fettsäureketten oder können aufgrund von Doppelbindungen oder Seitenketten nicht eng genug gepackt werden (zum Beispiel *DOPC*). Lipide mit hohen T_m s haben dagegen lange, gesättigte Fettsäureketten (zum Beispiel *DPPC* oder *SM*) [171]. Werden zwei Lipide mit hohen und niedrigen T_m s gemischt und die Modellmembran bei einer Temperatur, welche zwischen beiden T_m s liegt, analysiert, kann die Koexistenz der S_O - sowie der L_D - Phase in Form großer Domänen beobachtet werden. Neben der flüssig-ungeordneten Phase gibt es eine zweite, ebenfalls lamellare und fluide Phase, die sogenannte flüssig-geordnete (L_O)- Phase. Diese Phase besitzt die hohe Ordnung der Fettsäureketten, was typisch für die S_O -Phase ist, zeigt aber gleichzeitig die hohe laterale Diffusion der Lipide, charakteristisch für die L_D -Phase.

Wird Membranen Cholesterol zugeführt, wird die existierende S_O -Phase durch eine flüssig-geordnete Phase ersetzt, in welcher Lipide mit hohen T_m s und Cholesterol angereichert sind [171]. Die Bildung flüssig-ungeordneter- (L_D) oder flüssig-geordneter (L_O)- Phasen hängt also von der Lipid-Zusammensetzung ab. Sterole, zu denen Cholesterol zählt, bilden selbst keine Lipiddoppelschichten aus. Wird Cholesterol aber mit einem Doppelschichtbildenden Lipid gemischt, kann sich eine L_O -Phase bilden [33]. Sphingomyelin (*SM*) bestehend aus dem Sphingosin-Rückgrat mit ungesättigter Fettsäurekette, besitzt eine zweite,

¹Hexagonale oder kubische Phasen können an transienten, zellulären Ereignissen wie zum Beispiel der Fusion, Verschmelzung oder Porenbildung von Biomembranen beteiligt sein und werden an anderer Stelle besprochen.

lange und gesättigte Fettsäurekette. Natürlich vorkommende SMs haben generell höher gesättigte Fettsäureketten als natürlich vorkommende Phosphatidylcholine (PCs). Daher zeigen aus SM bestehende Membranen einen Übergang von der fest-geordneten (S_o) zur L_d -Phase bei höheren Temperaturen (25-40°C) als PC-Membranen ($< 15^\circ\text{C}$) [12]. Binäre Lipidmischungen aus DMPC und SM bilden daher Ko-existierende S_o - und L_d -Phasen aus, bei denen eine laterale Phasenseparation SM-angereicherter Domänen demonstriert werden konnte [110]. Glycerophospholipide mit ungesättigten Ketten, zu denen PC, Phosphatidylethanolamin (PE) oder Phosphatidylserin (PS) zählt, neigen bei sub-physiologischen/physiologischen Temperaturen demnach eher zur Anreicherung in L_d -Phasen mit niedrigerer Kettenordnung und hoher Diffusionskonstante ($> 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$) [59]. Eine Mischung aus PC und Cholesterol zeigt interessanterweise eine Koexistenz zwischen der L_d - und der L_o -Phase [139]. Komplizierte und dynamische Entmischungsverhältnisse können erreicht werden, wenn PC, PE, PS und Cholesterol, ein Modell für die innere Lipidschicht der Plasmamembran, gemischt werden. Diese Lipidmischung ist an sich homogen in einer Phase vorliegend, entmischt sich aber in zwei Phasen wenn eine Entmischung in der gegenüberliegenden, äußeren Lipidschicht stattfindet [94].

Lipidmischungen aus Cholesterol, SM und PC werden häufig verwendet, um die äußere Schicht der Plasmamembran nachzubilden. SM/POPC/Cholesterol-Mischungen zeigen bei niedrigen Cholesterol-Konzentrationen ($< 16 \text{ mol}\%$) zwei mikroskopisch unterscheidbare Phasen (Gel- & flüssig-ungeordnet) [49]. Bei höheren Cholesterol-Konzentrationen ($> 16 \text{ \& } 25 \text{ mol}\%$) ist die Entmischung nicht mehr eindeutig nachweisbar. Während mikroskopische Aufnahmen von Riesenvesikeln ein homogenes Membranbild zeigen, deuten spektroskopische Untersuchungen auf mehrere Regionen koexistierender Phasen hin [50]. Diese Ergebnisse implizieren, dass bei diesen Cholesterol-Konzentrationen nanoskopische Domänen entstehen, welche unterhalb der optischen Auflösungsgrenze von 300 nm liegen und damit eine Größenordnung von Mikrodomänen in der Plasmamembran erreichen.

Heterogenität von zellulären Membranen

Wurden Membranlipide ursprünglich als zufällig und frei diffundierende Moleküle angesehen, welche der Membran ihre Struktur verleihen ohne spezifischere, zelluläre Funktionen zu übernehmen, ist heutzutage beispielsweise die Fähigkeit zur Organisation in Mikrodomänen (sogenannte *lipid rafts*) eine weitverbreitete und viel diskutierte These [140, 152, 137, 108, 5, 126, 112]. Diese kleinen, hauptsächlich aus Sphingolipiden und Cholesterol bestehenden, geordneten Domänen „schwimmen“ höchstwahrscheinlich in ungeordneten, fluideren und Phospholipid-haltigen Bereichen der Membran und nehmen dort direkt an Signaltransduktionsprozessen teil [152, 105]. Da Mikrodomänen in Tensiden wie zum Beispiel Triton X-100 unlöslich sind, deuteten Experimente zur Löslichkeit

zellulärer Membranen darauf hin, dass die Plasmamembran nicht ausschließlich in der flüssig-kristallinen Phase vorliegt und dass bestimmte Regionen, zumindest teilweise, in einem flüssig-geordnetem Zustand vorliegen [22]. Dieses Phasenverhalten verschiedener Lipide in Biomembranen ist heutzutage weitestgehend anerkannt, obwohl Löslichkeitsexperimente als solche stark kritisiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Membranen mit Detergenzien Artefakte in der Struktur der Membran hervorruft. Dadurch besteht zumindest die Möglichkeit, dass das Detergenz die Domänen hervorruft und nicht bereits bestehende Domänen durch die Behandlung isoliert wurden [68, 161]. Auch die Tatsache, dass Membranproteine annähernd 50 % der Masse der biologischen Membran ausmachen [59], führt zu Schwierigkeiten bei Untersuchungen zur Phasenbildung in solchen Membranen. Allerdings konnten Experimente an isolierten Zellmembranen eine Entmischung der Membranen in Mikrometer-große Domänen zumindest bei Temperaturen unterhalb 25°C zeigen [13], was ein weiterer Hinweis für die mögliche Heterogenität biologischer Membranen war.

Das Auftreten von *Lipid rafts* beziehungsweise Mikrodomänen in der tierischen Plasmamembran wurde 1997 von Simons und Ikonen postuliert [151]. Dieses Konzept beschreibt eine dynamische Anreicherung von Sphingomyelin und Cholesterol in Mikrodomänen, welche einen höheren Ordnungsgrad besitzen und in einer flüssig-ungeordneten Plasmamembran „schwimmen“. Diese Domänen sollen als Plattform zur Anreicherung von Membranproteinen dienen, wenn Membranbereiche und die assoziierten Proteine bei intrazellulären Signaltransduktions- oder Transportprozessen bewegt werden [151]. Innerhalb der Mikrodomänen sind SM und Cholesterol relativ dicht gepackt. Dies kommt laut den Autoren dadurch zustande, dass die SM-Kopfgruppen im Vergleich zu den gesättigten Fettsäureketten viel Platz in der exoplasmatischen Lipidschicht der PM einnehmen. Der Platz zwischen den Ketten wird von Cholesterol aufgefüllt. Dieses Modell wird gestützt durch mehrere biophysikalische Studien, welche Interaktionen von SM und Cholesterol beschreiben. So ist die Packungsdichte von SM-Cholesterol-Mischungen höher als die von Glycerophospholipiden [158]. Die Zugabe von Cholesterol zu binären PC/SM-Mischungen führt zur Phasenentmischung und Ausbildung einer L_o -Phase bei physiologischen Temperaturen [3]. Die Interaktion zwischen Cholesterol und SM ist stärker als zwischen Cholesterol und Glycerophospholipiden [143]. Die Autoren nennen zwei mögliche Gründe für die unterschiedlich starken Interaktionen. Zum einen besitzt die Amid-Gruppe im SM einen höheren dipolaren Charakter als die korrespondierende Ester-Gruppe in Glycerophospholipiden, was zu der stärkeren Interaktion zwischen SM und Cholesterol führt. Eine potenziell mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amid-Stickstoffatom und dem Sauerstoff-Atom der Cholesterol-Hydroxylgruppe, überbrückt durch ein Wassermolekül, würde diese Interaktion zusätzlich verstärken [143].

Neben SM und Cholesterol spielt das Gangliosid GM1 ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Mikrodomänen und der Proteinrekrutierung in die Domänen. Es konnte gezeigt werden, dass in isolierten Plasmamembranen die Verkettung von GM1 durch Cholera-Toxin B in einem Cholesterol-abhängigen Prozess zu Mikrometer-großen, GM1- und Cholesterol-angereicherten Domänen in vorher homogenen PMs führt [111]. Die Verkettung durch das Cholera-Toxin kann laut der Autoren nur zu Mikrometer-großen Domänen führen, wenn in der unbehandelten PM bereits eine Assoziation zwischen GM1 und anderen, Mikrodomänen-assoziierten Membrankomponenten vorliegt. Ohne diese nativen Mikrodomänen würde GM1 nach Toxin-Behandlung maximal pentamere Cluster bilden. Darüberhinaus rekrutieren diese Domänen Transmembran- sowie GPI-verankerte Proteine. .

FCS-Experimente mit nanoskopischer Auflösung von Eggeling et al. unterstützen diese These [46]. Bei der verwendeten STED-Technik (*engl. stimulated emission depletion*; stimulierte Emissionsverminderung) wird ein zweiter, kreisförmig und innen „hohler“ Laser über den Anregungslaser gelegt. Dieser zweite Laserstrahl regt durch seine Wellenlänge von 770 nm die durch den ersten, kurzwelligeren Laser angeregten Fluorophore wieder ab. Dadurch wird der Ursprung der detektierten Photonen auf die Größe des Loches des zweiten Lasers reduziert, was den radialen Durchmesser auf bis zu 50 nm reduziert (verglichen mit den 300 nm eines konventionellen cLSM) [70, 46]. Es konnte gezeigt werden, dass SM, GM1 und GPI-verankerte Proteine in tierischen PMs in kleinen (~ 20 nm), Cholesterol-abhängigen Komplexen transient (10-20 ms) gefangen beziehungsweise angereichert sind, wobei Glycerophospholipide diese Komplexe nicht ausbilden [46, 127]. Das Verhalten und die Phasenabhängige Anreicherung von Lipiden stellt insgesamt einen komplizierten und dynamischen Prozess dar, welcher durch Modellsysteme allein nur schwer nachzubilden ist. Vorstellbar wäre beispielsweise eine Funktion von Membranproteinen, das Phasenverhalten von Lipiden beeinflussen oder gar kontrollieren zu können.

Spezifische Lipid-Protein Interaktionen spielen bereits bei der Proteinbiosynthese im ER und bei nachfolgenden Sortierungsprozessen eine wichtige Rolle. Das ER ist der Synthesort aller Membranproteine, wo sie durch den Translokationskomplex (Translocon oder sec-Komplex) in die ER-Membran integriert werden [85]. Die Membranproteine müssen von da in Organellen mit teilweise unterschiedlichen Membranzusammensetzungen transportiert werden. Zum Beispiel sind Transmembrandomänen von PM-ständigen Proteinen länger, als die ER- oder GA-ständige Proteine [20], wodurch sich die ER-Membran diesen Unterschieden anpassen können muss, um durch hydrophobe Effekte hervorgerufene fehlerhafte Proteinkonformationen zu vermeiden [36]. Der Cholesterol-Gehalt der Membranen auf dem Proteinsyntheseweg vom ER, über GA zur PM steigt stetig an [170]. Dabei werden die Membranen durch den steigenden Cholesterolanteil dicker und steifer, wodurch potenzielle, hydrophobe Effekte zu langer Transmembrandomänen stärker wer-

den. Daher kann allein der steigende Cholesterol-Gehalt als eine Art Regulationsmechanismus zur Proteinsortierung in die richtigen Organellen dienen. Im ER, mit niedrigem Cholesterol-Gehalt, können längere Transmembranbereiche durch die höhere Fluidität der Membran ausgeglichen werden [129]. Im GA nimmt die Cholesterol-Konzentration zur trans-Seite hin zu, was eine Sortierung kurzer GA-Membranproteine und längerer PM-Proteine hervorruft [148].

Über die Dynamik potenzieller Lipid-Protein-Interaktionen ist momentan nur wenig bekannt. Über röntgen-kristallografische Analysemethoden wurden Proteinstrukturen aufgedeckt, in welchen ein gebundenes Lipid identifiziert werden konnte, was für eine sehr starke und langlebige Interaktion spricht [107]. Weitere Arbeiten konnten sehr kurzlebige Wechselwirkungszustände nachweisen, bei denen Lipide sich in einem Zeitrahmen von 10^{-7} s aus der unmittelbaren Umgebung eines Proteins in die fluide Membran austauschen [44]. Diese Arbeiten zeigen, wie groß mögliche Zeitspannen der Lipid-Protein-Interaktionen sein können.

5.1.1 Fokaladhäsionen - Verbindung zwischen Zelle und Untergrund

1975 wurden von Abercrombie et al. Interferenz-Reflexions-Mikroskopie-Aufnahmen von Fibroblasten in Zellkultur durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.5.4). Dabei identifizierten sie adhäsive Membranbereiche, durch die der Kontakt zur extrazellulären Matrix (EZM) hergestellt wurde [2]. Die Adhäsionsstrukturen, welche von den Autoren als sog. “*adhesion plaques*” bezeichnet wurden (später dann Fokaladhäsionen), zeigen sich im Reflexionsbild als intensitätsschwache Bereiche, in denen der Abstand der Plasmamembran vom Substrat auf bis zu 10 nm reduziert ist [153, 81]. Diese dunklen Strukturen erscheinen meist in Form länglicher Ovale und sind typischerweise 2 bis 6 μm lang sowie 0,5 bis 0,9 μm breit. Auf Glasoberflächen kultivierte Myofibroblasten besitzen viele dieser Adhäsionsstrukturen, welche über die gesamte Zellunterseite verteilt sind. Der Kontakt zu Fibronectin, einem extrazellulären Protein, welches die Zellbindung an die EZM unterstützt, wird über eine Klasse von Transmembranproteinen, welche als Integrine bezeichnet werden, hergestellt [78, 79]. 12 der 24 bekannten Integrin-Untereinheiten binden an Fibronectin, andere binden beispielsweise an Kollagen oder Laminin, ebenfalls Proteine der EZM [135]. Die Integrine, zum Zeitpunkt der Identifizierung noch als *cell substrate attachment (CSAT)*-Antigene bezeichnet [24], stellen auf zytoplasmatischer Seite den Kontakt zu Talin her, welches wiederum an Vinculin bindet. Über Talin, Vinculin und eine ganze Reihe anderer Fokaladhäsions-assoziiierter Proteine wird schließlich der Kontakt zu Aktinfilamenten und somit zum Zytoskelett hergestellt [25, 26]. Vereinfacht kann man sagen, dass Fokaladhäsionen (FAs) die zellulären Verankerungspunkte zum Substrat herstellen, durch die die mechanische Kopplung der Zelle an das Substrat erfolgt. Dadurch wird den FAs

insbesondere bei Prozessen wie der Ontogenese, der Zellmigration oder der Wundheilung eine besondere Bedeutung zuteil.

Das Transmembranprotein Integrin besitzt eine hohe Dynamik innerhalb der zellulären FA bzw. der Plasmamembran. In migrierenden Zellen konnte mittels *ICM (Image Correlation Microscopy)* gezeigt werden, dass in nicht-adhärenenten Plasmamembranbereichen submikroskopische Integrin-Aggregate bestehend aus 3 bis 4 Integrinen frei verteilt vorliegen, was zu einer Dichte von 50 bis 390 Integrinen/ μm^2 führt [180]. In jungen FAs ist die Integrindichte bereits 1,3 bis 2-fach höher als in nicht-adhärenenten Bereichen. Die Integrindichte wächst mit der Reifung der FAs auf das 2 bis 6-fach an [180]. Dies verdeutlicht, dass die räumliche Verteilung von Integrinen zum einen eine hohe Dynamik ähnlich wie die von cytoplasmatischen Proteinen aufweist. Andererseits liegen Integrine in jungen und insbesondere in reifen FAs im Vergleich zur Plasmamembran höher konzentriert und damit dichter gepackt vor.

Dagegen ist die adhärenente Plasmamembran in Bereichen zellulärer Fokaladhäsionen weitestgehend unerforscht. Der Cholesterolgehalt der PM wirkt sich direkt auf Adhäsion und Signalweiterleitung von Integrinen aus. Mit steigendem Cholesterolgehalt konnte eine erhöhte Aggregation von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, eine verstärkte Adhäsion an Fibronectin sowie eine stärkere Assoziation mit Talin, einem zytoskeletalen Protein, beobachtet werden [63]. Werden Glykosphingolipide (hauptsächlich SM) aus der PM entfernt, können Fibroblasten nicht mehr an die EZM adhärenieren [92]. Eine Arbeit von Leitinger et al. an T-Lymphozyten zeigte, dass das Integrin LFA-1 nach Aktivierung der Immunzellen in Mikrodomänen lokalisiert ist. Ohne Aktivierung bzw. bei Verwendung einer strukturell veränderten LFA-1-Variante wurde das Transmembranprotein aus Mikrodomänen ausgeschlossen [108]. Es wurde gezeigt, dass viele der molekularen Komponenten, welche an der Regulierung von Adhäsionsstrukturen beteiligt sind, auch mit den detergentenresistenten Membranbereichen (DRMs) assoziiert sind [119]. Bei Analysen zum Lipidgehalt von DRMs im Vergleich zur Triton-löslichen Membranfraktion zeigte sich, dass die Konzentration von Cholesterol in den DRMs um den Faktor 10 erhöht und die Konzentration von Sphingomyelin um 70 % erhöht ist [119]. Beide Moleküle sind wie bereits beschrieben in Mikrodomänen stark angereichert. Inwiefern diese Ergebnisse auch auf die Lipidzusammensetzung nativer FAs übertragen werden kann, muss durch die potenzielle Artefakt-Bildung durch die Behandlung mit dem Lösungsmittel kritisch betrachtet werden. Allerdings ist die Membranordnung (der Ordnungsgrad der Fettsäureketten beziehungsweise Packung der Lipide; vergleiche Einleitung über die L_d - und der L_o -Phasen in Modellmembranen) in zellulären FAs höher als in nicht-adhärenenten Membranbereichen. Durch Verwendung einer Membransonde, welche ihr Emissionsspektrum in Abhängigkeit des Ordnungsgrades der Fettsäureketten ändert, konnte ein höherer Ordnungsgrad in adhärenenten Membranbereichen gemessen werden [55]. All diese Veröffentlichungen

zeigen, dass auf Ebene der Lipidzusammensetzung FAs Unterschiede im Vergleich zu nicht-adhärennten Membranbereichen aufweisen und die Lipide der PM großen Einfluß auf die zelluläre Adhäsion besitzen. Dennoch ist kein direkter, quantitativer Zusammenhang zwischen Mikrodomänen-assoziierten Lipiden und der Wechselwirkung in zellulären FAs bekannt, da sich Untersuchungen zur Interaktion schwierig gestalten. Zum einen müssen, um direkte Interaktionen nachweisen zu können, ausgewählte Lipide markiert werden und effizient in der PM detektierbar sein. Zum anderen müssen sensitive Methoden benutzt werden, mit denen die möglicherweise transienten Interaktionen nachweisbar sind. Diese Fragestellung war ein intensives Ziel der vorliegenden Doktorarbeit.

5.1.2 Der Myofibroblast

Die Experimente in diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich an kardialen Myofibroblasten durchgeführt. Myofibroblasten sind für Struktur und Funktion tierischen Gewebes von entscheidender Bedeutung. Interessanterweise besitzt dieser Zelltyp morphologische Charakteristika zweier eigentlich sehr unterschiedlicher Zelltypen. Zum einen sind Myofibroblasten genau wie konventionelle Fibroblasten über Fokaladhäsionen (FAs) mit der extrazellulären Matrix (EZM) verbunden. Zum anderen sind ihre ausgeprägten Stressfasern, bestehend aus gebündelten Aktin-Filamenten, kontraktile und können Kräfte ausüben, wodurch sie auch die typische Eigenschaft von glatten Muskelzellen besitzen [103]. Somit geben diese Eigenschaften, also die Verankerung an die EZM sowie die Kontraktilität, diesem Zelltyp im besonderen Maße eine entscheidende Rolle bei Wundheilung sowie pathologischer Organ-Umgestaltung [75, 72].

Bei der Wundheilung wandern unterschiedliche Zellen des angrenzenden Gewebes sowie des Immunsystems in den Wundverschluß ein. Myofibroblasten müssen in diesem Stadium in der Lage sein, migrieren zu können. Hier hat sich der Begriff des „Proto-Myofibroblasts“ etabliert, um diesen Zelltyp von normalen Fibroblasten (ohne einen kontraktilen Apparat im gesunden Gewebe) abgrenzen zu können [167]. Dieser initiale Wechsel hin zu einem anderen Phänotyp wird durch Veränderungen in der Zusammensetzung, Organisation sowie der mechanischen Eigenschaften der EZM, bedingt durch die Verletzung, ausgelöst [74], aber auch durch Zytokine, welche lokal von inflammatorischen und ortsansässigen Zellen ausgeschüttet werden [177]. Die Aktivität der Proto-Myofibroblasten in der EZM führt zu einer Ummodellierung der Matrix, was wiederum die phänotypische Entwicklung zu Myofibroblasten mit einer hohen Expression von α -glatte Muskulatur-Aktin (*engl. smooth muscle actin; α -SMA*) auslöst [75]. Die Inkorporation von α -SMA in Stressfasern verstärkt die Kontraktionsaktivität erheblich und kennzeichnet letztendlich die Kontraktionsphase des Bindegewebes, welche zur Schließung einer Wunde führt [73]. Im gesunden Gewebe gehen Myofibroblasten anschließend in die Apoptose über oder α

-SMA wird abgebaut und das Gewebe befindet sich wieder in seinem Ausgangszustand. Bei der Narbenbildung bleibt das Bindegewebe jedoch in der Kontraktionsphase. Dieser Zustand liegt besonders häufig nach Brandverletzungen und Organerkrankungen wie beispielsweise einem Herzinfarkt vor [38, 23].

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Bestimmung primärer, kardialer Myozyten und Myofibroblasten aufgrund morphologischer Unterschiede

Primäre, kardiale Myozyten und Myofibroblasten wurden wie in Kapitel 2.1.2 aus embryonalen Rattenherzen isoliert. Dies lieferte gemäß Banerjee *et al.* ca. 64 % Fibroblasten und 30 % Myozyten [11]. Da die Analyse der Lipiddiffusion ausschließlich in Myofibroblasten mit großen FAs durchgeführt werden sollte, wurde durch eine immunohistochemische Färbung morphologische Unterschiede untersucht, welche eine nachfolgende Identifizierung auch ohne Zelltyp-spezifische Färbung ermöglichten.

Dazu wurden die isolierten, primären Zellen 6 Tage nach Isolation wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben mit einem Antikörper gegen *Calnexin*, einem Transmembranprotein des ER, und *Phalloidin*, einem histochemischen Aktin-Marker, inkubiert.

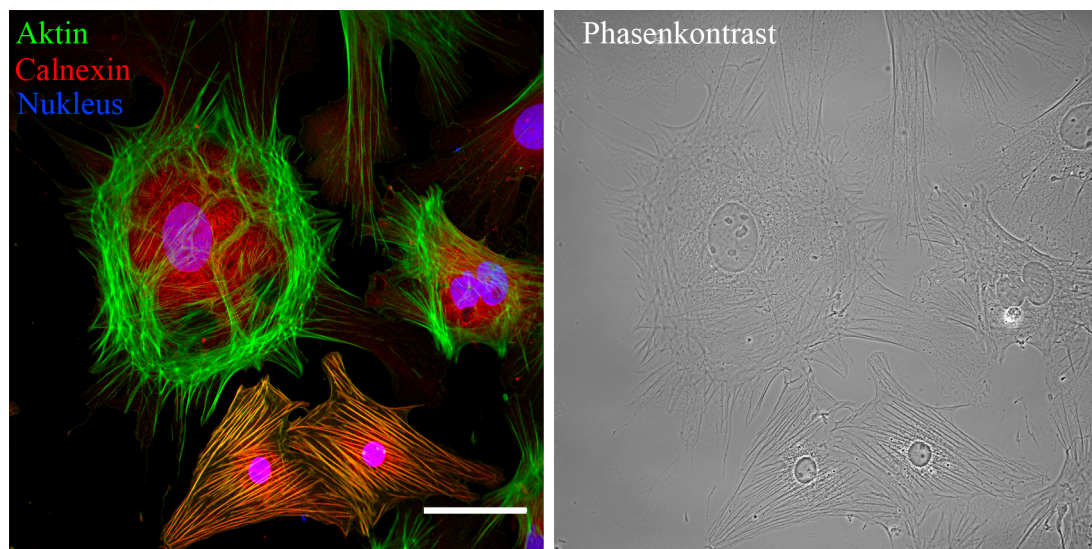


Abbildung 5.1: Bestimmung primärer, kardialer Myozyten und Myofibroblasten. Primäre, kardiale Zellen wurden 6 Tage nach Isolation aus Rattenembryonen mit *Alexa488-Phalloidin* (grün, Aktin), *anti-Calnexin* (rot, TM-Protein des ER) und *DraQ5* (blau, DNA-Marker) immunohistochemisch gefärbt und mit dem cLSM analysiert. Maßstab 10 µm

Wie in Abbildung 5.1 zu sehen ist, zeigten sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf das Aktin-Zytoskelett, die Lokalisierung und Art des ER sowie die Zellgröße und Morphologie des Zellkörpers. In der Mischkultur waren zwei eindeutig voneinander unterscheidbare Zelltypen zu erkennen. Ein Zelltyp zeigte eine Überlagerung des Aktin-Zytosketts mit dem ER. In den mikroskopischen Aufnahmen waren bei diesem Zelltyp parallel angeordnete Aktinfasern, welche von Membranen des ER umgeben waren, zu sehen. Im Phasenkontrastkanal zeigte dieser Zelltyp eine mittlere Größe mit einem segelartig aufgespanntem Zellkörper. Die in der Mischkultur befindlichen Myozyten besaßen eine muskelzell-spezifische Form des ER, das Sarkoplasmatische Retikulum. Dieses ist deutlich durch die Kolokalisation von Aktin und ER zu erkennen und zeigt sich bei Doppelfärbung als Überlagerung beider Kanäle. Myofibroblasten verfügten über ein ER ohne strukturelle Nähe zum Aktin-Zytoskeletts. Im Phasenkontrastbild (rechts) sind deutliche, morphologische Unterschiede im Hinblick auf Größe und Zellkörper zwischen den Muskelzellen und den Fibroblasten zu erkennen. Die Fibroblasten sind meist größer und weniger segelartig aufgespannt als Muskelzellen. Somit konnten beide Zelltypen für nachfolgende Untersuchungen über diese Merkmale auch ohne immunohistochemische Färbung voneinander unterschieden werden.

Der andere in der Mischkultur befindliche Zelltyp besaß weniger parallel angeordnete Aktin-Fasern, welche eher in der Zellperipherie lokalisiert waren. Zwischen Aktin-Signal und ER-Signal war keine Kolokalisation festzustellen. Das ER durchzog die gesamte Zelle als diffus filamentöse Struktur mit deutlich weniger Signal in der Zellperipherie. Dieser Zelltyp war mittel bis überdurchschnittlich groß und von teilweise rundlicher Struktur. Er besaß generell rundlichere Membranvorwölbungen.

5.2.2 Identifizierung der Intensitätsmuster in IRM-Aufnahmen als reife Fokaladhäsionen

Die Position von FAs wurde mittels der in Kapitel 2.5.4 detailliert beschriebenen Interferenz-Reflexions-Mikroskopiemethode (IRM) bestimmt. Vereinfacht gesagt lieferte diese Methode Informationen über den räumlichen Abstand der zellulären Membran zum Substrat, auf dem die Zelle adhäriert war. In IRM-Aufnahmen sollten adhärierte Membranbereiche als intensitätsschwache Stellen detektiert werden. Um sicherzustellen, dass die Intensitätsmuster nicht nur passiv adhärierte Membranbereiche sind, wurden primäre, kardiale Myozyten und Myofibroblasten 6 Tage nach Isolation mit *GFP-Vinculin*, einem FA-assoziierten Protein [183], transfiziert. Daher ist der Vergleich von GFP-Vinculin-Fluoreszenz und IRM-Bild eine Verifikation der Zuordnung. Die Transfektion erfolgte wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben mittels Elektroporation der Zellen. 24 h nach erfolgter Transfektion wurden die adhärierten Zellen mit dem cLSM analysiert.

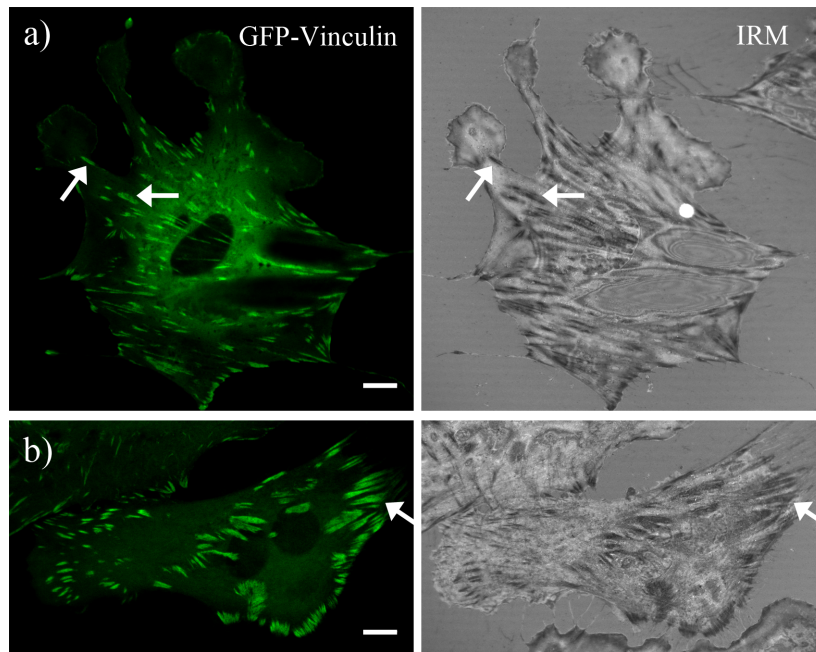


Abbildung 5.2: Identifizierung der Intensitätsmuster in IRM-Aufnahmen als reife Fokalladhäsionen durch Transfektion mit *GFP-Vinculin*.

Primäre, kardiale Zellen wurden mit *GFP-Vinculin*, einem FA-assoziierten Protein transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Fluoreszenzsignal sowie ein IRM-Bild mit dem cLSM analysiert. a) zeigt einen großen Myofibroblasten. Im Fluoreszenzkanal (links) zeigten sich viele, intensiv fluoreszierende und ovale FAs, gleichzeitig erschienen diese Bereiche im IRM-Kanal (rechts) mit niedriger Intensität (weiße Pfeile). b) zeigt einen weiteren Zelltyp, indem die FAs etwas diffuser und größer erscheinen. Maßstab 10 μm .

Im Fluoreszenzkanal waren, wie in Abbildung 5.2 a) zu sehen, über den gesamten Zellkörper intensitätsstarke, ovale Bereiche von 1-6 μm Länge und 0,5-2 μm Breite verteilt, in denen *GFP-Vinculin* stark eingelagert wurde (die Größe der FAs wurde in meiner Diplomarbeit vermessen [98]). Dadurch konnten diese Bereiche eindeutig als FAs identifiziert werden. Im IRM-Bild zeigten sich genau diese Ovale in gleicher Größe und Ausdehnung, allerdings mit sehr niedriger Intensität (siehe auch Intensitätsprofil in Abbildung 5.3). Dadurch konnten für nachfolgende Untersuchungen diese dunklen Ovale, im IRM-Kanal aufgenommen, als FAs identifiziert werden. Die Zelle in Abbildung 5.2 b) zeigt exemplarisch FAs, welche sich zwar im Fluoreszenzkanal als FAs mit starker *GFP-Vinculin*-Einlagerung zeigten, aber im IRM-Kanal wesentlich diffuser erschienen und sich ohne zusätzliche Information eines Fluoreszenzbildes nicht eindeutig als FAs identifizieren ließen. Deshalb wurden solche Zellen aus nachfolgenden Analysen ausgeschlossen.

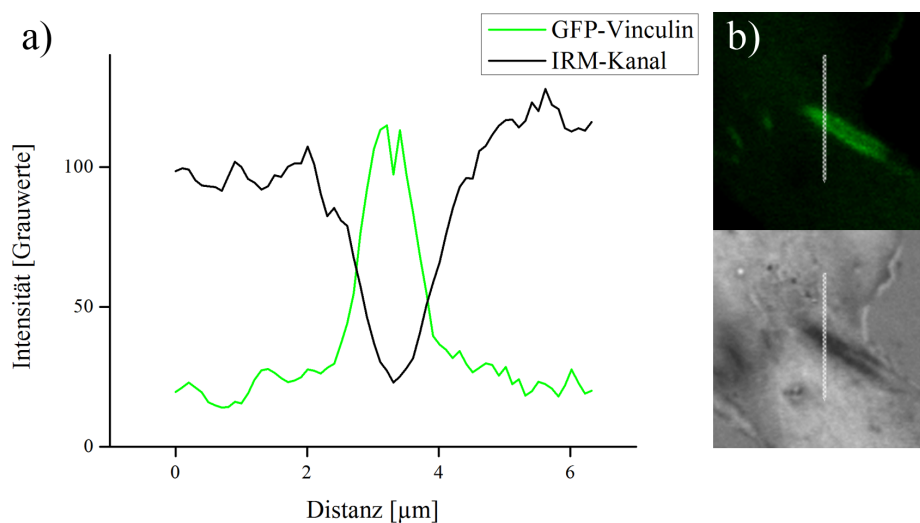


Abbildung 5.3: Intensitätsprofil durch eine FA mit Darstellung der Fluoreszenzintensität und der Intensität des IRM-Kanals.

b) Eine 1-Pixel breiter Messbereich (weiße, gestrichelte Linie) wurde durch eine typische FA (aus Abbildung 5.2 a); mit weißem Pfeil markiert) gelegt und die Intensität beider Kanäle gemessen. Neben der exakten, räumlichen Überlagerung beider Kanäle ist in a) der Intensitätsabfall im IRM-Kanal an der Position der FA sichtbar.

5.2.3 Interkalation von Phospholipiden und Mikrodomänen-assoziierten Lipiden für FCS-Analysen

Um Lipiddiffusionsanalysen in zellulären PMs mit Hinblick auf proteinreiche Domänen durchführen zu können, wurden fluoreszenzmarkierte Phospholipide (β -Bodipy C_{12} -HPC), Mikrodomänen-assoziierte Lipide (Bodipy FL-SM, Bodipy FL-GM1 & TopFluor-Cholesterol) und synthetische, amphipatische Moleküle ($DiIC_{18}(7)$) in primäre, kardiale Myofibroblasten und Myozyten durch FLs interkaliert. Das Membransignal wurde mit dem cLSM analysiert. Es musste sichergestellt werden, dass dort, wo große, reife FAs lokalisiert sind, ein homogenes, membranständiges Fluoreszenzsignal detektierbar war. Die Interkalation erfolgte, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, durch FLs folgender Zusammensetzung:

$$DOPE/DOTAP/DiIC_{18}(7)/Lipid_{\text{fluoresz.}} = 1/1/0.05/0.05 \text{ (w/w)}$$

Die Zellen wurden unmittelbar nach Interkalation mikroskopiert. Im IRM-Kanal wurde auf die Position der Zellunterseite und dort auf Bereiche mit großen, reifen FAs fokussiert und gleichzeitig ein Bild des Fluoreszenzkanals aufgenommen. Wie in Abbildung 5.4 zu sehen ist, ließen sich alle Lipide und amphipatischen Moleküle effizient in die PM

kardialer Myofibroblasten interkalieren. Positionen der als FAs identifizierten, dunkel erscheinenden Ovale (vergleiche Kapitel 5.2.2) wurden im IRM-Kanal abgebildet. Typische FAs in der Zellperipherie waren 1-6 μm lang und 0,5-2 μm breit. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass sich das konfokale Volumen bei FCS-Messungen vollständig innerhalb dieser Membranbereiche platzieren ließ.

Für die Analyse der Lipiddiffusion in der PM war die Qualität und Lokalisation des Fluoreszenzsignals wichtig. *Bodipy FL-SM* zeigte, wie in Abbildung 5.4 zu sehen, ein sehr homogenes Signal im Lammelipodium mit kleinen, punktförmigen, intrazellulären Signalen und größeren, unfusionierten Liposomen auf der Oberfläche der Zelle sowie Anreicherungen in Nähe des Zellkerns. *Bodipy FL-GM1* erschien ebenfalls als homogenes, PM-ständiges Signal ohne Anreicherung in Kernnähe, dafür ebenfalls mit kleinen, intrazellulären Einschlüssen. Im Gegensatz zu allen anderen, in dieser Arbeit getesteten Lipide war im Fall des Gangliosids ein Rückgang des zellulären Fluoreszenzsignals sowie gleichzeitig ein Anstieg des Hintergrund-Fluoreszenzsignals zu beobachten (siehe Kapitel 5.2.5). β -*Bodipy C₁₂-HPC* war größtenteils inhomogen über den gesamten Zellkörper verteilt. Ein homogenes PM-Signal konnte ausschließlich in den äußeren Bereichen des Lammelipodiums detektiert werden. Diese Beobachtung stimmte genau mit der Signalverteilung nach Interkalation in CHO-K1 Zellen überein (vergleiche Abbildung 3.5). *TopFluor-Cholesterol* war hauptsächlich als homogenes PM-Signal verteilt, zeigte allerdings auch hier die in Abbildung 3.6 zu sehenden, sich schnell bewegenden, kleinen Punkte sowie eine starke Anreicherung in Kern-Nähe. *DiIC₁₈(7)* zeigte unmittelbar nach Liposomenfusion ein sehr homogenes PM-Signal, wobei über die Zeit eine intrazelluläre Anreicherung zu erkennen war (vergleiche Abbildung 3.3).

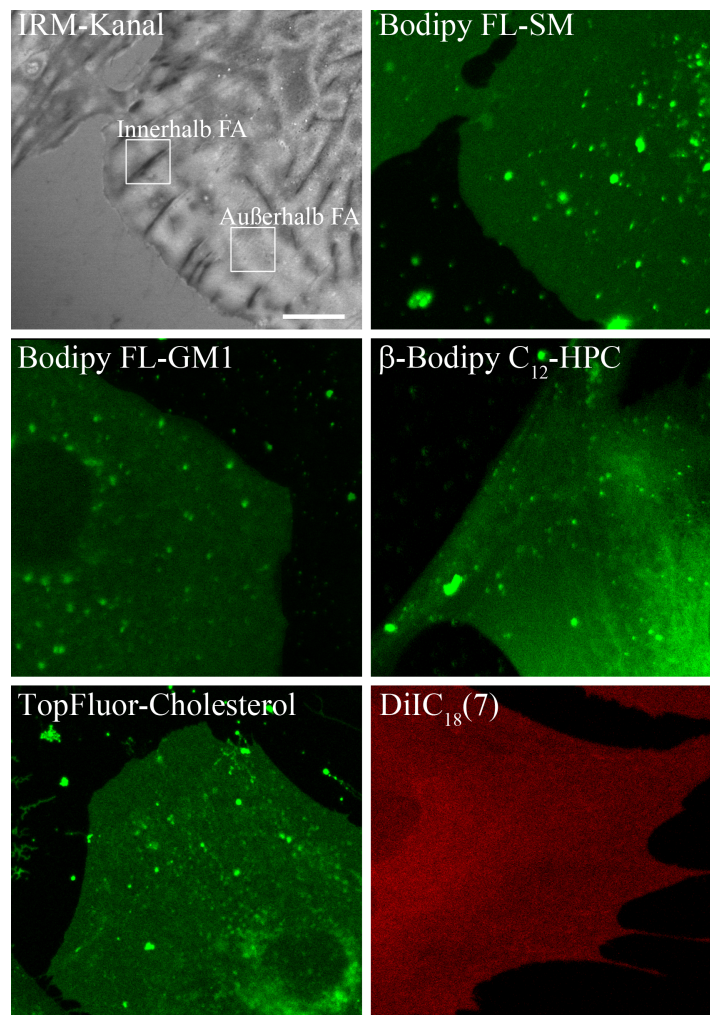


Abbildung 5.4: Lokalisierung von FAs durch IRM und Lipidverteilung nach Interkalation durch FLs.

IRM-Kanal: Genaue Positionsermittlung von FAs durch IRM und Darstellung der Messpunkte (Innerhalb FA & Außerhalb FA) bei allen nachfolgenden FCS-Messungen in Zellen. Die *Bodipy FL-SM* Aufnahme zeigt den Fluoreszenzkanal des IRM-Bildausschnitts. Alle anderen Aufnahmen zeigen die Regionen primärer, kardialer Myofibroblasten, in denen FAs hauptsächlich lokalisiert waren und die mit den beschriebenen Lipiden markiert wurden. Aus Gründen der Übersicht ist der IRM-Kanal nur einmal gezeigt. Maßstab 10 μm

5.2.4 Lipid-Diffusion in der Plasmamembran von Myofibroblasten im Hinblick auf adhärenzte Membranbereiche

Die Diffusion fluoreszenzmarkierter Lipide und amphipatischer Moleküle wurde nach Interkalation durch FLs (siehe Kapitel 5.2.3) mit FCS analysiert. Es wurde in zwei distink-

ten Bereichen der PM von Myofibroblasten gemessen: In nicht-adhärennten Membranbereichen sowie in adhärennten Bereichen, welche zuvor als FAs identifiziert wurden. Die exakte Positionsbestimmung der FAs erfolgte im IRM-Kanal. Alle Messungen wurden in der Zellperipherie durchgeführt, da die interkalierten Moleküle dort ein homogenes Membransignal zeigten (siehe Abbildung 5.4). Durch Bestimmung der Ausdehnung des konfokalen Volumens in x- und z-Richtung (siehe Kapitel 2.5.5.3) und der exakten Positionsüberlagerung des IRM- und Fluoreszenzkanals (siehe Abbildung 5.3) konnte sichergestellt werden, dass Messungen innerhalb großer, reifer FAs, welche 1-6 μm lang und 0,5-2 μm breit waren [98], nicht durch Lipiddiffusion aus angrenzenden, nicht adhärennten Membranbereichen beeinflusst wurden. Details zum Aufbau, dem Messprinzip sowie der Mikroskop-Einstellungen sind detailliert in den Kapiteln 2.5.5 sowie 2.5.5.2 erläutert. Alle FCS-Messungen konnten zufriedenstellend mit dem 2D-1-Komponenten-Modell analysiert werden (siehe Gleichung 2.9 in Kapitel 2.5.5 und Abbildung 5.5). Eine Ausnahme bildeten Messungen in Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Gangliosid *Bodipy FL-GM1*, wie in Kapitel 5.2.5 näher besprochen wird.

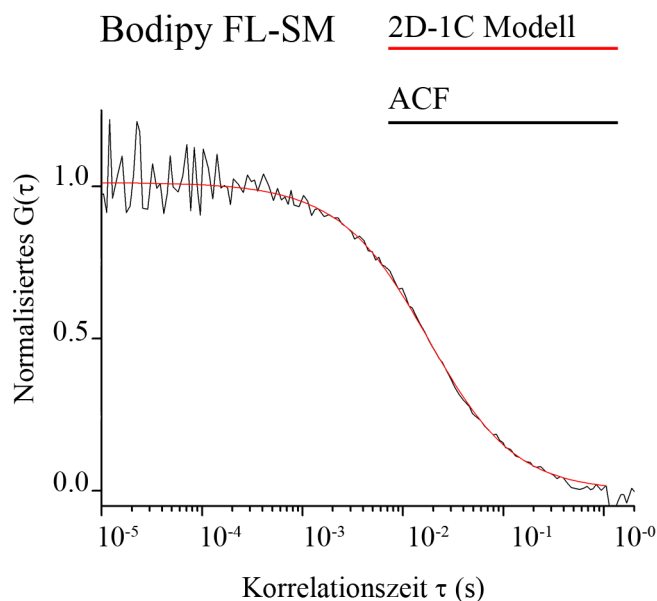


Abbildung 5.5: Beispiel einer FCS-Messung von *Bodipy FL-SM* in der PM von Myofibroblasten. Die schwarze Kurve zeigt die ACF und in rot ist die Datenanpassung mit einem 2D-1C-Modell dargestellt.

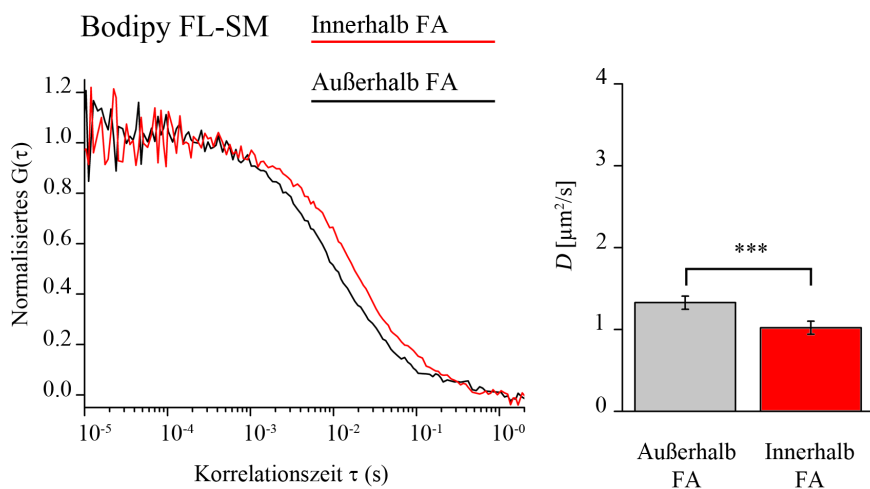


Abbildung 5.6: Ergebnis der FCS-Messungen mit *Bodipy FL-SM* außerhalb und innerhalb von FAs. Schwarze, normalisierte Autokorrelationskurven (*ACFs*) repräsentieren Messungen außerhalb FAs, rote, normalisierte Kurven wurden innerhalb FAs gemessen. Die Balkendiagramme geben die mittlere Diffusionskonstante $\bar{D} \pm$ das Konfidenzintervall CI_x der ermittelten Werte für Messungen außerhalb (grau) und innerhalb FAs (rot) an. *Bodipy FL-SM* zeigte mit sehr hoher statistischer Signifikanz (vorgegebene Signifikanzschwelle $P=99,71\%$) eine verlangsamte Diffusion in zellulären FAs. N_{Gesamt} 108 FCS-Messungen in 54 Zellen.

Abbildung 5.6 zeigt zwei typische, normierte Autokorrelogramme für FCS-Messungen mit *Bodipy FL-SM* außerhalb und innerhalb von FAs. Die Balkendiagramme geben die gemittelten Werte und das Konfidenzintervall aller Einzelmessungen als Fehlerbalken an. Die gemessenen Autokorrelogramme ließen sich zufriedenstellend mit einem 1-Komponenten-, 2-dimensionale Diffusions-Modell (1C-2D; siehe Gleichung 2.9) anpassen (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die Lokalisation des Lipids in der PM durch cLSM-Aufnahmen bestätigt (vergleiche Abbildung 5.4). In insgesamt 108 Messungen in 54 Myofibroblasten wurde eine deutlich verlangsamte Diffusion von *Bodipy FL-SM* in zellulären FAs beobachtet. Die Diffusionskonstante \bar{D} (siehe Gleichung 2.11) betrug für Messungen in nicht-adhären Bereichen der PM $1,33 \pm 0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und in adhären Membranbereichen $1,02 \pm 0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (\pm gibt das Konfidenzintervall CI_x an). Diese deutliche Verlangsamung der Lipiddiffusion von *Bodipy FL-SM* in zellulären FAs konnte mit sehr hoher statistischen Signifikanz (Irrtumswahrscheinlichkeit = 0,21 %) bestätigt werden. (Angaben zur statistischen Analyseverfahren siehe Kapitel 2.7)

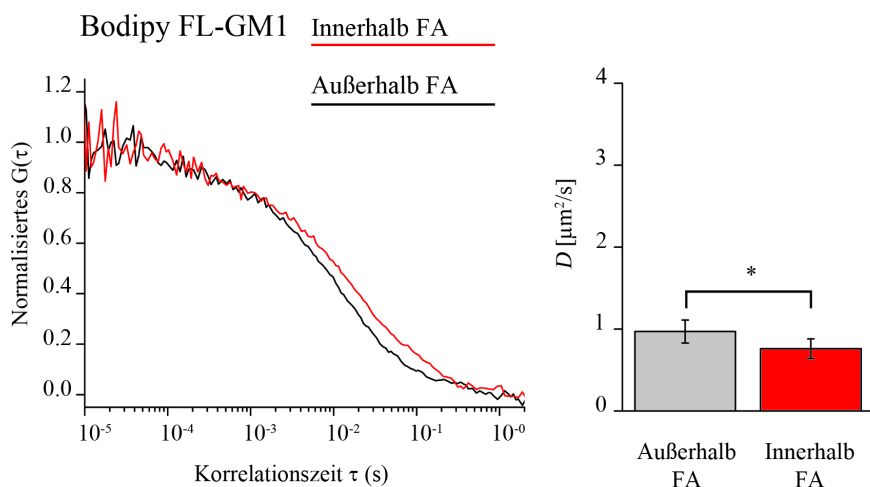


Abbildung 5.7: Ergebnis der FCS-Messungen mit *Bodipy FL-GM1* außerhalb und innerhalb von FAs. Schwarze, normalisierte ACFs repräsentieren Messungen außerhalb FAs, rote, normalisierte Kurven wurden innerhalb FAs gemessen. Die Balkendiagramme geben die mittlere Diffusionskonstante $\bar{D} \pm$ das Konfidenzintervall CI_x der ermittelten Werte für Messungen außerhalb (grau) und innerhalb FAs (rot) an. *Bodipy FL-GM1* zeigte mit hoher statistischer Signifikanz (vorgegebene Signifikanzschwelle $P=95\%$) eine verlangsamte Diffusion in zellulären FAs. $N_{\text{Gesamt}} = 74$ FCS-Messungen in 37 Zellen.

Abbildung 5.7 zeigt typische, normierte Autokorrelogramme von FCS-Messungen mit *Bodipy FL-GM1* in nicht-adhären Membranbereichen und in FAs, sowie die Mittelwerte und das Konfidenzintervall aller Messungen in Form von Balkendiagrammen und Fehlerbalken. Die ermittelten Messkurven konnten mit einem 2C-2D-Diffusionsmodell (siehe Gleichung 2.10) beschrieben werden, da das 1-Komponentenmodell in diesem Fall keine zufriedenstellende Analyse ermöglichte. Der Grund dafür war, dass das Gangliosid eine untypische Abnahme des membranständigen Fluoreszenzsignals und eine gleichzeitige Zunahme des Hintergrundsignals zeigte, obwohl es nach Interkalation eindeutig in der PM lokalisiert war (vergleiche Abbildung 5.4 & 5.13). Aus diesem Grund wurde für die Analyse von \bar{D} nur die langsam diffundierende Komponente bedacht. Eine detaillierte Beschreibung des Signalverlustes über die Zeit und die Datenanpassung durch das 2-Komponenten-Modell findet sich in Kapitel 5.2.5. Die aus insgesamt 74 Messungen in 37 Myofibroblasten ermittelte Diffusionskonstante \bar{D} betrug außerhalb FAs $0,97 \pm 0,14 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und innerhalb $0,76 \pm 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Somit zeigte *Bodipy FL-GM1* mit hoher statistischer Signifikanz (Irrtumswahrscheinlichkeit = 5%) eine verlangsamte Diffusion in zellulären FAs.

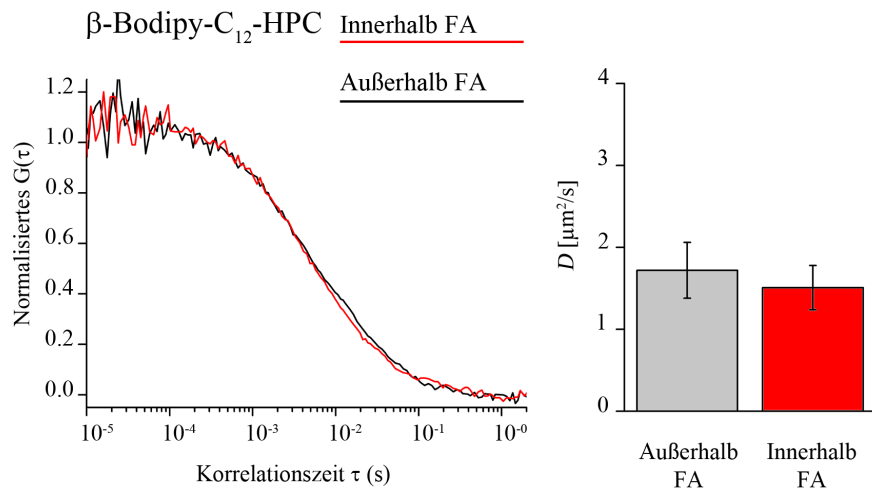


Abbildung 5.8: Ergebnis der FCS-Messungen mit β -Bodipy C_{12} -HPC außerhalb und innerhalb von FAs. Schwarze, normalisierte ACFs repräsentieren Messungen außerhalb FAs, rote, normalisierte Kurven wurden innerhalb FAs gemessen. Die Balkendiagramme geben $\bar{D} \pm CI_x$ der ermittelten Werte für Messungen außerhalb (grau) und innerhalb FAs (rot) an. Die ermittelten Diffusionskonstanten unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander. N_{Gesamt} 90 FCS-Messungen in 45 Zellen.

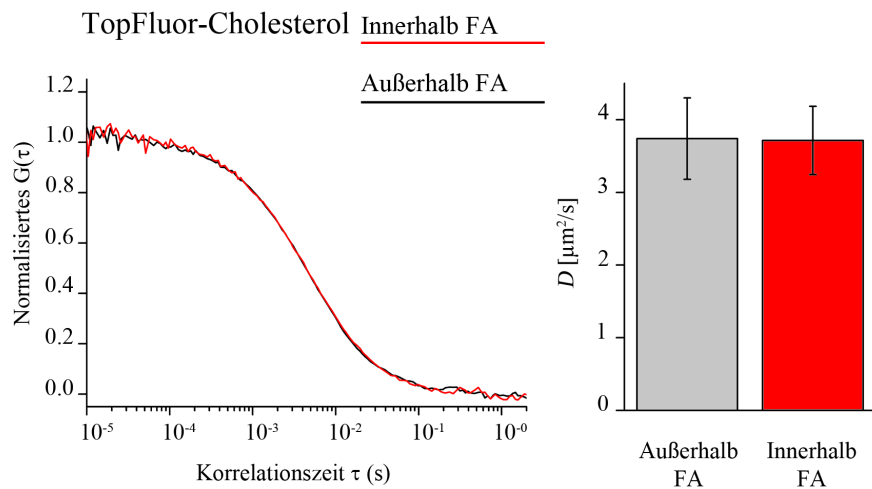


Abbildung 5.9: Ergebnis der FCS-Messungen mit TopFluor-Cholesterol außerhalb und innerhalb von FAs. Schwarze, normalisierte ACFs repräsentieren Messungen außerhalb FAs, rote, normalisierte Kurven wurden innerhalb FAs gemessen. Die Balkendiagramme geben $\bar{D} \pm CI_x$ der ermittelten Werte für Messungen außerhalb (grau) und innerhalb FAs (rot) an. Die ermittelten Diffusionskonstanten unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander. N_{Gesamt} 70 FCS-Messungen in 35 Zellen.

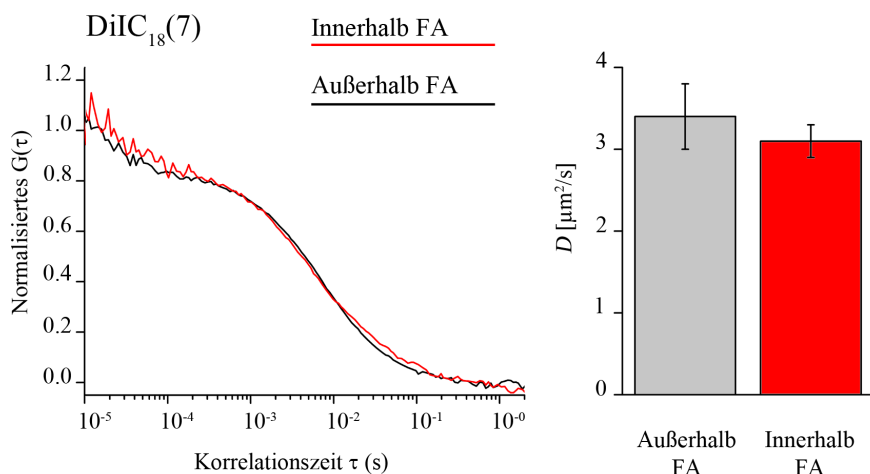


Abbildung 5.10: Ergebnis der FCS-Messungen mit $DiIC_{18}(\gamma)$ außerhalb und innerhalb von FAs. Schwarze, normalisierte ACFs repräsentieren Messungen außerhalb FAs, rote, normalisierte Kurven wurden innerhalb FAs gemessen. Die Balkendiagramme geben die mittlere Diffusionskonstante $\bar{D} \pm$ das Konfidenzintervall CI_x der ermittelten Werte für Messungen außerhalb (grau) und innerhalb FAs (rot) an. Die ermittelten Diffusionskonstanten unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander. $N_{\text{Gesamt}} = 38$ FCS-Messungen in 19 Zellen.

Die Abbildungen 5.8, 5.9, 5.10 zeigen typische Autokorrelogramme für Messungen mit β -Bodipy C_{12} -HPC, TopFluor-Cholesterol und $DiIC_{18}(\gamma)$ in nicht-adhären Membranbereichen sowie in zellulären FAs. Konsequenterweise entsprechen auch hier die Balkendiagramme den gemittelten Messwerten sowie dem Konfidenzintervall als Fehlerbalken. In allen Messungen ließ sich die Diffusion des Phospholipids, des Sterols und des synthetischen, amphipatischen Moleküls zufriedenstellend durch ein 1C-2D-Diffusionsmodell beschreiben. Die Membranständigkeit des Fluoreszenzsignals wurde durch cLSM-Aufnahmen bestätigt (vergleiche Abbildung 5.4). \bar{D} von β -Bodipy C_{12} -HPC betrug außerhalb FAs $1,72 \pm 0,34 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und innerhalb $1,51 \pm 0,27 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Bei insgesamt 90 Messungen in 45 Zellen war kein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar. TopFluor-Cholesterol diffundiert von den untersuchten Molekülen am schnellsten in der PM von Myofibroblasten. \bar{D} betrug außerhalb FAs $3,74 \pm 0,56 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und innerhalb $3,71 \pm 0,46 \mu\text{m}^2/\text{s}$. In insgesamt 70 Messungen in 35 Zellen war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Diffusion außerhalb und innerhalb FAs feststellbar. $DiIC_{18}(\gamma)$ diffundiert außerhalb FAs mit $3,42 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und innerhalb mit $3,41 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Bei insgesamt 38 Messungen in 19 Zellen war auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar.

Beim direkten Vergleich der getesteten Lipide wurden große Unterschiede im Hinblick auf die ermittelten Diffusionskonstanten deutlich. Es zeigte sich, dass Bodipy FL-SM und Bodipy FL-GM1 in zellulären FAs eine deutlich verlangsamte Diffusion besaßen im Ver-

gleich zu nicht-adhärennten Membranbereichen. Dabei diffundierte das Gangliosid noch langsamer als das Sphingolipid. β -Bodipy C_{12} -HPC zeigte innerhalb FAs keine verlangsamte Diffusion. Dafür diffundierte es insgesamt schneller als das in etwa gleich Große Sphingolipid. Das Cholesterol-Derivat zeigte eine annähernd gleich schnelle Diffusion wie das synthetische, amphipatische $DiIC_{18}(7)$ und war das mit Abstand kleinste der getesteten Moleküle. Abbildung 5.11 stellt die ermittelten Diffusionskonstanten der besseren Vergleichbarkeit halber zusammen dar.

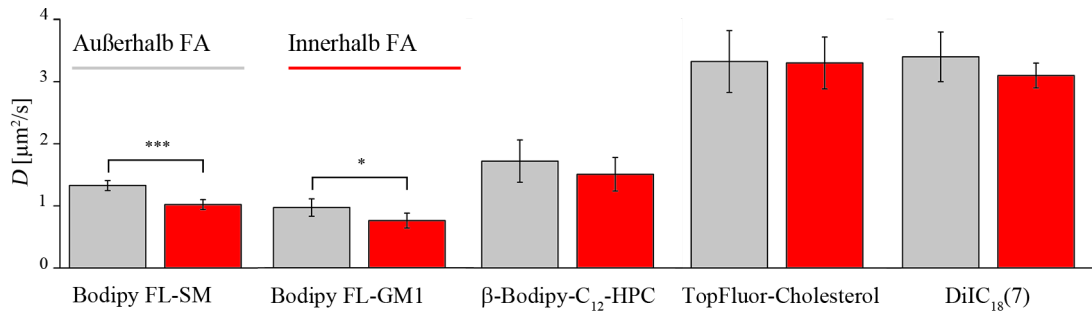


Abbildung 5.11: Vergleich der durch FCS ermittelten Diffusionskonstanten außerhalb (grau) und innerhalb (rot) zellulärer FAs. Gezeigt sind Mittelwerte mit dem Konfidenzintervall (P=95 %) als Fehlerbalken.

Eine FCS-Messung bestand wie in Kapitel 2.5.5.2 beschrieben aus 6-10 Einzelmessungen, aus denen ein einzelner Messwert gemittelt wurde, der in die zuvor beschriebenen statistischen Analysen einfließt. Die Streuung der Einzelmessungen der FCS-Werte war somit ein interessanter Faktor, um weitere Informationen über die Art der Diffusion der getesteten Lipide sowie die Struktur der Membran zu bekommen. Abbildung 5.12 fasst die ermittelten Streuungen der Zeiten zusammen.

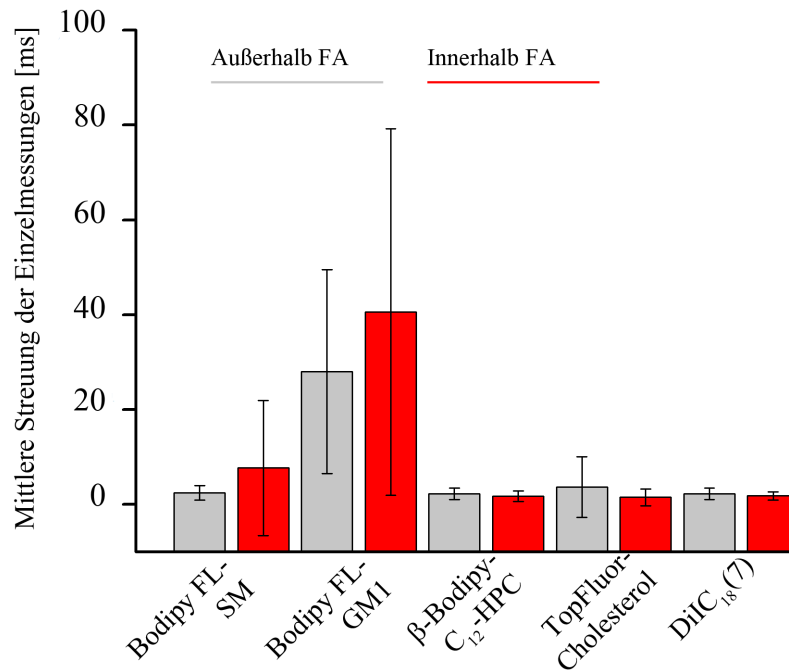


Abbildung 5.12: Vergleich der mittleren Streuung der Einzelmessungen bei FCS-Messungen. Die Diffusionszeit τ der Einzelmessungen wurde gemittelt und die Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen. *Bodipy FL-SM* und *Bodipy FL-GM1* haben eine, verglichen mit den anderen getesteten Lipiden, hohe zeitliche Streuung während einer FCS-Messung. β -*Bodipy-C₁₂-HPC* und *DiIC₁₈(7)* besaßen annähernd identische, geringe Abweichungen der Diffusionszeit während einer FCS-Messung. *TopFluor-Cholesterol* zeigte eine etwas höhere Streuung außerhalb FAs.

Es zeigte sich, dass die beiden Lipide *Bodipy FL-SM* und *Bodipy FL-GM1*, welche in FAs verlangsamt diffundierten, hohe Streuungen der Einzelmessungen besaßen. Insbesondere das Gangliosid streute sowohl in der PM als auch in der FA besonders stark. Die Streuung des Sphingolipids war in der FA höher als in nicht-adhärirten Membranbereichen. Alle anderen getesteten Moleküle zeigten keine nennenswerte Streuung der Einzelwerte.

5.2.5 Zeitliche Bestimmung des ansteigenden Hintergrundsignals bei Messungen mit *Bodipy FL-GM1*

Bei FCS-Messungen sowie cLSM-Aufnahmen mit *Bodipy FL-GM1* wurde eine Zunahme des Hintergrundsignals über die Zeit beobachtet, welche unter allen getesteten Lipiden einzigartig war. Dies führte unter anderem dazu, dass Messungen und mikroskopische Aufnahmen immer unmittelbar nach Interkalation erfolgen mussten. Dabei betrug das zur Verfügung stehende Zeitfenster ca. 10 min, bis das Hintergrundsignal zu stark wurde.

Um diesen Effekt genauer analysieren zu können, wurde *Bodipy FL-GM1* über FLs in Myofibroblasten interkaliert. Anschließend wurde das Fluoreszenz-Hintergrundsignal mit dem ConfoCor 3-Modul 50 μm über den adhärennten Zellen für 20 min gemessen. Zusätzlich wurden mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik (siehe Kapitel 2.4.1) künstliche Lipiddoppelschichten aus

DPPC/Bodipy FL-GM1 (1/0,002 w/w)

hergestellt. Diese wurden mit PBS überschichtet und das Fluoreszenz-Hintergrundsignal mit dem ConfoCor 3-Modul 50 μm über der Lipiddoppelschicht für 20 min gemessen. Eine weitere Lipiddoppelschicht wurde mit PBS + 10 % FKS überschichtet und ebenfalls das Hintergrundsignal über 20 min gemessen. Abbildung 5.13 zeigt den zeitlichen Verlauf der Signalintensität einer zellulären Probe sowie den Lipiddoppelschichten. Der Anstieg des Hintergrundsignals nach Interkalation in Zellen (Abbildung 5.13 oberer Graph) begann 3-5 min nach Interkalation und erreichte sein Plateau nach 15 min. Dabei war ein absoluter Intensitätsanstieg von annähernd 0,2 kHz (entsprach genau dem Dunkelstrom der APDs) auf 8 kHz zu beobachten. Dies führte zu einer drastischen Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bei cLSM-Aufnahmen und FCS-Messungen. Wurde eine künstliche Lipiddoppelschicht, in welcher sich 0,02 Gewichts% *Bodipy FL-GM1* befanden, mit PBS überschichtet, war kein Anstieg des Hintergrundsignals zu beobachten (mittlerer Graph). Eine gleiche Lipiddoppelschicht, welche mit PBS+10 % FKS überschichtet wurde, zeigte wiederum einen Anstieg des Hintergrundsignals mit einem den Zellmessungen ähnlichem Verlauf (unterer Graph). Allerdings war hier der absolute Intensitätsanstieg von 0,4 kHz auf 0,6 kHz wesentlich geringer, da sich insgesamt nur eine sehr kleine Menge fluoreszenzmarkiertes Lipid in der künstlichen Membran befand. Dennoch ließ sich das fötale Kälberserum beziehungsweise ein Bestandteil des Serums als Grund für den Signalverlust in der Membran und den gleichzeitigen Anstieg des Hintergrundsignals identifizieren.

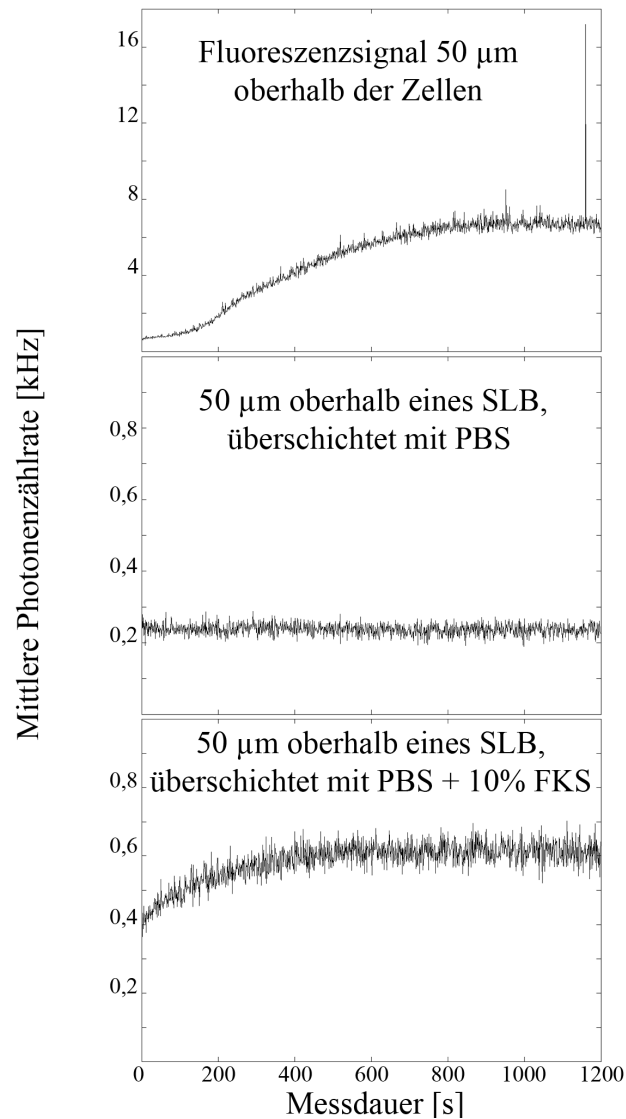


Abbildung 5.13: Zunahme des Fluoreszenz-Hintergrundsignals bei Verwendung von *Bodipy FL-GM1* in Zellen und Modellsystemem. Die Hintergrundintensität des *Bodipy FL-GM1*-Signals wurde 50 μm oberhalb adhärrierter Zellen nach Interkalation durch FLs (oberer Graph), einer mit PBS überschichteten (mittlerer Graph) und einer mit PBS+10 %FKS überschichteten Lipiddoppelschicht (SLB) mit dem ConfoCor 3-Modul für 20 min gemessen. Die Photonenzählraten wurden über eine 1 μs gemittelt.

Abbildung 5.14 zeigt eine Aufnahme mit dem cLSM der gleichen Lipiddoppelschicht beziehungsweise eines Myofibroblasten nach Interkalation.

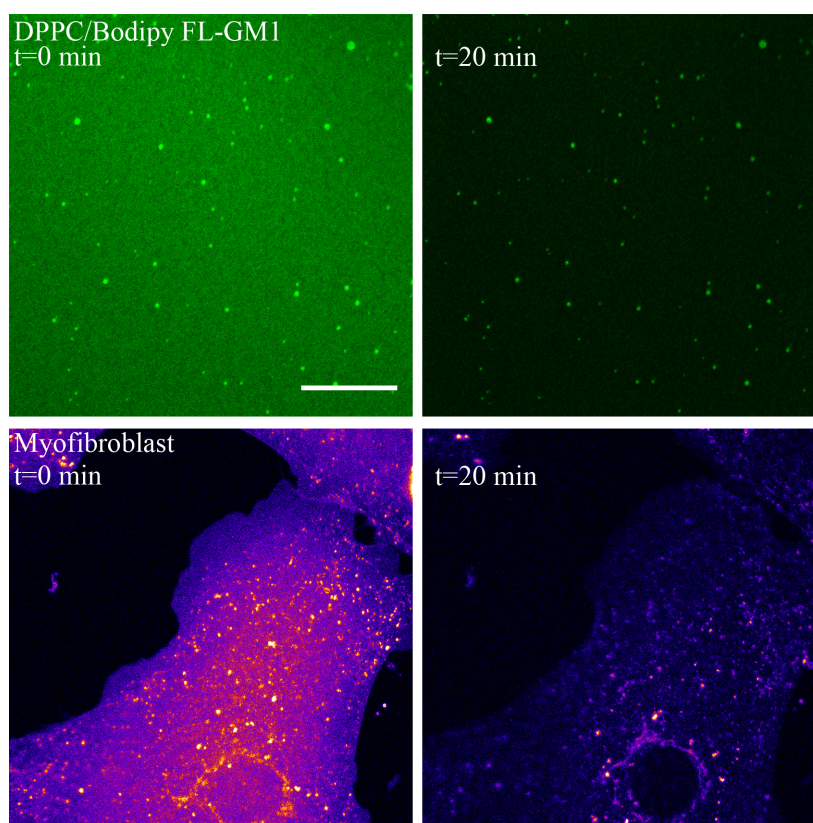


Abbildung 5.14: Vergleich der Signalintensität einer Lipiddoppelschicht sowie Myofibroblasten mit *Bodipy FL-GM1* kurz nach Überschichtung mit PBS+10 % FKS beziehungsweise Interkalation und nach 20 min. Eine künstliche Lipiddoppelschicht, in welcher sich *Bodipy FL-GM1* befand, wurde mit PBS+10 % FKS überschichtet und sofort ($t=0$ min) und nach 20 min mikroskopiert (obere Zeile). Dabei war ein deutlicher Signalverlust zu beobachten, wie bei Myofibroblasten, welche zuvor mit dem Gangliosid markiert wurden (untere Zeile). Zur besseren Sichtbarkeit ist die Fluoreszenz hier in Falschfarben dargestellt. Maßstab 25 μm

Der Effekt des Signalverlustes war auch auf Probenebene deutlich sichtbar. Eine Lipiddoppelschicht aus *DPPC/Bodipy FL-GM1* war zwanzig Minuten nach Überschichtung mit PBS+10 % FKS bei gleichen Mikroskop-Einstellungen nur noch schwach fluoreszent (Abbildung 5.14, obere Zeile). Der gleiche Effekt konnte bei Myofibroblasten nach Interkalation des Gangliosids beobachtet werden (Abbildung 5.14, untere Zeile). Dabei war keine Veränderung in der Verteilung des zellulären Signals zu beobachten. Neben den stark fluoreszierenden, intrazellulären Einschlüssen war auch nach 20 min ein homogenes, aber sehr schwaches Membransignal in der Zellperipherie sichtbar.

Durch die Zunahme des Hintergrundsignals im Kulturmedium konnten die bei FCS-Messungen aufgenommenen Autokorrelogramme nur schlecht durch ein 1-Komponenten-

2D-Diffusionsmodell gefittet werden. Daher wurden Autokorrelogramme von FCS-Messungen mit *Bodipy FL-GM1* mit einem 2-Komponenten-2D-Diffusionsmodell (siehe Gleichung 2.10) analysiert und nur die langsamer diffundierende der beiden Komponenten für statistische Analysen verwendet. Abbildung 5.15 zeigt eine FCS-Messung, ausgewertet mit den unterschiedlichen Diffusionsmodellen.

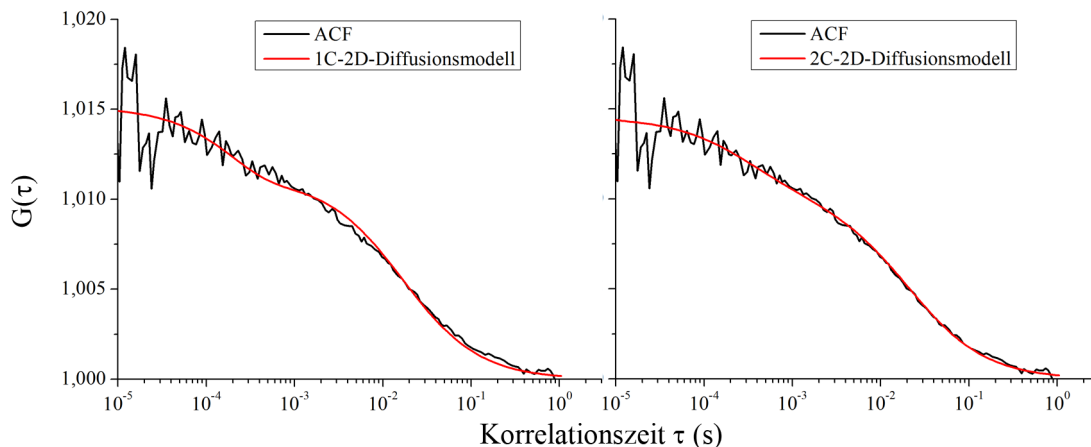


Abbildung 5.15: Vergleich unterschiedlicher Fit-Modelle an eine FCS-Messung von *Bodipy FL-GM1* in der PM von Myofibroblasten. Das fluoreszenzmarkierte Gangliosid wurde über FLs in Myofibroblasten interkaliert und die Diffusionskonstante durch FCS bestimmt. Links ist die ermittelte ACF sowie ein Fit mit dem 1C-2D-Diffusionsmodell gezeigt. Rechts die gleiche Messung, allerdings wird hier das 2C-2D-Diffusionsmodell zur Datenanpassung verwendet.

Bei dem direkten Vergleich der beiden Diffusionsmodelle wurde deutlich, dass das Diffusionssignal, welches teilweise von dem zuvor beschriebenen Hintergrundsignal überlagert wurde, durch ein 1-Komponenten-Modell nicht zutreffend beschrieben werden konnte und das 2-Komponenten-Modell die stark unterschiedlichen Diffusionszeiten (Signal aus dem Kulturmedium mit schneller Diffusion und Signal aus der Membran mit langsamer Diffusion) berücksichtigen konnte. Folglich wurden alle Messungen mit dem Gangliosid mit dem 2C-2D-Diffusionsmodell (siehe Gleichung 2.10 in Kapitel 2.5.5) ausgewertet und nur die langsamere der beiden Komponenten für statistische Analysen verwendet.

Tabelle 5.1 zeigt die durch FCS-Messungen ermittelten Parameter aller Messungen an Myofibroblasten.

	\bar{D}	σ_x	CI_x	Partikel #	σ_x	CI_x	Korr. Ampl.	N
SM außerhalb	1,33	0,29	0,08	21,5	13,5	3,7	1,066	54
SM innerhalb	1,02	0,28	0,08	23,4	16,3	4,5	1,065	54
GM1 außerhalb	0,97	0,4	0,14	41	53,8	17,9	1,061	37
GM1 innerhalb	0,76	0,35	0,12	37,9	30,3	10,1	1,049	37
PC außerhalb	1,72	1,12	0,34	26,8	18,2	5,5	1,057	45
PC innerhalb	1,51	0,9	0,27	20,8	13,8	4,1	1,068	45
Cholesterol außerhalb	3,74	1,62	0,56	29	6,7	2,3	1,037	35
Cholesterol innerhalb	3,71	1,36	0,47	27,2	8,4	2,9	1,04	35
<i>DiIC</i> ₁₈ (γ) außerhalb	3,4	0,7	0,4	13,7	3,9	1,9	1,077	19
<i>DiIC</i> ₁₈ (γ) innerhalb	3,1	0,4	0,2	11,3	3,8	1,8	1,097	19

Tabelle 5.1: Tabellarische Darstellung der aus FCS-Messungen ermittelten Diffusionskonstante \bar{D} , der Partikelanzahl, der Korrelationsamplitude sowie der Anzahl der Messungen N mit Angaben der Standardabweichung σ_x und dem 95 % Konfidenzintervalls CI_x für \bar{D} bei Messungen an Myofibroblasten. „außerhalb“ bedeutet in nicht-adhärennten Membranbereichen gemessen; „innerhalb“ in Fokaladhäsionen gemessen.

5.2.6 Lipid-Diffusion in phasenseparierten Riesenvesikeln als biomimetisches Modellsystem

Die Diffusionskonstante der bei den Zellmessungen verwendeten fluoreszenzmarkierten Phospholipide (β -*Bodipy* C_{12} -*HPC*), Mikrodomänen-assoziierten Lipide (*Bodipy FL-SM*, *Bodipy FL-GM1* & *TopFluor-Cholesterol*) und synthetischen, amphipatischen Moleküle (*DiIC*₁₈(γ)) wurde in phasenseparierten, unilamellaren Riesenvesikeln (GUVs) bestimmt. Da die Plasmamembran in adhärennten Membranbereichen eine höhere Ordnung aufweist, konnte durch Vergleiche der Diffusion in der flüssig-ungeordneten (L_D) und in der flüssig-geordneten (L_O) Phase von Riesenvesikeln der Einfluß der Membranordnung auf die, in zellulären FAs signifikant unterschiedlichen Diffusionskonstanten von *Bodipy FL-SM* und *Bodipy FL-GM1*, untersucht werden.

Phasenseparierte Riesenvesikel wurden mit Hilfe der Elektroschwellmethode hergestellt (siehe Kapitel 2.4.2). Folgende Lipidmischung führte zu L_D/L_O -entmischten GUVs, welche mit dem cLSM in speziellen, abgedichteten Kammern (siehe Kapitel 2.4.2.2) mikroskopiert werden konnten:

$$DOPC/SM/Chol/CapBio-DHPE/DiIC_{18}(\gamma)/Molekül B_{\text{fluoresz.}}$$

$$(1/1/1/0,003/0,005/0,005 \text{ mol/mol}; \beta = 1 \text{ mg/ml})$$

Abbildung 5.16 zeigt eine dreidimensionale Darstellung ein L_D/L_O -phasenseparierten und

mit $DiIC_{18}(\gamma)$ markierten GUVs, welches eine typische Verteilung der beiden Phasen für die verwendete Lipidmischung und Präparationsmethode zeigt. Die dargestellte Vesikelgeometrie war notwendig, um an der Vesikeloberseite in beiden Phasen Messungen ohne Einfluss der Adhäsionszone durchführen zu können. Die Adhäsion an das mit Neutra-
vidin beschichtete Deckglas erfolgte ausschließlich in der L_D -Phase, da das verwendete Funktionslipid $CapBio-DHPE$ offensichtlich in dieser Phase angereichert war.

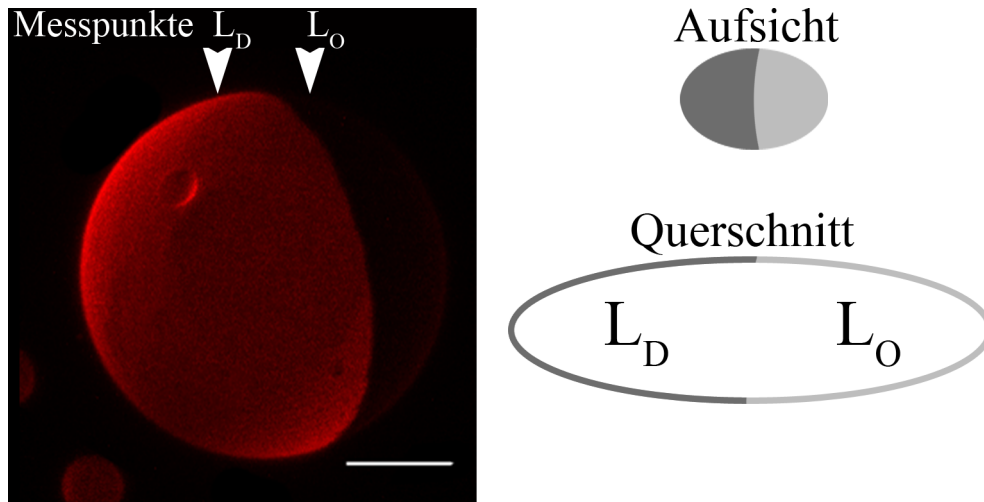


Abbildung 5.16: 3D-gerenderte Abbildung eines phasenseparierten, unilamellaren Riesenvesikels sowie schematische Aufsicht und Querschnitt. Das GUV wurde hergestellt aus $DOPC/SM/Chol/CapBio-DHPE/DiIC_{18}(\gamma)$. $DiIC_{18}(\gamma)$ wurde als Marker für die L_D -Phase verwendet, da sich das Molekül fast ausschließlich in dieser Phase anreicherte. Die flüssig-ungeordnete Phase (L_D ; dunkelgrau) und die flüssig-geordnete Phase (L_O ; hellgrau) sind flächenmäßig annähernd gleich groß. Die Adhäsion an das mit Neutra-
vidin beschichtete Deckglas erfolgte ausschließlich in der L_D -Phase. Die Lipid-Diffusion wurde nur in derart orientierten und entmischten GUVs bestimmt. FCS-Messung wurden in beiden Phasen an der Vesikeloberseite (Messpunkte) durchgeführt. Maßstab 10 μm .

Vor den FCS-Messungen wurde die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Lipide *Bodipy FL-SM*, *Bodipy FL-GM1*, β -*Bodipy C₁₂-HPC*, *TopFluor-Cholesterol* und von $DiIC_{18}(\gamma)$ in den L_D/L_O -phasenseparierten GUVs bestimmt. Abbildung 5.17 zeigt die Intensitätsverteilung der getesteten, fluoreszenzmarkierten Lipide in phasenseparierten GUVs.

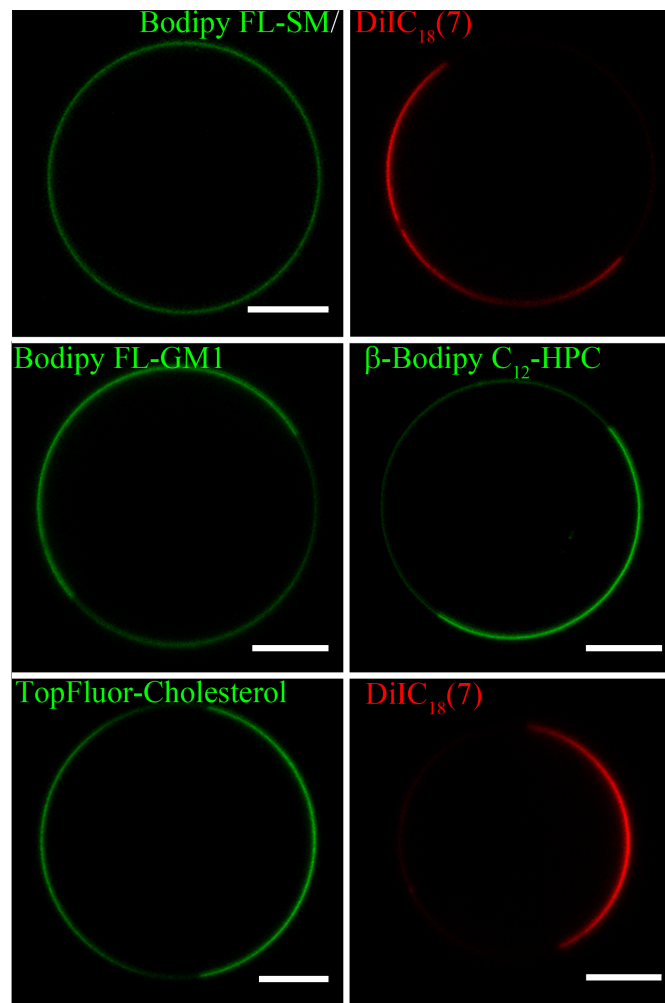


Abbildung 5.17: Verteilung der fluoreszenzmarkierten Lipide und Moleküle in L_D/L_O -phasenseparierten GUVs. GUVs wurden aus $DOPC/SM/Chol/CapBio-DHPE/DiIC_{18}(\gamma)/Molekül_{B_{fluoresz.}}$ (1/1/1/0,003/0,005/0,005 mol/mol; $\beta = 1$ mg/ml) präpariert. $DiIC_{18}(\gamma)$ diente als Marker für die L_D -Phase, da es sich fast ausschließlich dort anreichert. $Bodipy FL-SM$ war in beiden Phasen gleich verteilt. Deswegen wird rechts neben dem SM-Kanal der $DiIC_{18}(\gamma)$ -Kanal des GUVs gezeigt- Alle anderen Lipide und Moleküle zeigten eine Präferenz für die L_D -Phase. Maßstab 10 μm

$Bodipy FL-SM$ zeigte als einziges der fluoreszenzmarkierten Moleküle keine eindeutige Anreicherung in einer der beiden Phasen. Dennoch konnte durch das synthetische, amphipatische $DiIC_{18}(\gamma)$ die L_D - und die L_O -Phase voneinander unterschieden werden (Abbildung 5.17 obere Reihe, linke und rechte Aufnahme des gleichen Vesikels). $Bodipy FL-GM1$, $\beta-Bodipy C_{12}-HPC$ und $TopFluor-Cholesterol$ reicherten sich alle in der L_D -Phase an (identifiziert durch $DiIC_{18}(\gamma)$, nicht gezeigt), mit einem schwach detektierbaren Fluoreszenzsignal in der L_O -Phase. $DiIC_{18}(\gamma)$ war als einziges der getesteten Moleküle

fast ausschließlich in der L_D -Phase lokalisierbar.

Während das Fluoreszenzsignal mit der oben genannten Lipidmischung für cLSM-Aufnahmen optimal detektierbar war, war die Fluorophor-Konzentration des zu messenden Lipids insbesondere in der flüssig-ungeordneten Phase für FCS-Messungen zu hoch. Deshalb wurden GUVs mit deutlich reduzierter Konzentration des zu messenden Moleküls präpariert. Folgende Lipid-Mischung wurde für alle nachfolgenden FCS-Messungen verwendet:

$$\text{DOPC/SM/Chol/CapBio-DHPE/DiIC}_{18}(7)/\text{Molekül } B_{\text{fluoresz.}}$$

$$(1/1/1/0,003/0,005/0,0002 \text{ mol/mol}; \beta = 1 \text{ mg/ml})$$

Diese Mischung stellte einen guten Kompromiss aus ausreichend hohem Signal in der L_O -Phase und nicht zu hoher Intensität in der L_D -Phase dar. Die Diffusionskonstante wurde in den beiden Phasen in der Vesikeloberseite bestimmt, wobei einzig $\text{DiIC}_{18}(7)$ nur in der flüssig-geordneten Phase gemessen werden konnte.

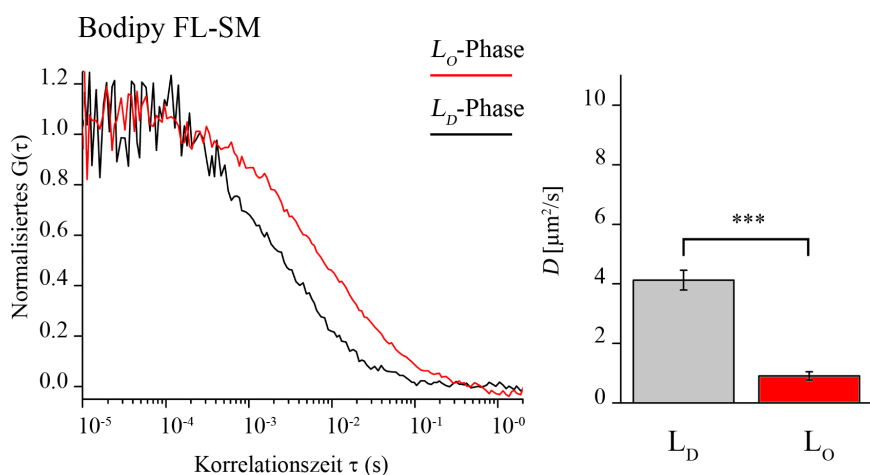


Abbildung 5.18: Ergebnis der FCS-Messungen mit *Bodipy FL-SM* in L_D/L_O -phasenseparierten GUVs. Schwarze, normalisierte Autokorrelationskurven (*ACFs*) repräsentieren Messungen in der L_D -Phase, rote, normalisierte Kurven wurden in der L_O -Phase gemessen. Die Balkendiagramme geben die mittlere Diffusionskonstante $\bar{D} \pm$ das Konfidenzintervall CI_x der ermittelten Werte für Messungen in L_D - (grau) und L_O -Phase (rot) an. *Bodipy FL-SM* zeigte mit sehr hoher statistischer Signifikanz (vorgegebene Signifikanzschwelle $P=99,71\%$) eine langsamere Diffusion in flüssig-geordneten Phasen. N_{Gesamt} 18 FCS-Messungen in 10 GUVs.

Abbildung 5.18 zeigt typische Autokorrelogramme von FCS-Messungen mit *Bodipy FL-SM* in L_D/L_O -phasenseparierten GUVs. Das Sphingolipid diffundierte in der flüssig-

ungeordneten Phase mit $4,1 \pm 0,33 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und in der flüssig-geordneten Phase mit $0,9 \pm 0,14 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Auch *Bodipy FL-GM1* und β -*Bodipy C₁₂-HPC* besaßen sehr ähnliche Diffusionskonstanten in phasenseparierten GUVs. Das Gangliosid (siehe Abbildung 5.19) diffundierte mit $4,2 \pm 0,28 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in der L_D - und $1,0 \pm 0,21 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in der L_O -Phase.

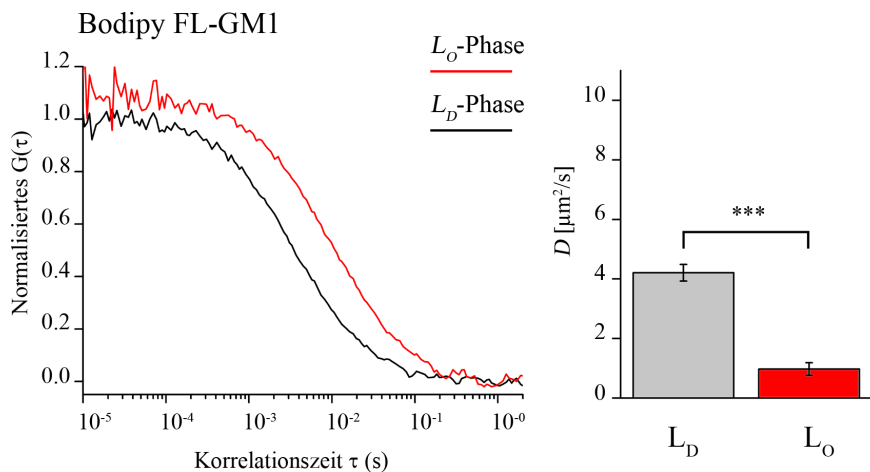


Abbildung 5.19: Ergebnis der FCS-Messungen mit *Bodipy FL-GM1* in L_D/L_O -phasenseparierten GUVs. Schwarze, normalisierte ACFs repräsentieren Messungen in der L_D -Phase, rote, normalisierte Kurven wurden in der L_O -Phase gemessen. Die Balkendiagramme geben $\bar{D} \pm CI_x$ der ermittelten Werte für Messungen in L_D - (grau) und L_O -Phase (rot) an. *Bodipy FL-GM1* zeigte mit sehr hoher statistischer Signifikanz ($P=99,71\%$) eine langsamere Diffusion in flüssig-geordneten Phasen. $N_{\text{Gesamt}} = 19$ FCS-Messungen in 10 GUVs.

Das Phospholipid (siehe Abbildung 5.20) besaß eine Diffusionskonstante von $4,3 \pm 0,69 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in der L_D - und $1,0 \pm 0,21 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in der L_O -Phase. Damit waren die Diffusionszeiten von *Bodipy FL-SM*, *Bodipy FL-GM1* und β -*Bodipy C₁₂-HPC* unabhängig vom Molekulargewicht und dem chemischen Charakter gleich groß. Signifikante Unterschiede ließen sich nur für das jeweilige Lipid beim Vergleich der Diffusion zwischen der L_O - und der L_D -Phase feststellen.

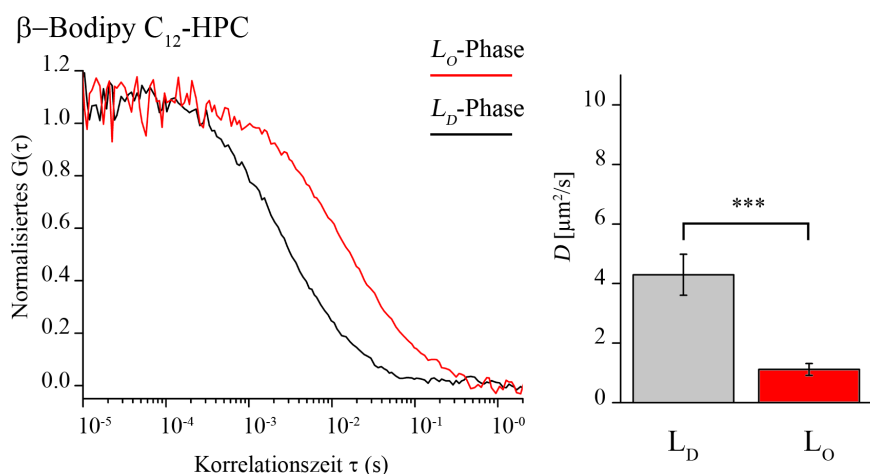


Abbildung 5.20: Ergebnis der FCS-Messungen mit β -Bodipy C_{12} -HPC in L_D/L_O -phasenseparierten GUVs. Schwarze, normalisierte ACFs repräsentieren Messungen in der L_D -Phase, rote, normalisierte Kurven wurden in der L_O -Phase gemessen. Die Balkendiagramme geben $\bar{D} \pm CI_x$ der ermittelten Werte für Messungen in L_D - (grau) und L_O -Phase (rot) an. β -Bodipy C_{12} -HPC zeigte mit sehr hoher statistischer Signifikanz ($P=99,71\%$) eine langsamere Diffusion in flüssig-geordneten Phasen. $N_{\text{Gesamt}} = 23$ FCS-Messungen in 12 GUVs.

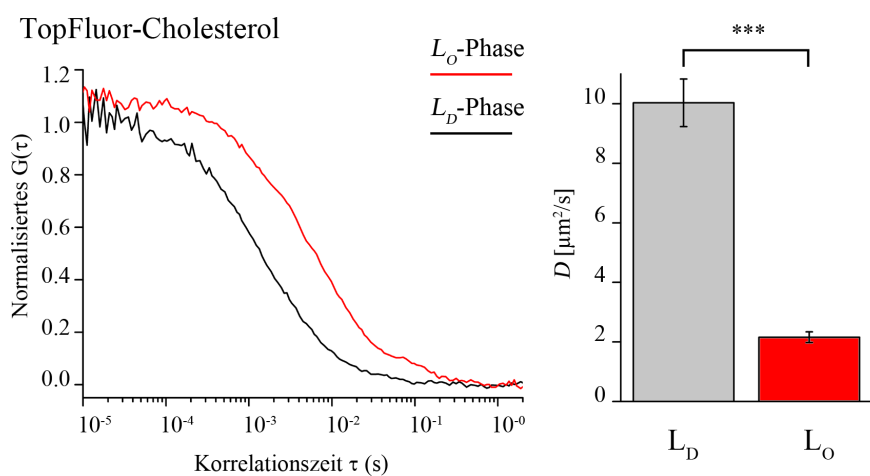


Abbildung 5.21: Ergebnis der FCS-Messungen mit *TopFluor-Cholesterol* in L_D/L_O -phasenseparierten GUVs. Schwarze, normalisierte ACFs repräsentieren Messungen in der L_D -Phase, rote, normalisierte Kurven wurden in der L_O -Phase gemessen. Die Balkendiagramme geben $\bar{D} \pm CI_x$ der ermittelten Werte für Messungen in L_D - (grau) und L_O -Phase (rot) an. *TopFluor-Cholesterol* zeigte mit sehr hoher statistischer Signifikanz ($P=99,71\%$) eine langsamere Diffusion in flüssig-geordneten Phasen. $N_{\text{Gesamt}} = 14$ FCS-Messungen in 7 GUVs.

Abbildung 5.21 stellt die Ergebnisse der FCS-Messungen von *TopFluor-Cholesterol* in L_D/L_O -phasenseparierten GUVs dar. Cholesterol hatte mit $10 \pm 0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in der L_D - und $2,2 \pm 0,18 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in der L_O -Phase eine deutlich schnellere Diffusion als die bisher getesteten Sphingo- und Phospholipide sowie Ganglioside. Der Vergleich zwischen der L_D - und der L_O -Phase zeigte eine signifikant schnellere Diffusion in der ungeordneten Phase. Das getestete amphipatische Molekül *DiIC₁₈(7)* war wie in Abbildung 5.17 zu sehen, nur in der L_D -Phase detektierbar. Deshalb konnte die Diffusion nur in dieser Phase bestimmt werden. Wie in Abbildung 5.22 zu sehen betrug die Diffusionskonstante $6,8 \pm 0,36 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Damit war die Diffusion in dieser Phase etwas schneller als die des Sphingo- und des Phospholipids sowie des Gangliosids.

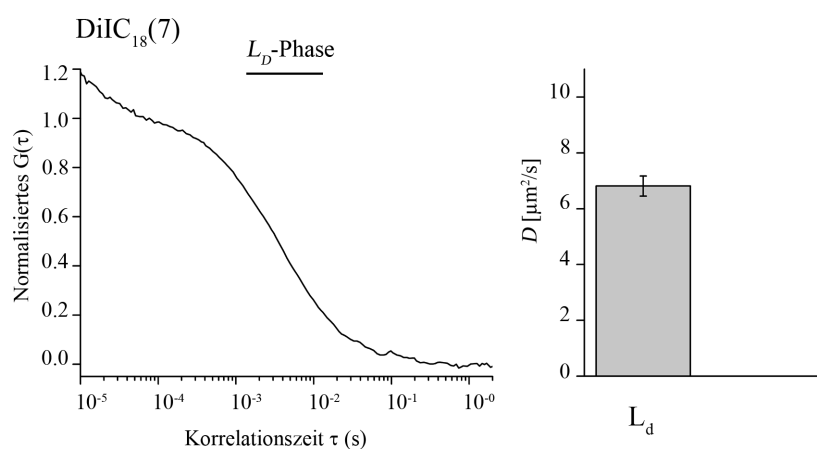


Abbildung 5.22: Ergebnis der FCS-Messungen mit *DiIC₁₈(7)* in L_D/L_O -phasenseparierten GUVs. Schwarze, normalisierte ACF repräsentieren Messungen in der L_D -Phase. Das Molekül separierte fast ausschließlich in diese Phase, weshalb in der L_O -Phase keine Messungen durchgeführt werden konnten. Die Balkendiagramme geben $\bar{D} \pm CI_x$ der ermittelten Werte für Messungen in L_d -Phase an. $N_{\text{Gesamt}} = 7$ FCS-Messungen in 7 GUVs.

Abbildung 5.23 fasst alle der durch FCS-Messungen ermittelten Diffusionskonstanten in phasenseparierten GUVs zusammen. Tabelle 5.2 zeigt die durch FCS-Messungen ermittelten Parameter aller Messungen an GUVs.

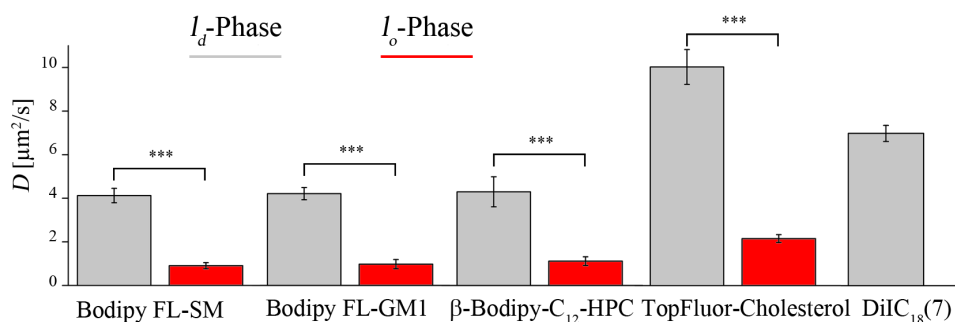


Abbildung 5.23: Vergleich der durch FCS ermittelten Diffusionskonstanten in L_d - (grau) und L_o -Phase (rot) von GUVs. Gezeigt sind Mittelwerte mit dem Konfidenzintervall (P=95 %) als Fehlerbalken.

	\bar{D}	σ_x	CI_x	Partikelanzahl	σ_x	CI_x	Korrelationsamplitude	N
SM L_D	4,1	0,37	0,33	145,9	133,6	109	1,013	8
SM L_O	0,9	0,22	0,14	71,7	58,9	41,5	1,02	10
GM1 L_D	4,2	0,4	0,28	48	23	16,2	1,027	10
GM1 L_O	1	0,28	0,21	35,9	25,9	19,6	1,052	9
PC L_D	4,3	1,07	0,69	57,9	37,7	23,7	1,023	12
PC L_O	1,1	0,34	0,2	12,3	7,2	4,8	1,112	11
Cholesterol L_D	10	0,9	0,8	62,1	11,5	10,3	1,016	7
Cholesterol L_O	2,2	0,24	0,18	33,9	7,3	6,6	1,031	7
DiIC ₁₈ (7) L_D	6,8	0,41	0,36	2,7	1,1	1	1,446	7

Tabelle 5.2: Tabellarische Darstellung der aus FCS-Messungen ermittelten Diffusionskonstante \bar{D} , der Partikelanzahl, der Korrelationsamplitude sowie der Anzahl der Messungen N mit Angaben der Standardabweichung σ_x und dem 95 % Konfidenzintervalls CI_x für \bar{D} bei Messungen an phasenseparierten GUVs.

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im diesem Versuchsteil wurde die Diffusion von fluoreszenzmarkierten Phospholipiden (β -Bodipy C_{12} -HPC), Mikrodomänen-assoziierten Lipiden (Bodipy FL-SM, Bodipy FL-GM1 & TopFluor-Cholesterol) und synthetischen, amphipatischen Molekülen (DiIC₁₈(7)) in zellulären Plasmamembranen und Modellmembranen mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) untersucht. Die Diffusion der Lipide wurde in zellulären Fokaladhäsionen und nicht-adhären PM-Bereichen von Myofibroblasten sowie in der L_D - und L_O -Phase von phasenseparierten, unilamellaren Riesenvesikeln bestimmt.

Primäre, kardiale Myofibroblasten wurden aus Rattenembryonen isoliert. Dieser Zelltyp verfügte über ausgeprägte Fokaladhäsionen (FAs). Die Position von FAs wurde mittels Interferenz-Reflexions-Mikroskopie (IRM) bestimmt. Die Lokalisation und Morphologie

von FAs in IRM-Aufnahmen wurde durch eine Transfektion mit *GFP-Vinculin* in einem ersten Experiment bestätigt. Die fluoreszenzmarkierten Lipide wurden durch kombinierte FLs in einem für FCS-Messungen optimalen Konzentrationsbereich in die PM interkaliert. Anschließend wurden FCS-Messungen jeweils in FAs sowie in nicht-adhärirten Membranbereichen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass *Bodipy FL-SM* ($1,33 \pm 0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ außerhalb & $1,02 \pm 0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ innerhalb FAs) und *Bodipy FL-GM1* ($0,97 \pm 0,14 \mu\text{m}^2/\text{s}$ außerhalb & $0,76 \pm 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ innerhalb FAs) in zellulären FAs eine signifikant verlangsamte Diffusion im Vergleich zu nicht-adhärirten Membranbereichen besaßen. *TopFluor-Cholesterol* ($3,74 \pm 0,56 \mu\text{m}^2/\text{s}$ außerhalb & $3,71 \pm 0,46 \mu\text{m}^2/\text{s}$ innerhalb), β -*Bodipy C₁₂-HPC* ($1,72 \pm 0,34 \mu\text{m}^2/\text{s}$ außerhalb & $1,51 \pm 0,27 \mu\text{m}^2/\text{s}$ innerhalb) und *DiIC₁₈(7)* ($3,42 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ & $3,41 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ innerhalb) zeigten dagegen keine signifikant verlangsamte Diffusion in FAs. Beim Vergleich der Diffusionskonstanten in nicht-adhärirten Membranen wurde deutlich, dass das Gangliosid GM1 insgesamt die langsamste Diffusion besaß. Auch *Bodipy FL-SM* diffundierte vergleichsweise langsamer als das strukturell annähernd identische β -*Bodipy C₁₂-HPC*. *DiIC₁₈(7)* und *TopFluor-Cholesterol* hatten die höchsten Diffusionskonstanten. Bei Analysen der Partikelzahl im Vergleich zwischen FA und nicht-adhärirter Membran konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Um den Einfluss der höheren Membranordnung in FAs auf die Diffusion der Lipide untersuchen zu können, wurden flüssig-geordnete/flüssig-ungeordnete (L_O/L_D) phasenseparierte Riesenvesikel hergestellt. Dadurch konnte untersucht werden, inwieweit die in Modellmembranen wohl etablierte L_O/L_D Phasenseparation zur Erklärung der in Zellmembranen beschriebenen Mikrodomänen dienen kann. Hier zeigte sich, dass alle untersuchten Lipide in der L_O -Phase eine langsamere Diffusion als in der L_D -Phase besaßen. Anhand der Versuche konnte der Einfluss der höheren Membranordnung in Fokaladhäsionen, also die Anwesenheit einer flüssig-geordneten Domäne, als alleiniger Grund für die beobachtete, langsamere Diffusion von Sphingomyelin und GM1 widerlegt werden.

6 Generelle Diskussion

6.1 Diskussion über FLs als geeignetes Lipid-Interkalationssystem

In dieser Arbeit wurde eine neuartige Methode verwendet, um biologisch relevante, fluoreszenzmarkierter Lipide effizient in Membranen lebender Zellen interkalieren zu können. Der Hauptvorteil dieser kombinierten, fusogenen Liposomen ist die kontrollierte Interkalation fluoreszenzmarkierter Moleküle über einen großen Konzentrationsbereich. So kann das biologisch irrelevante, synthetische *DiIC₁₈(7)* die Membranfusion auslösen, während das biologisch relevante Ziel-Lipid in seiner Konzentration frei wählbar ist. Diese kombinierten Liposomen wurden erstmals 2010 in meiner Diplomarbeit vorgestellt [98]. In diesem Teil der vorliegenden Doktorarbeit wurden biologisch relevante Lipide interkaliiert und deren intrazelluläre Verteilung analysiert, um einen möglichen Einfluss des Systems auf die intrazelluläre Lokalisation der getesteten Lipide untersuchen zu können. Die Effizienz des Systems wurde mit der einer konventionellen, proteinbasierten Interkalationsmethode verglichen. Des Weiteren wurde getestet, ob fusogene Liposomen potenziell zytotoxische Eigenschaften besitzen.

Vergleich der kombinierten, fusogenen Liposomen mit FLs mit einer fluoreszenzmarkierten Komponente

Die Fusion zwischen Liposomen- und Plasmamembran basiert auf der Nutzung positiv geladener Liposomen, welche fluoreszenzmarkierte Lipide und/oder amphipatische, fluoreszierende Moleküle in einem Konzentrationsbereich von 2-5 mol% beinhalten. Da der Fusionsmechanismus zum Zeitpunkt der Experimente nicht aufgeklärt war, stellten Cisar et al. in ihrer Erst-Veröffentlichung 2010 eine Hypothese zum Fusionsmechanismus auf. Moleküle mit delokalisiertem π -Elektronensystem sollen demnach in der Lage sein, mit den starken positiven Ladungen in der Kopffregion der Liposomen zu interagieren und temporäre Dipol-Momente auszubilden. Diese Dipole können möglicherweise lokale Störungen in einer Lipiddoppelschicht hervorrufen und so die Fusion mit der Plasmamembran ermöglichen [37]. Dabei ist genau das Verhältnis aus positiv geladenen Lipiden

(*DOTAP*), neutral geladenen Lipiden (*DOPE*) und den aromatischen Gruppen (Fluorophore) entscheidend. Nach Fusion verschmelzen FLs schnell mit der PM und machen diese somit für fluoreszenzbasierte Mikroskopiemethoden sichtbar. Obwohl nur das fluoreszenzmarkierte Molekül detektierbar ist, werden mit großer Wahrscheinlichkeit auch die übrigen Komponenten des Liposoms in die Membran interkaliert. Mit dem von Csiszar et al. vorgestellten System wurde die Fusionsfähigkeit diverser Fluorophore bewiesen. Allerdings verwendeten die Autoren nur Phosphoethanolamin sowie Phosphatidylcholin als Trägerlipid für die Fluorophore und trafen keine Aussagen über die intrazelluläre Verteilung der Lipide nach Interkalation. PMs tierischer Zellen wurden effizient markiert und die Membranständigkeit durch FRAP-Experimente bewiesen [37]. Kombinierte, fusogene Liposomen bieten gegenüber dem System mit nur einer fluoreszenzmarkierten Komponente den Vorteil, dass das biologisch irrelevante, synthetische *DiIC*₁₈(7) als Trägermolekül die Fusion auslöst, während das biologisch aktive Lipid in seiner Konzentration bis zur oberen Konzentration von 5 mol% frei wählbar ist. *DiIC*₁₈(7), ein lipidartiges, amphipatisches Molekül und *Bodipy FL-SM*, ein fluoreszenzmarkiertes Sphingolipid, konnten gleichzeitig in Plasmamembranen von primären Zellen und immortalisierten Zellen interkaliert werden (siehe Abbildung 3.2 & 3.3). Weiterhin konnten Phospholipide, andere Sphingo- und Glycosphingolipide und Cholesterol-Derivate zusammen mit *DiIC*₁₈(7) erfolgreich in Plasmamembranen tierischer Zellen über FLs interkaliert werden. Das Trägermolekül wird, wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, innerhalb 24 h komplett aus der PM entfernt und reichert sich im Endomembransystem an, wo es zu einem lysosomalen Abbau kommt. Durch Verwendung kombinierter Liposomen können demnach auch niedrige Konzentrationen realisiert werden, was für sensitive Analysemethoden wie die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie unabdingbar ist [145].

Effizienz der Interkalation durch FLs im Vergleich zur konventionellen, proteinbasierten Methode

Die Effizienz der von Pagano et al. 1985 vorgestellten Interkalationsmethode, bei der fluoreszenzmarkierte Lipide an Rinderserum-Albumin (BSA) komplexiert werden, wurde mit der Interkalation über FLs verglichen. Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, konnte fluoreszenzmarkiertes Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol-Bisphosphat sowie das Gangliosid GM1 wesentlich effizienter in zelluläre Membranen interkaliert werden. Man beachte, dass jede Probe mit exakt der gleichen absoluten Menge fluoreszenzmarkierter Lipide inkubiert wurde. Dadurch konnte die herausragende Effizienz des Systems eindeutig bewiesen werden. Proben, inkubiert mit Lipid/BSA-Komplexen waren bei den verwendeten Konzentrationen fluoreszenzmarkierter Lipide in cLSM-Aufnahmen nicht detektierbar, während mit FLs inkubierte Zellen stark markierter Membranen besaßen.

Einzig das getestete Ceramid wird aufgrund der ungewöhnlich hohen Hydrophilität auch ohne aufwendige Interkalationsmethode sehr schnell von Zellen internalisiert [165]. Dabei ist es auch ohne Transfermethode oder komplexiert an BSA, wie in Abbildung 3.5 zu sehen, im GA und ER mit gleichen Intensitätsverteilungen lokalisiert. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass das hier vorgestellte System eine schonende Methode der Interkalation im Vergleich zur konventionellen Lipid/BSA-Komplex-Methode darstellt. Aus der Literatur ist bekannt, dass insbesondere der Sphingolipid-Metabolismus durch externe Stressfaktoren stark beeinflusst werden kann [54]. Daher ist die Vermeidung extrazellulären Stresses, wie beispielsweise Temperaturschocks, bei Studien zu Sphingolipiden von besonderer Wichtigkeit. Bei der Interkalation über Lipid/BSA-Komplexe müssen die Zellproben für mindestens 30 min bei 4°C inkubiert und danach auf 37°C erwärmt werden, um die endozytotische Aufnahme der Komplexe zu gewährleisten. Die Interkalation mit FLs erfolgt dagegen durchgehend bei 37°C und die Fusion ist nach 8-10 min komplett erfolgt. Potenziell zytotoxische oder sich negativ auf die Mitoserate auswirkende Effekte konnten, wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, bei mit FLs behandelten Proben nicht beobachtet werden.

Intrazelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach Interkalation über FLs

Die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Moleküle in der PM deutet auf eine Interaktion der interkalierten Moleküle mit zellulären Membrankomponenten hin. Beispielsweise interagieren Lipide mit freien Hydroxylgruppen, wie Sphingolipide oder Cholesterol (vergleiche Strukturen in Kapiteln 2.2.3 & 2.2.4) stärker mit Membrankomponenten als Phospholipide oder synthetische, amphipatische Moleküle ohne OH-Gruppe [112]. Diese Interaktionen können die Ausbreitungs- und Verteilungsgeschwindigkeit unmittelbar nach Fusion erheblich beeinflussen, wie in dieser Arbeit bei der mikroskopischen Analyse der Fusionskinetik festgestellt wurde (siehe Abbildung 3.2). Auch auf nanoskopischer Ebene konnte die starke Interaktion von Sphingolipiden mit anderen Membrankomponenten aufgrund transients Wasserstoffbrückenbildung nachgewiesen werden [127]. Diese Wechselwirkung auf molekularer Ebene beeinflusst die Persistenz neu interkalierter Moleküle nicht nur auf kurzen Zeitskalen, wie bei der Membranfusion zwischen FL und PM, sondern die in dieser Arbeit verwendeten Lipide mit freien Hydroxylgruppen zeigen eine deutlich längere Lokalisierung in der PM (über einen Beobachtungszeitraum von 48 h) als Moleküle ohne diese Gruppen. Vergleicht man zum Beispiel die Membranpersistenz von Sphingomyelin (SM) mit $DiIC_{18}(\gamma)$, konnte deutlich gezeigt werden, das SM über mehrere Tage in der PM lokalisiert ist, während das amphipatische, synthetische Molekül bereits nach einigen Stunden aus der PM verschwunden ist (siehe Abbildung 3.3).

Obwohl die Detektion der Fluoreszenz Analysen über mehrere Tage ermöglichte, darf der zelluläre Metabolismus bei derartigen Studien nicht außer Acht gelassen werden. Es können enzymatisch bedingte, strukturelle Veränderungen an den interkalierten Molekülen auftreten, welche den Fluorophor unbeeinflusst lassen, das Molekül aber grundlegend verändern [54]. Letztendlich betrifft der zelluläre Lipidmetabolismus nicht nur die in dieser Arbeit vorgestellte Methode, sondern ebenso alle anderen Experimente und Methoden mit fluoreszenzmarkierten Lipiden. So konnte von fluoreszenzmarkierten Ceramid nach Interkalation über Lipid/Protein-Komplexe eine metabolische Umwandlung zu PM-ständigem SM und Glycosylceramid beobachtet werden [101].

Nach Lipidinterkalation benötigen die angesprochenen zellulären Prozesse eine gewisse Zeit, um die neuen Moleküle zu erkennen und sie gemäß ihrer biologischen Funktion und chemischen Beschaffenheit in entsprechende Kompartimente zu sortieren. Wenn der gekoppelte Fluorophor die Eigenschaften des Moleküls nicht grundlegend ändert, wird das Molekül folglich zu seinem zellulären Bestimmungsort transportiert. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete, kettenmarkierte Ceramid wird nach Transfer über FLs hauptsächlich im GA, dem primären Speicherort für Ceramide, und dem ER, dem Syntheseort, angereichert (siehe Abbildung 3.5).

Obwohl SM oder Ganglioside auch zu den Sphingolipiden zählen, unterscheiden sie sich deutlich in ihrer Kopfgruppe (vergleiche Strukturen in Kapitel 2.2.3). Fluoreszenzmarkiertes SM und GM1 besitzen, im Gegensatz zu Ceramid, ohne ein spezielles Interkalationssystem eine sehr geringe Aufnahmezeit. Mit Hilfe von FLs konnte SM erfolgreich in die PM unterschiedlicher Zelltypen interkaliert werden. Der Hauptteil des Signals blieb über 48 h PM-ständig, während zusätzlich deutlich der GA entsprechend der zellulären Lokalisation endogenen SMs markiert war [131, 54] (siehe Abbildung 3.3 0,5 h). Aufgrund der hohen Hydrophobizität und der Tatsache, dass *Bodipy FL-SM* nicht ohne spezielle Transfermethode in Plasmamembranen interkaliert werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass der schnelle Transport zum GA durch SM-Transporterproteine erfolgt [54].

Neben Sphingolipiden konnten auch Glycerophospholipide erfolgreich in zelluläre Membranen mit Hilfe von FLs transferiert werden. Das kettenmarkierte β -*Bodipy FL-C₁₂HPC* reichert sich erst in der PM an und wurde danach sehr schnell zum GA und ER transferiert, wie von den Autoren beschrieben wird [157, 71]. Dieses Lipid könnte von Phospholipid-spezifischen Transportern erkannt und transportiert werden [15]. Ähnlich zum Phospholipid könnte auch das Phosphatidylinositol-Biphosphate (*Topfluor-PIP2*) von zellulären, Phosphatidylinositol-spezifischen Transferproteinen erkannt und zum ER transportiert werden [30].

Um das ubiquitäre Intekalationspotenzial fusogener Liposomen zu veranschaulichen, wurden zwei fluoreszenzmarkierte Cholesterol-Derivate interkaliert. *Topfluor-Cholesterol* ist

an der kurzen Seitenkette mit dem *Bodipy*-Fluorophor markiert (vergleiche Struktur in Kapitel 2.2.4). Dieser Fluorophor besitzt einen relativ hydrophoben Charakter und eine kleine Größe. Dennoch ist das fluoreszenzmarkierte Cholesterol um ca. 50 % größer als die natürliche Variante. Trotzdem konnte eine ähnliche zelluläre Verteilung von *TopFluor-Cholesterol* verglichen mit den Beobachtungen von Hao *et al.* zu Dehydroergosterol, dem wahrscheinlich besten Cholesterol-Derivat, beobachtet werden [67]. Die Autoren beobachteten eine Verteilung von Ergosterol zwischen PM (dem Anreicherungsort), endozytotischen Vesikeln (dem Transportsystem) und dem ER (dem Syntheseort). In dieser Arbeit konnte ebenfalls diese Verteilung beobachtet werden (siehe Abbildung 3.6). Das zusätzliche, vesikuläre Signal sollte hier eher dem endozytotischen Transportsystem als dem lysosomalen Abbau zugeordnet werden (vergleiche Abbildung 3.1 & 3.6). Wie von Hao *et al.* beschrieben, wird Ergosterol in Endozytosevesikeln zwischen GA und PM transportiert. Aufgrund der ähnlichen Signalverteilungen kann in dem vorliegenden Ergebnisteil ebenfalls von einer Anreicherung in Endozytosevesikeln ausgegangen werden. Der fluoreszenzmarkierte Cholesteryl-Ester ist an der Hydroxylgruppe des Cholesterols mit einer langen Fettsäurekette (C₁₁) verestert (siehe Struktur in Kapitel 2.2.4). Die biologische Funktion solcher Cholesteryl-Ester ist die Speicherung überschüssigen zellulären Cholesterols. Aufgrund der konischen Struktur passt dieses Molekül räumlich nicht in eine Lipiddoppelschicht, sondern bildet sogenannte zytoplasmatische Lipidtröpfchen [120]. Der *Bodipy*-Fluorophor verändert zwar maßgeblich die konische Form des natürlichen Moleküls, dennoch scheint die zelluläre Lokalisation unbeeinflusst. *Bodipy-Cholesteryl ester* wurde unmittelbar nach Interkalation von der PM in lysosomale Strukturen transportiert, wahrscheinlich in die genannten zytoplasmatischen Lipidtröpfchen. Diese Daten deuten darauf hin, dass fusogene Liposomen mit *DiIC₁₈(7)* als Trägerlipid die Verteilung und das Verhalten der interkalierten, biologisch relevanten Moleküle nicht negativ beeinflusst. Sie können sich frei über zelluläre Membranen bewegen und ihre Verteilung wird durch zelluläre Prozesse kontrolliert.

6.2 Diskussion der Fusionsanalyse durch den systematischen Austausch der fusionsvermittelnden Lipide

Fusogene Liposomen (FLs) stellen ein neuartiges System zur zellulären Interkalation fluoreszenzmarkierter Lipide dar. Es wurde 2009 von Csiszar *et al.* am ICS-7 entwickelt [37] und maßgeblich durch Arbeiten, welche in der vorliegenden Dissertation beschrieben sind, weiterentwickelt.

Um mit der PM von Zellen fusionieren zu können, vermuteten Csiszar *et al.* [37] und Kleusch *et al.* [99], dass fusogene Liposomen aus einem neutralen Lipid, einem positiv

geladenen Lipid sowie einem Molekül mit aromatischen Gruppen bestehen müssen. Das neutrale und positiv geladene Lipid sollten äquimolar vorliegen, wobei das aromatische Molekül mit etwa 5 mol% bezogen auf den Gesamtlipidgehalt beinhaltet sein muss. Dabei ist die kritische Zusammensetzung für die Fusion bis dato unaufgeklärt. Aus diesem Grund wurden systematisch die Lipidkomponenten der FLs ausgetauscht und durch Lipide mit anderen Eigenschaften ersetzt. Die Analyse erfolgte zum einem mikroskopisch, um die intrazelluläre Verteilung nach Inkubation mit verschiedenen Liposom-Typen qualitativ beschreiben zu können und zum anderen mittels Durchflusszytometrie, um die Fusionseffizienz quantitativ analysieren zu können.¹

Die ursprüngliche Lipid-Mischung, beschrieben in [37], bestand aus *DOPE/DO TAP/Lipid*_{fluoreszent} in einem molaren Verhältnis von 1/1/0,1. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, konnten drei verschiedene Zustände, abhängig von der Zusammensetzung der Liposomen, beobachtet werden. Trotz der postulierten Zusammensetzung aus neutralem, positiv geladenen und Aromat-haltigen Lipid wurden Lipidmischungen gefunden, welche nicht zur Membranfusion führten. Im Falle von nicht-fusogenen Liposom-Varianten erfolgte zum Beispiel bei *DAPC*-haltigen Liposomen gar keine zelluläre Aufnahme. Des Weiteren konnte es zu einer endozytotischen Aufnahme einiger Liposomen-Varianten kommen. Dabei waren nicht alle submikroskopisch kleinen Punkte in cLSM-Aufnahmen Endozytose-vesikel, sondern einige waren nicht-fusionierte Liposomen, welche später endozytotisch aufgenommen wurden. Insbesondere endozytotisch aufgenommene Liposomen waren durch das hohe Excimer-Signal des *Bodipy*-Farbstoffes, welches bei lokal sehr hohen Konzentration des Fluorophors auftritt, im cLSM und Durchflusszytometer gut sichtbar. Bei fusogenen Liposom-Varianten kam es, bedingt durch die Membranfusion, zu einer gleichmäßigen Verteilung des fluoreszenzmarkierten Lipids in der PM. Dadurch war das Monomer-Signal des *Bodipy*-Fluorophores im cLSM sowie Durchflusszytometer sehr intensiv, da der Farbstoff homogen in der Membran verteilt war. Das Excimer-Signal solcher Liposom-Varianten war wesentlich niedriger und in cLSM-Aufnahmen fast nicht sichtbar. Somit bot diese kombinierte Analyse mittels Durchflusszytometer und cLSM ein optimales und neuartiges System zur Untersuchung verschiedener, liposomaler Aufnahmewege.

Liposomen aus zwei Komponenten: Neutrales & fluoreszenzmarkiertes Lipid sowie positiv-geladenes & fluoreszenzmarkiertes Lipid

Um den Einfluss der einzelnen, fusionsvermittelnden Lipide untersuchen zu können, wurden die Komponenten reduziert, in dem jeweils das neutrale beziehungsweise positiv geladene Lipid bei Präparation von Liposomen weg gelassen wurde. Die Abbildungen 4.3 und 4.8 zeigen die Ergebnisse der cLSM- und Durchflusszytometer-Analyse. Es konnte gezeigt

¹Die Strukturformeln aller verwendeten Lipide sind in den Kapiteln 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 & 2.2.4 zu sehen.

werden, dass Liposomen, welche nur aus dem neutralen Helferlipid sowie 5 mol% fluoreszenzmarkiertes Lipid bestanden, nicht mit PMs fusionierten und es ebenfalls zu keiner endozytotischen Aufnahme kam. Die Liposomen sedimentierten nach Zugabe nicht auf die Zell- oder Glasoberfläche, sondern wurden beim Waschschrift entfernt. Dabei konnte kein Unterschied zwischen Helferlipiden mit Phosphoethanolamin (*DOPE* & *DMPE*)- oder Phosphatidylcholin-Kopf (*DMPC*) festgestellt werden. Liposomen, welche nur aus *DOPE* hergestellt wurden, sollten durch die oben beschriebene Phasenumwandlung in der Lage sein, mit Membranen zu fusionieren, da das Lipid eine kleine Kopfgruppe und ungesättigte Fettsäureketten besitzt. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit die beschriebene, potenzielle Fusogenität solcher Liposomen [35] nicht bestätigt werden.

Alle getesteten Varianten von Liposomen aus positiv geladenen Lipiden und einem fluoreszenzmarkierten Lipid waren in der Lage, mit PMs zu fusionieren. Beim Vergleich der Fusionseffizienz wurde deutlich, dass das vergleichsweise große *DOEPC*, welches an der Phosphatgruppe eine zusätzliche Ethylgruppe hat, die niedrigste Fusionseffizienz besaß. Mit *DOTAP* und *DOTMA*-haltigen Liposomen konnte in beiden Fällen eine 100 %ige Fusionseffizienz erreicht werden. Dabei war das Fluoreszenzsignal der mit *DOTMA* behandelten Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse etwas stärker. Die Kopfgruppe des synthetischen *DOTMA* ist kleiner als *DOTAP* und verfügt nicht über die bei biologisch relevanten Lipide typischen Carbonyl-Gruppen am Glycerin-Rückgrat. Dieser strukturelle Unterschied schien die Fusion zu begünstigen. Es ist möglich, dass *DOEPC* L_{α} -Strukturen begünstigt, während *DOTAP* und *DOTMA* eine Fusionsintermediarstruktur, wie kubische oder invers-hexagonale Phase, ermöglichen. Ob es tatsächlich zur Ausbildung dieser Phasen kommt, könnte durch Röntgendiffraktometrie untersucht werden. Eine Fusion mit ausschließlich positiv geladenen Liposomen war sehr stark und es konnten, vielleicht aufgrund der großen Anzahl positiv geladener Lipide in der Membran, bei einigen Zellen nach Fusion Membranausstülpungen beobachtet werden (siehe Abbildung 4.9 am Beispiel *DOTAP/Bodipy FL-DHPE*).

Vergleicht man die Ergebnisse der aus zwei Komponenten bestehenden neutralen beziehungsweise positiv geladenen Liposomen-Varianten, wird deutlich, dass die positive Ladung für die Fusion notwendig ist. Neutrale, *DOPE*-haltige Liposomen sind in der Lage, Trans-Monoschicht-Kontakte zu bilden, welche sehr wahrscheinlich die Vorstufe zu einer Fusionspore darstellen [150, 149]. Da bei *DOPE*-Liposomen in meinen Experimenten keine Fusion sowie zelluläre Aufnahme beobachtet werden konnte, ist die positive Ladung für die Fusion essentiell. Von Csizsar et al. wurde postuliert, dass positiv geladenes Lipid und das delokalisierte Elektronensystem der aromatischen Gruppen im Fluorophor miteinander wechselwirken müssen, wobei lokale Dipole entstehen, welche zu Instabilität in den Membranen führen können. [37]. Zusätzlich entsteht bei Verdünnung im Zellkulturmedium bei Zugabe der Liposomen durch den osmotischen Schock (fusogene

Liposomen werden in 20 mM HEPES-Puffer geschwollen) wie von Anton Hördt beschrieben eine Überschußoberfläche [77]. Diese Liposomen zeigen besonders stark adhärenente Eigenschaften auf einer negativ geladenen Oberfläche. Bei den hier beschriebenen fusogenen Liposomen muss sich ein Fusions-Intermediärzustand ausbilden können. Dies könnte durch kalorimetrische Analysen zur Phasenumwandlung fusogener Lipidmischungen untersucht werden. Zur Ausbildung des Fusions-Intermediärzustandes könnte eine dichtere Membranpackung sowie eine inverse Membrangeometrie von Vorteil sein, da dort eine Wechselwirkung zwischen positiver Ladung und aromatischer Gruppe begünstigt wäre.

Einfluss der Kopfgruppe des neutralen Lipids auf die Fusogenität

In Variationen von ternären Lipidmischungen aus neutralem, positiv geladenem sowie fluoreszenzmarkiertem Lipid zeigte sich, dass das neutrale Helferlipid einen Phosphoethanolamin-Kopf besitzen muss. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist, zeigte der Vergleich zwischen den bis auf die Kopfgruppe identischen *DMPE*- und *DMPC*-haltigen Liposomen, dass nur erstgenannte mit der PM tierischer Zellen fusionieren können. Das positiv geladene Lipid war bei beiden Liposom-Varianten *DOTAP*. Zum einen könnte die große Cholin-Kopfgruppe die Wechselwirkung zwischen positiv geladenem Lipid und den Aromaten des fluoreszenzmarkierten Lipids abschirmen, was bei PE-haltigen Liposomen nicht passieren kann.

Des Weiteren zeigen, wie von Siegel et al. beschrieben, aus Phosphoethanolamin (PE) hergestellte Liposomen bei Temperaturerhöhung eine Phasenumwandlung von einer lamellaren Lipidphase (L_α) zu einer invers-hexagonalen (H_{II})- oder invers-kubischen (Q_{II}) Phase [150, 149]. Während dieser Phasenumwandlung entstehen zwei Intermediärzustände mit niedriger Energie, der sogenannte Fusionschaft und nachfolgend der Trans-Monoschicht-Kontakt, welcher wie von den Autoren beschrieben aufreißen und eine Fusionspore bilden kann. Diese Übergangsphasen werden letztendlich durch Kräfte geleitet, welche zur Minimierung des Kontakts unpolare Bereiche der Lipidschicht mit Wasser führen. Von Jahn et al. wurde beschrieben, dass bei einer biologischen Membranfusion, beispielsweise der Verschmelzung exozytotischer Vesikel mit der Innenseite der PM, ebenfalls ein Fusionschaft sowie Trans-Monoschicht-Kontakte entstehen müssen, bevor sich eine Fusionspore bildet [83, 84]. Der Vergleich zwischen Liposomen, welche bis auf die Helferlipide völlig identisch sind, deutet bei den fusogenen, *DMPE*- oder *DOPE*-haltigen Liposomen auf einen ähnlichen Fusionsmechanismus hin.

Da fusogene Liposomen, anders als bei der biologischen Membranfusion, ohne die Hilfe von Proteinen mit PMs fusionieren können, könnte eine Phasenumwandlung von der lamellaren Lipidphase (L_α) zu einer invers-kubischen (Q_{II})- oder invers-hexagonalen (H_{II}) Phase durch die Erwärmung der Liposomen bei Zugabe zu den bei 37°C inkubierten Zellen

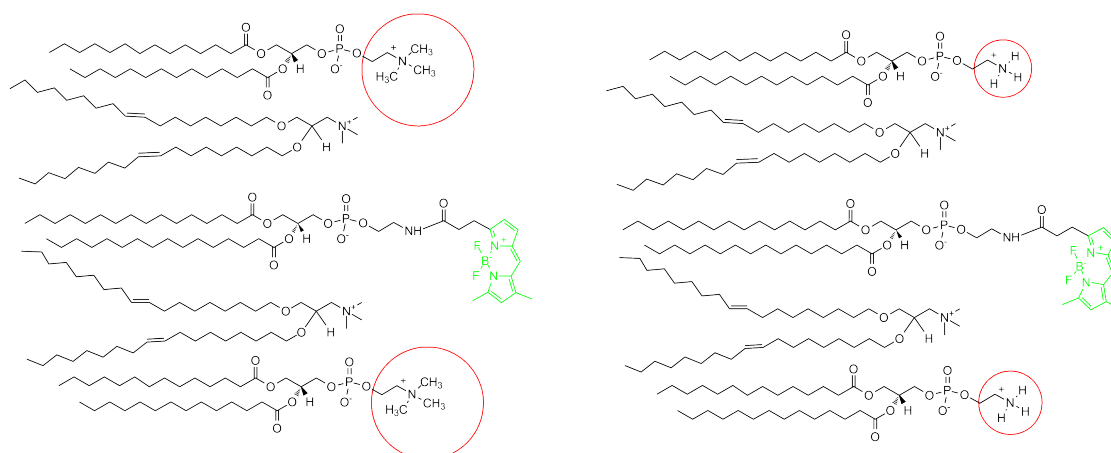


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung von *DOTMA* haltigen Membranausschnitten, welche *DMPC* (linke Seite) oder *DMPE* (rechte Seite) als neutrale Helferlipide sowie *Bodipy FL-DHPE* (in beiden Varianten) beinhalten. Die durch drei Methylgruppen sehr große Kopfgruppe des *DMPCs* (rot eingekreist) könnte eine Fusion verhindern, indem die für die Fusion postulierte, notwendige Wechselwirkung zwischen positiver Ladung und delokalisiertem Elektronensystem des Fluorophors, durch die Kopfgruppe behindert wird. *DMPE* besitzt eine viel kleinere Kopfgruppe (ebenfalls rot eingekreist), welche die Wechselwirkung ermöglichen könnte. Die These wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nur PE-haltige Liposomen fusionieren konnten.

ein Grund für die effiziente proteinfreie Membranfusion sein. Kalorimetrische Analysen an fusogenen Liposomen, durchgeführt von Anton Hördt, konnten einen exothermen Temperaturverlauf bei Erwärmung der Liposomen zwischen 20 und 50°C beobachten [77]. Da das Auftreten exothermer Umwandlungen bei Phospholipiden ungewöhnlich ist, kann dieses Phasenverhalten durch das Auftreten einer metastabilen Phase erklärt werden [45]. Bei Ausbildung der Q_{II} -Phase entstehen interlamellare Verbindungen, welche sich zu Fusionsporen umwandeln können. Somit deutet der exotherme Temperaturverlauf in kalorimetrischen Messungen sowie die alleinige Fusionfähigkeit PE-haltiger Liposomen auf das Auftreten dieser Zwischenzustände hin, welche geeignet sind, Membranfusion auszulösen. Auch bei Verwendung PC-haltiger Helferlipide mit mehrfach ungesättigten sowie gesättigten Fettsäureketten konnten keine fusogenen Liposomen erzeugt werden, wodurch der entscheidende Einfluss der PE-Kopfgruppe des Helferlipids verdeutlicht wurde.

Einfluss der Struktur des positiv-geladenen Lipids auf die Fusogenität

Durch Austausch des positiv geladenen Lipids gegen *DOEPC* beziehungsweise *DOTMA* (beide ebenfalls positiv geladen) in PE-haltigen Liposomen konnte bei allen drei Liposom-

Variationen Membranfusion beobachtet werden (siehe Abbildung 4.6). *DOEPC*-haltige Liposomen besaßen auch hier die schwächste Fusionseffizienz im Vergleich zu *DOTAP*- und *DOTMA*-haltigen Liposomen. Grund dafür könnte die Ethylgruppe des *DOEPCs* sein, welche sterisch verhindert, dass die positive Ladung in die Nähe des Aromaten kommt (ähnliches wurde auch wie oben beschrieben bei Verwendung eines PC-haltigen Helferlipids beobachtet, wobei PC-Helferlipide keine Fusion ermöglichen). Dass *DOTMA*-haltige Liposomen eine etwas bessere Fusionseffizienz als *DOTAP*-haltige Liposomen zeigten, unterstützt die These, dass positive Ladung und aromatische Gruppe räumlich eng zusammen kommen müssen. Dem *DOTMA*-Lipid fehlt die Carbonylgruppen am Glycerin-Rückgrat, welche alle anderen der verwendeten Lipide besitzen. Das Fehlen dieser Gruppen könnte die Interaktion zwischen positiver Ladung und Aromat begünstigen.

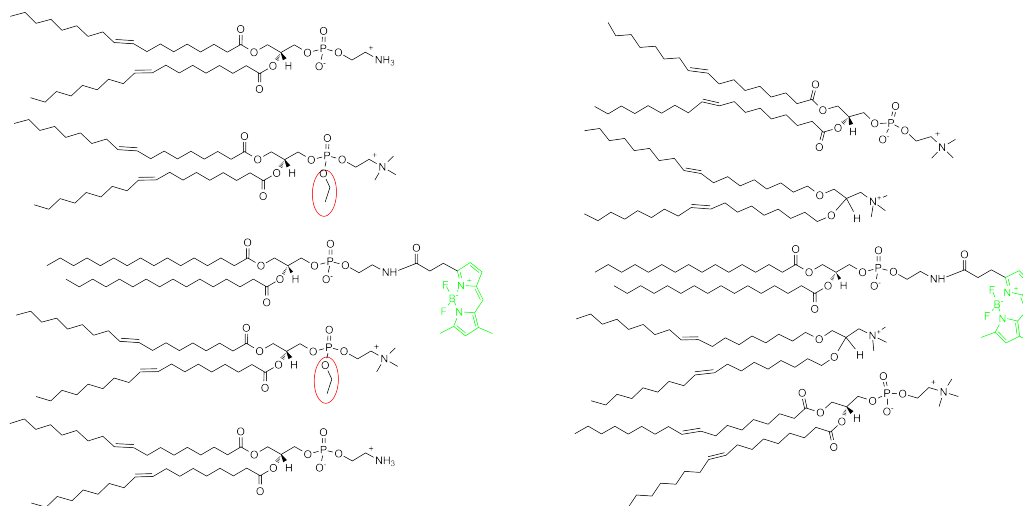


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung von *DOPE* haltigen Membranausschnitten, welche *DOEPC* (linke Seite) oder *DOTMA* (rechte Seite) als positiv geladene Lipide sowie *Bodipy FL-DHPE* (in beiden Varianten) beinhalten. Durch die Ethylgruppe (rot umkreist) des *DOEPCs* könnte eine Wechselwirkung der positiven Ladung mit den delokalisierten Elektronen des Fluorophors sterisch behindert werden. Da *DOTMA* im Vergleich viel kleiner ist und über keine abschirmenden Gruppen verfügt, wäre die Wechselwirkung in diesem Fall begünstigt.

Einfluss des Aromat-haltigen Lipids beziehungsweise Moleküls auf die Fusogenität

Die getesteten Liposomen, bei denen die Position des Fluorophores variiert beziehungsweise ein anderer Fluorophor verwendet wurde, konnten alle mit der PM fusionieren (siehe Abbildung 4.7). Zum einen wurde, statt des in den vorherigen Versuchen verwendeten, kopfmarkierten *DHPEs* ein kettenmarkiertes Lipid analysiert und Membranfusion

am cLSM und durchflusszytometrisch festgestellt. Die Position des Fluorophors terminal an der Fettsäurekette scheint eine Interaktion der aromatischen Gruppen des Fluorophors mit der positiven Ladung ebenso zu ermöglichen, wie ein an der Kopfgruppe befindlicher Fluorophor. In beiden Konfigurationen wäre ein Umklappen des Farbstoffes in Richtung der positiven Ladung möglich. Das etwas stärkere Excimer-Signal bei Verwendung des kopfmarkierten Lipids im Vergleich zum kettenmarkierten Lipid könnte durch eine nähere räumliche Anordnung der Kopfgruppen in der Membran oder durch eine andere Mikroumgebung des Fluorophors zustande kommen. Da *DiIC*₁₈(7) insgesamt nur aus zwei Fettsäureketten sowie großen Aromaten mit delokalisiertem Elektronensystem als Kopfgruppe besteht, wird auch hier die nötige Wechselwirkung ermöglicht und eine Membranfusion konnte beobachtet werden.

Obwohl der Einfluß der Konzentration der aromatischen Moleküle in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, konnte durch Arbeiten von Elena Naumovska gezeigt werden, dass eine kritische Konzentration des Aromaten von annähernd 5 mol% eingehalten werden muss. Bei niedrigeren Konzentration konnte keine Fusion beobachtet werden (bis dato unpublizierte Daten).

Durch die beschriebenen Experimente konnten wichtige Hinweise zur kritischen Zusammensetzung fusogener Liposomen gewonnen werden. Die Ergebnisse sind im Einklang mit den Untersuchungen von Anton Hördt (ehemaliger Diplomand) zur Phasenumwandlung von fusogenen Liposomen [77]. Obwohl das Fusionssystem in beiden Arbeiten mit gänzlich verschiedenen Methoden untersucht wurde, deuten die Ergebnisse meiner Arbeit und der von A. Hördt insgesamt auf die Bedeutung der Fusionsintermediärzustände (Fusions-schaft und Trans-Monoschicht-Kontakt) als Voraussetzung für eine Fusion zwischen Liposom und PM hin.

6.3 Diskussion zur Diffusion von Phospholipiden und Mikrodomänen-assoziierten Lipiden in zellulären Membranen und Modellsystemen

Fusogene Liposomen bieten ein effizientes Interkalationssystem für biophysikalische Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Membranlipiden an. Die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit untersuchten Phospholipide, Mikrodomänen-assoziierten Lipide sowie synthetischen, amphipatischen Moleküle ließen sich direkt in die Plasmamembran kardialer Myofibroblasten interkalieren. Über das in Kapitel 3 vorgestellte und verbesserte Fusionssystem ließ sich die Konzentration der fluoreszenten Lipide und Moleküle in einem für FCS-Messungen gut nutzbaren Bereich einstellen. Durch die Analyse von *Bodipy FL-SM*, *Bodipy FL-GM1*, β -*Bodipy C*₁₂-*HPC*, *TopFluor-Cholesterol* und *DiIC*₁₈(7) in ad-

härierten Myofibroblasten und phasenseparierten, unilamellaren Riesenvesikeln (*GUVs*) konnten wichtige Erkenntnisse über die Wechselwirkung dieser Lipide in Biomembranen und insbesondere in adhären Membranbereichen gewonnen werden.

Myofibroblasten wurden wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben aus Herzen von Rattenembryonen gewonnen. Da diese Isolationsmethode wie in [11] beschrieben ca. 64 % Fibroblasten und 30 % Myozyten liefert, wurden zuerst morphologische Unterschiede zwischen beiden Zelltypen untersucht. Dies geschah mit einer Antikörper- und histochemischen Färbung. Wie in Abbildung 5.1 zu sehen ist, konnten beide Zelltypen durch Markierung des Aktin-Zytoskellets und des endoplasmatischen Retikulums (ER) eindeutig voneinander unterschieden werden. Es war wichtig, dass die morphologischen Unterschiede auch ohne zusätzliche Färbung deutlich wurden. In Myozyten zeigten der Aktin-Marker und der ER-Marker eine Kolokalisation des Fluoreszenzsignals. Der Grund ist das nur bei Muskelzellen vorkommende, sarkoplasmatische Retikulum (SR), welches einen spezialisierten Bereich des ER darstellt [4]. Da Membranen des SRs die Aktinfilamente im Sarkomer umgeben, kam es zu der beobachteten Signalüberlagerung von ER- und Aktin-Marker. Im Phasenkontrast zeigten sich Myozyten kleiner und weniger rundlich mit weniger ausgestülpten Membranbereichen, wodurch in nachfolgenden Experimenten beide Zelltypen ohne spezifische Organellenfärbung im Durchlichtkanal voneinander unterschieden werden konnten.

Die Position zellulärer Fokaladhäsionen (FAs) von Myofibroblasten wurde durch Interferenz-Reflexions-mikroskopische Aufnahmen (IRM) bestimmt. In IRM-Bildern erscheinen FAs als dunkle Bereiche, da die Membran an den adhären Stellen einen besonders niedrigen Abstand zur extrazellulären Matrix (EZM) hat [81]. In Vor-Experimenten zeigte sich bereits, dass Myofibroblasten in IRM-Aufnahmen ausgeprägte, flächige Membranbereiche mit niedriger Signalintensität besitzen. Durch eine Transfektion mit GFP-Vinculin, einem FA-assoziierten Protein [183], wurde überprüft, wie die Morphologie der FAs in IRM-Aufnahmen bei Verwendung dieses Zelltyps aussieht. Abbildung 5.2 verdeutlicht, dass FAs in der gleichen Zellpopulation sehr unterschiedlich aussehen konnten. Zum einen waren ovale, ca. 0,9 bis 2 μm lange Bereiche mit GFP-Vinculin-Signal und niedriger Signalintensität im IRM-Bild zu sehen. Andere Membranbereiche hingegen waren fast flächig adhären, besaßen aber dennoch starke Vinculin-Einlagerungen und waren teilweise bis zu 20 μm lang. Bei dem kleineren FA-Typ handelte es sich aufgrund der Größe und der Vinculin-Einlagerung um FAs [57]. Der größere und flächigere FA-Typ konnte als super-reife FAs identifiziert werden [167, 75]. Da super-reife FAs in IRM-Aufnahmen schwieriger zu identifizieren waren, wurden ausschließlich normale FAs in die FCS-Analysen einbezogen. Abbildung 5.3 b) zeigt eine typische FA, in der FCS-Messungen durchgeführt werden konnten.

Für die Interkalation der fluoreszenzmarkierten Lipide sind FLs ein optimales System.

Über die Fusion konnte sichergestellt werden, dass die zu untersuchenden Moleküle zuerst in die PM der Zellen gelangen. Des Weiteren boten die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, verbesserten FLs über das fusionsvermittelnde *DiIC*₁₈(7) die Möglichkeit, die Konzentration des zu messenden Lipids für FCS-Messungen niedrig zu halten. Bei Überprüfung der intrazellulären Lokalisation nach Membranfusion konnte sichergestellt werden, dass die getesteten Lipide und amphipatischen Moleküle tatsächlich in der PM lokalisiert waren. In Abbildung 5.4 ist das Signal von *Bodipy FL-SM*, *Bodipy FL-GM1*, β -*Bodipy C*₁₂-*HPC*, *TopFluor-Cholesterol* und *DiIC*₁₈(7) nach Membranfusion in der Zellperipherie, welche besonders ausgeprägte FAs besaß und somit für FCS-Messungen interessant war, zu sehen.

Die verwendeten Lipide und amphipatischen Moleküle verhielten sich gemäß ihrer nativen Verteilung unterschiedlich. *Bodipy FL-SM* war homogen in der Zellperipherie verteilt. Es gab nur in Kernnähe intrazelluläre Einschlüße sowie, wie in Abbildung 3.5 bei einem anderen Zelltyp zu sehen, ein deutliches GA-Signal. Diese Verteilung passte sehr gut zu der in der Literatur beschriebenen Verteilung von endogenem SM, welches hauptsächlich in der äußeren Lipidschicht der PM sowie im GA als Synthese- und Speicherort vorliegt [169, 54, 131]. Hier besteht durch die Aktivität von Sphingomyelinasen, welche membrangebunden in der PM vorliegen, die Möglichkeit, durch enzymatische Spaltung der Cholin-Kopfgruppe unmittelbar nach Fusion *Bodipy FL-Ceramid* zu erzeugen, welches im ER und GA angereichert wird [169].

Bodipy FL-GM1 zeigte ein ähnliches Verteilungsbild mit homogenem PM-ständigem Signal, allerdings ohne die bei SM zu sehende Akkumulierung in Kernnähe. Diese Verteilung spiegelte auch hier die native Verteilung endogener Glykosphingolipide, hauptsächlich in der PM, wieder [39].

Auch *TopFluor-Cholesterol* war sehr homogen in der PM lokalisiert und zeigte eine Anreicherung im GA und zusätzlich kleine, sich bewegende intrazelluläre Einschlüße. Dies entsprach der nativen Verteilung von Cholesterol als strukturbildendes Molekül der PM, welche durch den hohen Cholesterolgehalt deutlich steifer wird [129]. Die Anreicherung im ER und GA sowie die intrazellulären Einschlüße bilden den Syntheseort bzw. Transportweg des Sterols zur PM ab [67].

Das Phospholipid β -*Bodipy C*₁₂-*HPC* zeigte als einziges der getesteten Moleküle kurz nach Interkalation über FLs ein deutliches, intrazelluläres Signal, lokalisiert im ER und GA. In der Zellperipherie war dennoch ein homogenes PM-Signal zu erkennen, wodurch FCS-Messungen allerdings nur in terminal-liegenden FAs durchgeführt werden konnten. Diese rasche Internalisierung entspricht der von NBD-markiertem PC, welches endozytisch zum GA transportiert wird [157]. Dabei ist zumindest im Fall von NBD-markiertem PC keine spezifische Erkennung und Transport des Lipids beschrieben. Die Anreicherung spiegelt den Transport des Großteils der über Endozytose internalisierten PM-Teile

zum GA wieder [157]. Gleiches scheint auch für β -Bodipy C_{12} -HPC zu gelten, allerdings scheint hier die Interkalation über FLs zu einer längeren PM-Ständigkeit zu führen als über die klassische, endozytotisch bedingte Interkalation über die in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Lipid/BSA-Komplexe. Der Grund für die längere Membranständigkeit könnte durch die unterschiedlichen Interkalationssysteme erklärt werden. Lipid/BSA-Komplexe werden bei der Temperaturerhöhung von 4°C auf 37°C endozytotisch aufgenommen. Derart interkalierte, fluoreszenzmarkierte Lipide gelangen somit über den Endozytoseweg ins Zellinnere und werden dabei zu den entsprechenden Kompartimenten sortiert. Über FLs interkalierte, fluoreszenzmarkierte Lipide gelangen erst in die PM und werden danach endozytotisch aufgenommen und sortiert. Das erste Kompartiment, in das sie gelangen ist somit die PM. Dort verbleibt offensichtlich ein Großteil der interkalierten Lipide, was im Fall von PC von Vorteil für FCS-Messungen in der PM war.

DiIC₁₈(7) war nach Membranfusion überaus homogen in der PM verteilt. Das synthetische, amphipatische Molekül wird mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht spezifisch erkannt, reichert sich aber durch die Internalisierung von Endozytosevesikeln sukzessive im Endomembransystem an. FCS-Messungen in der PM waren deshalb bis zu einigen Stunden nach Membranfusion problemlos möglich. Über die Fusion mit FLs konnten also alle getesteten Lipide und Moleküle für eine ausreichende Messperiode in die PM von Myofibroblasten interkaliert werden.

Die Diffusion der interkalierten Lipide wurde, wie in Abbildung 5.4 oben links zu sehen ist, in adhärirten Membranbereichen an Stellen von FAs und in nicht adhärirten Bereichen der PM mittels FCS bestimmt. Dabei war der Vergleich zwischen FA und nicht-adhärirter PM aus zwei Gründen interessant. Zum einen war über die Lipid-Diffusion in FAs bis auf eine Arbeit von Geiger 1982 wenig bekannt [56]. Dabei wurde die Diffusion eines Lipid-ähnlichen Moleküls mit FRAP untersucht, von dem eine Interkalation in die Lipiddoppelschicht nicht nachgewiesen werden konnte. Zumindest konnte gezeigt werden, dass sich die Fluoreszenzintensität zu fast 100 % erholte, was für eine mobile Lipidfraktion innerhalb zellulärer FAs spricht [56]. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode zur Studie der Lipiddiffusion war durch die zeitlich hohe Auflösung sowie das geringe Beobachtungsvolumen hervorragend für die Fragestellung geeignet. Die ermittelten Diffusionskonstanten in nicht-adhärirten Membranbereichen (SM $1,02 \pm 0,08$; GM1 $0,76 \pm 0,12$; PC $1,51 \pm 0,27$; Chol $3,71 \pm 0,46$ & *DiIC₁₈(7)* $3,1 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$; siehe auch Abbildung 5.11, graue Balken) stimmen gut mit anderen, in der Literatur gefundenen Werten, größtenteils jedoch an anderen Zelltypen und niemals unter Berücksichtigung proteinreicher und/oder adhärirter Membranbereiche, überein [9, 61, 176, 56, 109, 52]. Vergleicht man die Diffusionskonstanten der getesteten Lipide in nicht-adhärirten Membranbereichen miteinander, werden deutliche Unterschiede sichtbar. *Bodipy FL-SM* und β -*Bodipy C₁₂-HPC* besitzen beide ein praktisch gleich großes Molekulargewicht und auch

der Fluorophor ist terminal an der Fettsäurekette lokalisiert. Dennoch unterscheiden sich die Diffusionskonstanten signifikant voneinander, das Sphingolipid diffundiert signifikant langsamer in nicht-adhärennten Membranbereichen. Strukturell besitzt das Sphingolipid eine freie Hydroxylgruppe. Diese Gruppe ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an der Grenzfläche zwischen Lipidkopfgruppen und Fettsäureketten der Biomembran [12]. Ohne diese Gruppe sind nur schwache Wechselwirkungen mit Membrankomponenten wie zum Beispiel Transmembranproteinen (TM-Proteine) möglich [127]. Des Weiteren konnte durch Arbeiten von Lenne et al. gezeigt werden, dass Moleküle, welche eine Anreicherung in Mikrodomänen beziehungsweise *lipid rafts* zeigen, einem dynamischen Prozess molekularer Sortierung in diskrete Domänen unterliegen, wodurch ihre Diffusion in der PM verlangsamt wird [109]. Da SM ein Lipid ist, von dem eine Anreicherung in Mikrodomänen bekannt ist [151, 112], konnten durch die in dieser Arbeit durchgeführten FCS-Messungen die These der funktionellen Interaktion von SM mit Membrankomponenten und der dynamischen Partitionierung in Mikrodomänen unterstützt werden.

Gleiches gilt für *Bodipy FL-GM1*, welches insgesamt die langsamste Diffusionskonstante besaß. Zum einen ist dieses Sphingolipid aufgrund der großen Kopfgruppe deutlich schwerer als das getestete SM oder PC. Zum anderen besitzt es die gleiche, freie Hydroxylgruppe wie SM und ist ebenfalls als Mikrodomänen-assoziiertes Lipid bekannt [111, 46]. Dies legt einen ähnlichen Mechanismus der intermolekularen Wechselwirkung des Gangliosids in der PM nah. Die Hydroxylgruppen innerhalb des großen Zuckerkopfes bei Gangliosiden könnten ebenfalls Wechselwirkungen mit peripheren Membranproteinen hervorrufen, was die Diffusion zusätzlich beeinflussen kann.

TopFluor-Cholesterol besaß von den getesteten Molekülen die schnellste Diffusion in der PM von Myofibroblasten. Das fluoreszenzmarkierte Sterol hat das niedrigste Molekulargewicht aller getesteten Moleküle. Andererseits ist insbesondere von Cholesterol eine Anreicherung in Mikrodomänen und eine besonders dichte Packung innerhalb dieser bekannt [151, 22, 21, 137]. Indes wird die Struktur des getesteten Sterol-Derivats am meisten durch Kopplung an den *Bodipy-Fluorophor* beeinflusst. *TopFluor-Cholesterol* ist annähernd doppelt so groß wie unmarkiertes Cholesterol. Da natives Cholesterol den Platz zwischen ungesättigten Fettsäureketten einnehmen und somit die Packungsdichte und Viskosität der Membran insgesamt erhöhen soll [158, 12], könnte diese Funktion bei dem markierten Derivat nicht mehr gegeben sein. Letztendlich zeigen die Ergebnisse, dass das verwendete *TopFluor-Cholesterol*, bedingt durch die negativen, strukturellen Veränderung, ein insgesamt nicht optimales Derivat zur Untersuchung von Cholesterol in Zellen ist. Allerdings sind momentan auf dem Markt keine Alternativen erhältlich.

Das synthetische, amphipatische Molekül *DiIC₁₈(7)* zeigte trotz seines wesentlich höheren Molekulargewichts eine annähernd schnelle Diffusion wie Cholesterol. Da es sich bei

dem Molekül um ein synthetisches Molekül handelt, welches nur aus zwei Fettsäureketten sowie einer großem delokalisiertem Elektronensystem als Kopfgruppe besteht, ist es zwar in der PM lokalisiert, übt dort wahrscheinlich aber keine biologische Funktion aus und zeigt daher keine spezifische Wechselwirkung mit Membrankomponenten.

Die Vergleiche der Diffusion zwischen nicht-adhären Membranbereichen und an Stellen zellulärer FAs brachte eine signifikant verlangsamte Diffusion von *Bodipy FL-SM* und *Bodipy FL-GM1* innerhalb der Adhäsionen hervor. *TopFluor-Cholesterol*, β -*Bodipy C₁₂-HPC* und *DiIC₁₈(7)* zeigten hier keine Wechselwirkungen, welche zu verlangsamten Diffusionen führte (siehe Abbildung 5.11). Dieses Ergebnis ist dadurch interessant, da die zelluläre FA einen Bereich der PM darstellt, welcher besonders reich an TM-Proteinen ist. Insbesondere Integrine liegen in der FA sehr dicht gepackt vor, so ist die Integridichte in reifen FAs 2-6 fach höher als in nicht-adhären Membranbereichen [180]. Durch die weiter oben beschriebenen Interaktionsmechanismen von SM und GM1 ist in der proteinreichen FA eine noch stärkere Wechselwirkung der Mikrodomänen-assoziierten Sphingolipide zu beobachten als in nicht-adhären Membranbereichen (siehe FCS-Messungen in den Abbildungen 5.6 & 5.7). Dies unterstützt die These der spezifischen Lipid-Proteinwechselwirkung dieser Moleküle. Von GM1 ist bekannt, dass es insbesondere beim Aufbau neuer FAs eine Anreicherung vor den ersten FA-assoziierten Proteinen wie Talin an den Stellen, wo eine FA entstehen wird, zeigt [51]. Für beide Sphingolipide liegt somit durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der erste Beweis der Interaktion in reifen FAs vor. Dabei konnten Gaus und Schwartz et al. zeigen, dass die Ordnung der Membran innerhalb zellulärer FAs höher ist als in nicht-adhären Membranbereichen [55]. Lipide zeigen aber in höher geordneten Phasen eine niedrigere Mobilität [170]. Um den Einfluss der höheren Membranordnung auf die Lipiddiffusion der getesteten Lipide und Moleküle untersuchen zu können, wurden phasenseparierte, unilamellare Riesenvesikel als biomimetisches Modellsystem ohne Membranproteine hergestellt und die Diffusion der fluoreszenzmarkierten Lipide und Moleküle in der flüssig-ungeordneten (L_D) und der flüssig-geordneten (L_O) Phase mit FCS bestimmt und verglichen (siehe Abbildung 5.17 & 5.23). Dabei zeigten die getesteten, fluoreszenzmarkierten Moleküle die in der Literatur beschriebene Verteilung zwischen den Phasen, wodurch sichergestellt werden konnte, dass keines der Lipide von einer Phase ausgeschlossen wurde [147, 40, 65, 9, 87, 86]. Bei FCS-Messungen an den L_D/L_O -phasenseparierten GUVs wurde deutlich, dass alle getesteten Lipide eine stark verlangsamte Diffusion in der Phase der höheren Membranordnung aufweisen. Somit konnte die höhere Membranordnung in FAs als Grund für die verlangsamte Diffusion von *Bodipy FL-SM* und *Bodipy FL-GM1* ausgeschlossen werden, da auch *TopFluor-Cholesterol* und β -*Bodipy C₁₂-HPC* diesem Effekt hätten unterliegen müssen. *TopFluor-Cholesterol* und β -*Bodipy C₁₂-HPC* zeigten in der L_O -Phase eine verlangsamte Diffusion, aber nicht in zellulären FAs. SM und GM1 unterliegen in zellulären

FAs Wechselwirkungen, die nicht einfach durch eine geordnetere Membranstruktur (also einen Lipid-basierten Effekt) erklärt werden können. Somit deuten die Experimente letztendlich auf eine starke Sphingolipid/Proteinwechselwirkung innerhalb zellulärer Adhäsionen hin.

Die Analyse der Streuung der Einzelmessungen innerhalb einer FCS-Messung unterstützt die besondere Art der Diffusion von Sphingolipiden in der PM (siehe Abbildung 5.12). Insbesondere GM1 zeigte eine große Heterogenität der Einzelmessungen innerhalb sowie außerhalb von FAs, SM streute dagegen nur bei Messungen in adhärennten Membranbereichen. Cholesterol, PC und $DiIC_{18}(7)$ besaßen überaus homogene Diffusionszeiten während einer FCS-Messung. Die ausgeprägte Heterogenität bei Messungen mit Sphingolipiden, welche auch in einer STED-FCS-Studie beobachtet werden konnte, ist ein weiterer Hinweis für die Bildung transienter Komplexe, in denen diese Lipide kurzzeitig angereichert werden und der Interaktionspartner langsam diffundiert oder sogar immobil sein könnte [127]. Die von Marquez et al. beschriebene Anreicherung von Sphingolipiden in zellulären FAs konnte weder in cLSM-Aufnahmen noch über Analysen der Partikelkonzentration bei FCS-Messungen beobachtet werden [119].

Insgesamt zeigt dieser Versuchsteil, dass Mikrodomänen-assoziierte Lipide in der PM eine besondere Dynamik und potenzielle Wechselwirkung mit Membrankomponenten wie zum Beispiel Proteinen besitzen. Vorstellbar wäre eine Membranorganisation, bei der TM-Proteine spezifisch mit Lipiden wechselwirken, welche charakteristisch für die Membran sind, in der sie ihre Funktion ausüben sollen. Somit sollte es PM-ständige Proteine geben, welche spezifisch mit Sphingolipiden interagieren [36]. Dabei findet die Interaktion nur transient und auf kurzen, zeitlichen Ebenen statt. So ist bis dato noch keine Proteinstruktur bekannt, bei der Sphingolipide gebunden beobachtet wurden. Diese Arbeit liefert somit die ersten Hinweise auf eine derartige Membranorganisation und kurzzeitige Sphingolipid/Protein-Interaktion in der PM von Zellen.

7 Ausblick

Die für die Fusion zwischen Liposom und zellulärer Plasmamembran kritische Lipidzusammensetzung konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente hinreichend bestimmt werden. Die Ergebnisse sowie die Diplomarbeit von Anton Hördt deuten insgesamt auf eine Phasenumwandlung hin, bei der Trans-Membrankontakte und nachfolgend Fusionsporen entstehen sollten. Dennoch ist der Mechanismus als solcher noch nicht gänzlich aufgeklärt. Die Strukturbestimmung dieser postulierten metastabilen Phasen könnte durch röntgenkristallografische Analysen erfolgen. Hochauflösende Transmissions-elektronenmikroskopie wäre in der Lage, zumindest in den Lipidproben die metastabilen Phasen abbilden zu können. Die Darstellung einer Fusion mit der PM würde sich aufgrund der Probenvorbereitung für derartige Analysen wahrscheinlich als sehr schwierig gestalten. In kalorimetrischen Analyseverfahren könnte zumindest der Temperaturverlauf der Phasenumwandlung der als fusogen eingestuften Liposom-Varianten untersucht werden. Dies würde weitere Hinweise auf die postulierten, metastabilen Phasen liefern, da die hier beschriebenen Phasen bei der Umwandlung einen für Phospholipid-Membranen ungewöhnlichen exothermen Temperaturverlauf zeigen.

Die zur Verlangsamung führende Interaktion von Sphingomyelin und dem Gangliosid GM1 in zellulären FAs stellt vor dem Hintergrund der Aktualität des Themas ein besonderes Interesse der weiterführenden Versuche dar. Wie bereits diskutiert wurde, wird eine spezifische Protein/Lipid-Wechselwirkung als Grund für die Verlangsamung postuliert. Da es sich um eine transiente, kurzlebige Interaktion handelt, kommen beispielsweise röntgenkristallografische Methoden nicht in Frage. Ein möglicher Ansatz wäre die gezielte Fluoreszenzmarkierung von FA-assoziierten Proteinen, um dann durch Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) eine räumlich sehr nahe Interaktion nachweisen zu können. Ein Problem dabei stellen aber die Integrine, die Transmembranproteine der FA dar. Nach meinem Kenntnisstand ist momentan kein Konstrukt bekannt, welches ein funktionales Integrin-Protein exprimieren kann. Andere FA-assoziierte Proteine wie Talin oder Vinculin könnten aber wie vorgeschlagen exprimiert und analysiert werden. Dennoch ist alleine aufgrund der Lokalisation der Lipide eine räumliche Wechselwirkung mit diesen Komponenten meiner Meinung nach unwahrscheinlich, aber nicht bewiesen. Ein sehr aufwendiger, aber möglicher Ansatz wäre die click-Chemie-reaktion. Dafür müssten in einem ersten Schritt Proteine mit einem azidaktivierten Ester versehen werden.

Diese Markierung von Proteinen ist bereits etabliert. In einem zweiten Schritt müssten Lipide mit einer alkinaktivierten Gruppe versehen werden. Durch eine kupferkatalysierte Reaktion kommt es zu einer Alkin-Azid-Cycloaddition. Die markierten Moleküle werden kovalent aneinander gebunden. Die Reaktion ist unspezifisch, das heißt alle markierten Proteine binden das Alkin-markierte Molekül in ihrer Nähe. Könnte man dann gezielt die Proteine von Interesse aufreinigen, sollten auch die zum Zeitpunkt der Reaktion in räumlicher Nähe befindlichen Lipide aufgereinigt werden.

Die metabolische Umsetzung von fluoreszenzmarkierten Lipiden könnte Dünnschicht-Chromatografisch untersucht werden. Vorher müssten die Zellorganellen aufgetrennt und die Lipide extrahiert werden. Dazu konnten bereits einige Vorexperimente während der Doktorarbeit durchgeführt werden. Leider konnten diese aus Zeitgründen nicht beendet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] E. ABBE, *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, Archiv für mikroskopische Anatomie, 9 (1873), pp. 413–418.
- [2] M. ABERCROMBIE AND G. DUNN, *Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy*, Experimental Cell Research, 92 (1975), pp. 57–62.
- [3] S. N. AHMED, D. A. BROWN, AND E. LONDON, *On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes.*, Biochemistry, 36 (1997), pp. 10944–53.
- [4] B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, AND P. WALTER, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 5th ed., 2008.
- [5] P. F. F. ALMEIDA, A. POKORNY, AND A. HINDERLITER, *Thermodynamics of membrane domains.*, Biochimica et Biophysica Acta, 1720 (2005), pp. 1–13.
- [6] N. ALTAN-BONNET AND G. ALTAN-BONNET, *Fluorescence Correlation Spectroscopy in Living Cells: A Practical Approach*, Current Protocols in Cell Biology, (2009).
- [7] P. ATKINS, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 4th ed., 2006.
- [8] D. AXELROD, D. KOPPEL, J. SCHLESSINGER, E. ELSON, AND W. W. WEBB, *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*, Biophysical Journal, 16 (1976), pp. 1055–1069.
- [9] K. BACIA, D. SCHERFELD, N. KAHYA, AND P. SCHWILLE, *Fluorescence Correlation Spectroscopy Relates Rafts in Model and Native Membranes*, Biophysical Journal, 87 (2004), pp. 1034–1043.
- [10] K. BACIA AND P. SCHWILLE, *A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy*, Methods, 29 (2003), pp. 74–85.

- [11] I. BANERJEE, J. W. FUSELER, R. L. PRICE, T. K. BORG, AND T. BAUDINO, *Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse.*, American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 293 (2007), pp. 1883–91.
- [12] Y. BARENHOLZ, *Sphingomyelin and cholesterol: From membrane biophysics and rafts to potential medical applications*, in Subcellular Biochemistry, vol. 37, Kluwer Academic, New York, 2004, pp. 167–215.
- [13] T. BAUMGART, A. T. HAMMOND, P. SENGUPTA, S. T. HESS, D. HOLOWKA, B. BAIRD, AND W. W. WEBB, *Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104 (2007), pp. 3165–70.
- [14] T. BAUMGART, G. HUNT, E. R. FARKAS, W. W. WEBB, AND G. W. FEIGENSON, *Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes.*, Biochimica et Biophysica Acta, 1768 (2007), pp. 2182–94.
- [15] E. M. BEVERS, P. COMFURIUS, D. W. DEKKERS, AND R. F. ZWAAL, *Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells.*, Biochimica et Biophysica Acta, 1439 (1999), pp. 317–30.
- [16] A. M. V. D. BLIEK, T. E. REDELMEIER, H. DAMKE, E. J. TISDALE, E. M. MEYEROWITZ, AND S. L. SCHMID, *Mutations in Human Dynamin Block an Intermediate Stage in Coated Vesicle Formation*, The Journal of Cell Biology, 122 (1993), pp. 553–563.
- [17] B. BLODGETT, *Monomolecular Films of Fatty Acids on Glass*, J. Am. Chem. Soc., 56 (1934), p. 495.
- [18] ———, *Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface*, J. Am. Chem. Soc., 57 (1935), pp. 1007–1022.
- [19] G. J. BRAKENHOFF, P. BLOM, AND P. BARENDS, *Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses*, Journal of Microscopy, 117 (1979), pp. 219–232.
- [20] M. S. BRETSCHER AND S. MUNRO, *Cholesterol and the Golgi apparatus*, Science, 261 (1993), pp. 1280–1.
- [21] D. BROWN, *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts.*, The Journal of Biological Chemistry, 275 (2000), pp. 17221–17224.
- [22] D. BROWN AND E. LONDON, *Functions of lipid rafts in biological membranes.*, Annual Review of Cell and Developmental Biology, 14 (1998), pp. 111–136.

- [23] R. BROWN, S. AMBLER, M. MITCHELL, AND C. LONG, *The Cardiac Fibroblast: Therapeutic Target in myocardial remodeling and failure*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 45 (2005), pp. 657–687.
- [24] C. BUCK, E. SHEA, K. DUGGAN, AND A. F. HORWITZ, *Integrin (the CSAT antigen): functionality requires oligomeric integrity.*, The Journal of Cell Biology, 103 (1986), pp. 2421–8.
- [25] K. BURRIDGE AND L. CONNELL, *A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes.*, The Journal of Cell Biology, 97 (1983), pp. 359–367.
- [26] K. BURRIDGE AND J. R. FERAMISCO, *Microinjection and localization of a 130K protein in living fibroblasts: a relationship to actin and fibronectin*, Cell, 19 (1980), pp. 587–595.
- [27] F. J. BYFIELD, H. ARANDA-ESPINOZA, V. G. ROMANENKO, G. H. ROTHBLAT, AND I. LEVITAN, *Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells*, Biophysical Journal, 87 (2004), pp. 3336–43.
- [28] P. CAMELLITI, T. K. BORG, AND P. KOHL, *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*, Cardiovascular Research, 65 (2005), pp. 40–51.
- [29] N. CAMPBELL AND J. REECE, *Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 6. auflage ed., 2003.
- [30] S. CAPITANI, B. HELMS, M. MAZZONI, M. PREVIATI, V. BERTAGNOLO, K. W. WIRTZ, AND F. A. MANZOLI, *Uptake and phosphorylation of phosphatidylinositol by rat liver nuclei. Role of phosphatidylinositol transfer protein*, Biochimica et Biophysica Acta, 1044 (1990), pp. 193–200.
- [31] E. T. CASTELLANA AND P. S. CREMER, *Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design*, Surface Science Reports, 61 (2006), pp. 429–444.
- [32] C. CESA, N. KIRCHGESSNER, D. MAYER, U. SCHWARZ, B. HOFFMANN, AND R. MERKEL, *Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns.*, The Review of Scientific Instruments, 78 (2007).
- [33] G. CEVC, *Phospholipids Handbook*, Marcel Dekker Inc., New York, 1993.
- [34] C. S. CHEN, O. C. MARTIN, AND R. E. PAGANO, *Changes in the spectral properties of a plasma membrane lipid analog during the first seconds of endocytosis in living cells*, Biophysical Journal, 72 (1997), pp. 37–50.
- [35] L. V. CHERNOMORDIK AND M. M. KOZLOV, *Mechanics of membrane fusion*, Nature Structural & Molecular Biology, 15 (2008), pp. 675–83.

- [36] U. COSKUN AND K. SIMONS, *Cell Membranes: The Lipid Perspective*, Structure, 19 (2011), pp. 1543–8.
- [37] A. CSISZAR, N. HERSCH, S. DIELUWEIT, R. BIEHL, AND R. MERKEL, *Novel Fusogenic Liposomes for Fluorescent Cell Labeling and Membrane Modification*, Bioconjugate Chem., 21 (2010), pp. 537–543.
- [38] A. DESMOULIERE, C. CHAPONNIER, AND G. GABBIANI, *Tissue repair , contraction , and the myofibroblast*, Wound Repair and Regeneration, 13 (2005), pp. 7–12.
- [39] P. F. DEVAUX AND R. MORRIS, *Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes*, Traffic, 5 (2004), pp. 241–246.
- [40] C. DIETRICH, L. BAGATOLLI, AND E. GRATTON, *Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes*, Biophysical Journal, 80 (2001), pp. 1417–1428.
- [41] D. DIMITROV AND M. ANGELOVA, *Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 19 (1988), pp. 323–336.
- [42] R. DIMOVA, S. ARANDA, N. BEZLYEPKINA, V. NIKOLOV, K. A. RISKE, AND R. LIPOWSKY, *A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nano-regime via optical microscopy*, Journal of Physics: Condensed Matter, 18 (2006), pp. S1151–76.
- [43] G. J. DOHERTY AND H. T. MCMAHON, *Mechanisms of Endocytosis*, Annual Review of Biochemistry, 78 (2009), pp. 857–902.
- [44] J. M. EAST, D. MELVILLE, AND A. LEE, *Exchange rates and numbers of annular lipids for the calcium and magnesium ion dependent adenosinetriphosphatase*, Biochemistry, 24 (1985), pp. 2615–23.
- [45] H. EBEL, P. GRABITZ, AND T. HEIMBURG, *Enthalpy and Volume Changes in Lipid Membranes. I. The Proportionality of Heat and Volume Changes in the Lipid Melting Transition and Its Implication for the Elastic Constants*, The Journal of Physical Chemistry B, 105 (2001), pp. 7353–7360.
- [46] C. EGGELING, C. RINGEMANN, R. MEDDA, G. SCHWARZMANN, K. SANDHOFF, S. POLYAKOVA, V. N. BELOV, B. HEIN, C. MIDDENDORFF, A. SCHÖNLE, AND S. W. HELL, *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*, Nature, 457 (2009), pp. 1159–1163.
- [47] C. EGGELING, J. WIDENGREN, R. RIGLER, AND C. A. M. SEIDEL, *Photostability of Fluorescent Dyes for Single-Molecule Spectroscopy: Mechanisms and Experimental Methods for Estimating Photobleaching in Aqueous Solution*, in Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine, 1999, pp. 193–240.

- [48] J. ENDERLEIN, I. GREGOR, D. PATRA, AND J. FITTER, *Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 5 (2004), pp. 155–161.
- [49] G. W. FEIGENSON, *Phase Boundaries and Biological Membranes*, Annu Rev Biophys Biomol Struct, 36 (2007), pp. 63–77.
- [50] G. W. FEIGENSON AND J. T. BUBOLTZ, *Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol*, Biophysical Journal, 80 (2001), pp. 2775–88.
- [51] D. E. FUENTES AND P. J. BUTLER, *Coordinated Mechanosensitivity of Membrane Rafts and Focal Adhesions.*, Cellular and Molecular Bioengineering, 5 (2012), pp. 143–154.
- [52] T. FUJIWARA, K. RITCHIE, H. MURAKOSHI, K. JACOBSON, AND A. KUSUMI, *Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane*, The Journal of Cell Biology, 157 (2002), pp. 1071–1081.
- [53] E. GANDIN, Y. LION, AND A. VAN DE VORST, *Quantum Yield of Singlet Oxygen Production by Xanthene Derivates*, Photochemistry and Photobiology, 37 (1983), pp. 271–278.
- [54] C. GAULT, L. OBEID, AND Y. HANNUN, *An Overview of Sphingolipid Metabolism: From Synthesis to Breakdown*, in Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules, Springer, New York, 2010.
- [55] K. GAUS, S. LE LAY, N. BALASUBRAMANIAN, AND M. SCHWARTZ, *Integrin-mediated adhesion regulates membrane order*, The Journal of Cell Biology, 174 (2006), pp. 725–34.
- [56] B. GEIGER, Z. AVNUR, AND J. SCHLESSINGER, *Restricted mobility of membrane constituents in cell-substrate focal contacts of chicken fibroblasts*, The Journal of Cell Biology, 93 (1982), pp. 495–500.
- [57] B. GEIGER, A. BERSHADSKY, R. PANKOV, AND K. M. YAMADA, *Transmembrane Extracellular Matrix Cytoskeleton Crosstalk*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2 (2001), pp. 793–805.
- [58] C. GELL, D. BROCKWELL, AND A. SMITH, *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*, Oxford University Press, New York, 2006.
- [59] R. B. GENNIS, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer, New York, 1989.
- [60] R. GEWORKJAN AND G. KLOSE, *Physik*, Akademie-Verlag, Berlin, 1986.

- [61] E. GIELEN, J. VERCAMMEN, J. SÝKORA, M. VANDEVEN, AND M. AMELOOT, *Diffusion of sphingomyelin and myelin oligodendrocyte glycoprotein in the membrane of OLN-93 oligodendroglial cells studied by fluorescence correlation spectroscopy*, *Comptes Rendus Biologies*, 328 (2005), pp. 1057–1064.
- [62] A. P. GIRARD-EGROT AND L. J. BLUM, *Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes*, in *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, 2007.
- [63] F. GOPALAKRISHNA, S. CHAUBEY, P. MANOGARAN, AND G. PANDE, *Modulation of alpha5beta1 integrin functions by the phospholipid and cholesterol contents of cell membranes*, *J Cell Biochem.*, 77 (2000), pp. 517–528.
- [64] L. GREENBAUM, C. ROTHMANN, R. LAVIE, AND Z. MALIK, *Green fluorescent protein photobleaching: a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen*, *Biological chemistry*, 381 (2000), pp. 1251–8.
- [65] M. V. GUDHETI, M. MLODZIANOSKI, AND S. T. HESS, *Imaging and shape analysis of GUVs as model plasma membranes: effect of trans DOPC on membrane properties*, *Biophysical Journal*, 93 (2007), pp. 2011–2023.
- [66] E. M. HADAC, M. J. FEDERSPIEL, E. CHERNYI, A. TUZIKOV, E. KORCHAGINA, N. V. BOVIN, S. RUSSELL, AND S. M. HENRY, *Fluorescein and radiolabeled Function-Spacer-Lipid constructs allow for simple in vitro and in vivo bioimaging of enveloped virions*, *Journal of Virological Methods*, 176 (2011), pp. 78–84.
- [67] M. HAO, S. X. LIN, O. J. KARYLOWSKI, D. WÜSTNER, T. E. MCGRAW, AND F. R. MAXFIELD, *Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle*, *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002), pp. 609–17.
- [68] H. HEERKLOTZ, *Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures*, *Biophysical Journal*, 83 (2002), pp. 2693–701.
- [69] M. HEINRICH, A. TIAN, C. ESPOSITO, AND T. BAUMGART, *Dynamic sorting of lipids and proteins in membrane tubes with a moving phase boundary*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (2010), pp. 7208–13.
- [70] S. W. HELL AND J. WICHMANN, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, *Optics Letters*, 19 (1994), pp. 780–2.
- [71] J. B. HELMS, K. J. DE VRIES, AND K. W. WIRTZ, *Synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the endoplasmic reticulum of Chinese hamster ovary cells.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (1991), pp. 21368–74.

- [72] B. HINZ, *Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair*, Journal of Investigative Dermatology, 127 (2007), pp. 526–537.
- [73] B. HINZ, G. CELETTA, J. J. TOMASEK, G. GABBIANI, AND C. CHAPONNIER, *Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity*, Molecular Biology of the Cell, 12 (2001), pp. 2730–41.
- [74] B. HINZ AND G. GABBIANI, *Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts*, Current Opinion in Biotechnology, 14 (2003), pp. 538–546.
- [75] B. HINZ AND A. GALLI, *The Myofibroblast - one function, multiple origins*, The American Journal of Pathology, 170 (2007), pp. 1807–1816.
- [76] M. G. HONIG AND R. I. HUME, *Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures.*, The Journal of Cell Biology, 103 (1986), pp. 171–87.
- [77] A. HÖRDT, *Membranfusion positiv geladener Liposomen mit Zusatz von aromatischen Molekülen*, Diplomarbeit, (2013).
- [78] A. R. HORWITZ, K. DUGGAN, C. BUCK, M. BECKERLE, AND K. BURRIDGE, *Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin - a transmembrane linkage*, Nature, 320 (1986), pp. 531–533.
- [79] R. HYNES, *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*, Cell, 69 (1992), pp. 11–25.
- [80] INVITROGEN, *The Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*.
- [81] C. IZZARD AND L. LOCHNER, *Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique*, Journal of Cell Science, 21 (1976), pp. 129–159.
- [82] A. JABLONSKI, *Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffen*, Zeitschrift für Physik, 94 (1935), pp. 38–46.
- [83] R. JAHN, T. LANG, AND T. SÜDHOF, *Membrane Fusion*, Cell, 112 (2003), pp. 519–533.
- [84] R. JAHN AND R. SCHELLER, *SNAREs—engines for membrane fusion*, Nat Rev Mol Cell Biol, 7 (2006), pp. 631–643.
- [85] A. JOHNSON AND M. VAN WAES, *The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane*, Annual Review of Cell and Developmental Biology, 15 (1999), pp. 799–842.

- [86] N. KAHYA, *Light on fluorescent lipids in rafts: a lesson from model membranes*, The Biochemical Journal, 430 (2010), pp. e7–9.
- [87] N. KAHYA, D. SCHERFELD, K. BACIA, AND P. SCHWILLE, *Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy*, Journal of Structural Biology, 147 (2004), pp. 77–89.
- [88] N. KAHYA AND P. SCHWILLE, *How phospholipid-cholesterol interactions modulate lipid lateral diffusion, as revealed by fluorescence correlation spectroscopy.*, Journal of Fluorescence, 16 (2006), pp. 671–8.
- [89] H. J. KAISER, D. LINGWOOD, I. LEVENTAL, J. SAMPAIO, L. KALVODOVA, L. RAJENDRAN, AND K. SIMONS, *Order of lipid phases in model and plasma membranes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 (2009), pp. 16645–50.
- [90] J. R. KANOFSKY AND P. D. SIMA, *Structural and Environmental Requirements for Quenching of Singlet Oxygen by Cyanine Dyes*, in Photochemistry and Photobiology, 2000, pp. 361–368.
- [91] M. R. KAPLAN AND R. D. SIMONI, *Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane*, The Journal of Cell Biology, 101 (1985), pp. 446–53.
- [92] I. KAZUYA, J. HIDARI, S. ICHIKAWA, AND Y. HIRABAYASHI, *Complete Removal of Sphingolipids from the Plasma Membrane Disrupts Cell to Substratum Adhesion of Mouse Melanoma Cells*, Journal of Biological Chemistry, 271 (1996), pp. 14636–14641.
- [93] A. KESEL, M. M. JUNGE, AND W. NACHTIGALL, *Einführung in die angewandte Statistik für Biowissenschaftler*, Birkhäuser Verlag, Basel, CH, 1999.
- [94] V. KIESSLING, J. M. CRANE, AND L. K. TAMM, *Transbilayer effects of raft-like lipid domains in asymmetric planar bilayers measured by single molecule tracking*, Biophysical Journal, 91 (2006), pp. 3313–26.
- [95] S. KIM, K. HEINZE, AND P. SCHWILLE, *Fluorescence correlation spectroscopy in living cells*, Nature Methods, 4 (2007), pp. 963–973.
- [96] D. KIRCHENBÜCHLER, *Kraftkopplung in Zellen*, PhD thesis, 2011.
- [97] A. KLENKE, *Tabellenwerk Statistik*, 2011.
- [98] C. KLEUSCH, *Analyse fluoreszenzmarkierter Lipide nach Einbau in Plasmamembranen von Myofibroblasten mittels fusogener Liposomen*, diplomarbeit, Forschungszentrum Jülich, 2010.

- [99] C. KLEUSCH, N. HERSCH, B. HOFFMANN, R. MERKEL, AND A. CSISZÁR, *Fluorescent lipids: functional parts of fusogenic liposomes and tools for cell membrane labeling and visualization*, *Molecules* (Basel, Switzerland), 17 (2012), pp. 1055–73.
- [100] M. M. KNIGHT, S. R. ROBERTS, D. A. LEE, AND D. L. BADER, *Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death*, *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284 (2003), pp. C1083–C1089.
- [101] T. KOBAYASHI AND R. E. PAGANO, *Lipid transport during mitosis. Alternative pathways for delivery of newly synthesized lipids to the cell surface*, *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (1989), pp. 5966–73.
- [102] T. KOLTER AND K. SANDHOFF, *Lysosomal degradation of membrane lipids*, *FEBS letters*, 584 (2010), pp. 1700–1712.
- [103] T. E. KREIS AND W. BIRCHMEIER, *Stress Fiber Sarcomeres of Fibroblasts Are Contractile*, *Cell*, 22 (1980), pp. 555–561.
- [104] O. KRICHEVSKY AND G. BONNET, *Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications*, *Reports on Progress in Physics*, 65 (2002), pp. 251–297.
- [105] A. KUSUMI, I. KOYAMA-HONDA, AND K. SUZUKI, *Molecular Dynamics and Interactions for Creation of Stimulation-Induced Stabilized Rafts from Small Unstable Steady-State Rafts*, *Traffic*, 5 (2004), pp. 213–230.
- [106] J. LAKOWICZ, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Berlin, third edit ed., 2006.
- [107] A. LEE, *Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1612 (2003), pp. 1–40.
- [108] B. LEITINGER AND N. HOGG, *The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function*, *Journal of Cell Science*, 115 (2002), pp. 963–972.
- [109] P. LENNE, O. WURTZ, A. BONED, X. GUO, H. HE, AND D. MARGUET, *Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork*, *EMBO Journal*, 25 (2006), pp. 3245–3256.
- [110] B. R. LENTZ, M. HOECHLI, AND Y. BARENHOLZ, *Acyl chain order and lateral domain formation in mixed phosphatidylcholine-sphingomyelin multilamellar and unilamellar vesicles*, *Biochemistry*, 20 (1981), pp. 6803–9.
- [111] D. LINGWOOD, J. RIES, P. SCHWILLE, AND K. SIMONS, *Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2008), pp. 10005–10.

- [112] D. LINGWOOD AND K. SIMONS, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*, Science, 327 (2010), pp. 46–50.
- [113] N. LIPSKY AND R. PAGANO, *A Vital Stain for the Golgi Apparatus*, Science, 228 (1985), pp. 745–747.
- [114] N. LIPSKY AND R. E. PAGANO, *Intracellular translocation of fluorescent sphingolipids in cultured fibroblasts: endogenously synthesized sphingomyelin and glucocerebroside analogues pass through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane*, The Journal of Cell Biology, 100 (1985), pp. 27–34.
- [115] O. LIVNAH, E. A. BAYER, M. WILCHEK, AND J. L. SUSSMAN, *Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex*, PNAS, 90 (1993), pp. 5076–80.
- [116] D. MAGDE, E. ELSON, AND W. W. WEBB, *Thermodynamic fluctuations in a Reacting System-Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Physical Review Letters, 29 (1972), pp. 705–707.
- [117] D. MARGUET, P. F. LENNE, H. RIGNEAULT, AND H.-T. HE, *Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order*, The EMBO Journal, 25 (2006), pp. 3446–57.
- [118] D. MARKS, R. BITTMAN, AND R. PAGANO, *Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells*, Histochemistry and Cell Biology, 130 (2008), pp. 819–832.
- [119] M. MÁRQUEZ, F. NIETO, M. FERNÁNDEZ-TOME, N. FAVALE, AND N. STERIN-SPEZIALE, *Membrane lipid composition plays a central role in the maintenance of epithelial cell adhesion to the extracellular matrix*, Lipids, 43 (2008), pp. 343–352.
- [120] F. R. MAXFIELD AND D. WÜSTNER, *Intracellular cholesterol transport*, J. Clin. Invest., 110 (2002), pp. 891–898.
- [121] P. E. MILHIET, M.-C. GIOCONDI, AND C. LE GRIMELLEC, *Cholesterol is not crucial for the existence of microdomains in kidney brush-border membrane models*, The Journal of Biological Chemistry, 277 (2002), pp. 875–8.
- [122] M. MINSKY, *Microscopy Apparatus*, 1957.
- [123] P. A. MONNARD, *Liposome-entrapped Polymerases as Models for Microscale/Nanoscale Bioreactors*, The Journal of Membrane Biology, 191 (2003), pp. 87–97.
- [124] C. MONZEL, *Analysis of Adhesion Topography and Fluctuations in Bio-Membranes by Advanced Optical Microscopy*, PhD thesis, Forschungszentrum Jülich, 2011.
- [125] C. MONZEL, S. FENZ, M. GIESEN, R. MERKEL, AND K. SENGUPTA, *Mapping fluctuations in biomembranes adhered to micropatterns*, Soft Matter, 8 (2012), pp. 6128–6138.

- [126] O. G. MOURITSEN, *The liquid-ordered state comes of age*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798 (2010), pp. 1286–8.
- [127] V. MUELLER, C. RINGEMANN, A. HONIGMANN, G. SCHWARZMANN, R. MEDDA, M. LEUTENEGGER, S. POLYAKOVA, V. N. BELOV, S. W. HELL, AND C. EGGLING, *STED Nanoscopy Reveals Molecular Details of Cholesterol- and Cytoskeleton-Modulated Lipid Interactions in Living Cells*, *Biophysical Journal*, 101 (2011), pp. 1651–60.
- [128] M. NASSE, J. WOEHL, AND S. HUANT, *High-resolution mapping of the three-dimensional point spread function in the near-focus region of a confocal microscope*, *Applied Physics Letters*, 90 (2007), pp. 1–3.
- [129] I. NILSSON, H. OHVO-REKILÄ, J. P. SLOTTE, A. E. JOHNSON, AND G. VON HEIJNE, *Inhibition of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane by sterols*, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001), pp. 41748–54.
- [130] A. OKAMOTO, T. ICHIBA, AND I. SAITO, *Pyrene-labeled oligodeoxynucleotide probe for detecting base insertion by excimer fluorescence emission*, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2004), pp. 8364–5.
- [131] R. PAGANO, O. MARTIN, H. KANG, AND R. HAUGLAND, *A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor*, *The Journal of Cell Biology*, 113 (1991), pp. 1267–1279.
- [132] R. PAGANO AND R. SLEIGHT, *Defining lipid transport pathways in animal cells*, *Science*, 229 (1985), pp. 1051–1057.
- [133] J. PAWLEY, *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, Springer, Berlin, 3rd ed., 2006.
- [134] B. M. PEARSE, *Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles*, *PNAS*, 73 (1976), pp. 1255–9.
- [135] E. PLOW, T. HAAS, L. ZHANG, J. LOFTUS, AND J. SMITH, *Ligand binding to integrins*, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000), pp. 21785–21788.
- [136] T. POMORSKI AND A. K. MENON, *Lipid flippases and their biological functions*, *Cell. Mol. Life Sci.*, 63 (2006), pp. 2908–2921.
- [137] A. PRALLE, P. KELLER, E. FLORIN, K. SIMONS, AND J. HÖRBER, *Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells*, *The Journal of Cell Biology*, 148 (2000), pp. 997–1008.
- [138] M. PUGLIESE AND M. BOLOGNESI, *Crystal Structure of Apo-avidin from Hen Egg-white*, *Journal of Molecular Biology*, 235 (1994), pp. 42–46.

- [139] D. J. RECKTENWALD AND H. M. MCCONNELL, *Phase equilibria in binary mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol*, *Biochemistry*, 20 (1981), pp. 4505–10.
- [140] A. RIETVELD AND K. SIMONS, *The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376 (1998), pp. 467–79.
- [141] R. RIGLER AND E. ELSON, *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications*, Springer, New York, 2001.
- [142] S. J. SAHL, M. LEUTENEGGER, M. HILBERT, S. W. HELL, AND C. EGGELING, *Fast molecular tracking maps nanoscale dynamics of plasma membrane lipids*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (2010), pp. 6829–34.
- [143] M. B. SANKARAM AND T. E. THOMPSON, *Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin*, *Biochemistry*, 29 (1990), pp. 10670–5.
- [144] K. SCHÄTZEL, M. DREWEL, AND S. STIMAC, *Photon Correlation Measurements at Large Lag Times : Improving Statistical Accuracy*, *Journal of Modern Optics*, 35 (1988), pp. 711–718.
- [145] P. SCHWILLE AND E. HAUSTEIN, *Fluorescence Correlation Spectroscopy An Introduction to its Concepts and Applications*, (1999), pp. 1–33.
- [146] P. SCHWILLE, J. KORLACH, AND W. W. WEBB, *Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes*, *Cytometry*, 36 (1999), pp. 176–182.
- [147] E. SEZGIN, I. LEVENTAL, M. GRZYBEK, G. SCHWARZMANN, V. MUELLER, A. HONIGMANN, V. N. BELOV, C. EGGELING, U. COSKUN, K. SIMONS, AND P. SCHWILLE, *Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818 (2012), pp. 1777–84.
- [148] H. J. SHARPE, T. J. STEVENS, AND S. MUNRO, *A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties*, *Cell*, 142 (2010), pp. 158–69.
- [149] D. P. SIEGEL, *The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion*, *Biophysical Journal*, 76 (1999), pp. 291–313.
- [150] D. P. SIEGEL AND R. M. EPAND, *The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms*, *Biophysical Journal*, 73 (1997), pp. 3089–111.

- [151] K. SIMONS AND E. IKONEN, *Functional rafts in cell membranes*, Nature, 387 (1997), pp. 569–572.
- [152] K. SIMONS AND D. TOOMRE, *Lipid rafts and signal transduction*, Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 1 (2000), pp. 31–9.
- [153] I. SINGER, *Association of fibronectin and vinculin with focal contacts and stress fibers in stationary hamster fibroblasts*, The Journal of Cell Biology, 92 (1982), pp. 398–408.
- [154] S. SINGER AND G. NICOLSON, *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*, Science, 175 (1972), pp. 720–731.
- [155] R. D. SINGH, Y. LIU, C. L. WHEATLEY, E. L. HOLICKY, A. MAKINO, D. L. MARKS, T. KOBAYASHI, G. SUBRAMANIAM, R. BITTMAN, AND R. E. PAGANO, *Caveolar endocytosis and microdomain association of a glycosphingolipid analog is dependent on its sphingosine stereochemistry*, The Journal of Biological Chemistry, 281 (2006), pp. 30660–8.
- [156] D. SKOOG AND J. LEARY, *Instrumentelle Analytik*, Springer, Berlin, 1996.
- [157] R. SLEIGHT AND R. PAGANO, *Transport of a fluorescent phosphatidylcholine analog from the plasma membrane to the Golgi apparatus*, The Journal of Cell Biology, 99 (1984), pp. 742–751.
- [158] J. M. SMABY, M. MOMSEN, V. S. KULKARNI, AND R. E. BROWN, *Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains*, Biochemistry, 35 (1996), pp. 5696–704.
- [159] L. SONG, C. A. VARMA, J. W. VERHOEVEN, AND H. J. TANKE, *Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy*, Biophysical Journal, 70 (1996), pp. 2959–68.
- [160] L. A. SONNA, J. FUJITA, S. L. GAFFIN, AND C. M. LILLY, *Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression*, Journal of Applied Physiology, 92 (2002), pp. 1725–42.
- [161] J. SOT, L. A. BAGATOLLI, F. M. GOÑI, AND A. ALONSO, *Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers*, Biophysical Journal, 90 (2006), pp. 903–14.
- [162] D. SOUMPASIS, *Theoretical Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Experiments*, Biophysical Journal, 41 (1983), pp. 95–97.
- [163] H. STEGEMEYER, *Lyotrope Flüssigkristalle*, Steinkopff, Darmstadt, 1. ed., 1999.
- [164] G. STOKES, *On the change of refrangibility of light*, Phil Trans R Soc, 142 (1852), pp. 463–562.

- [165] M. TERASAKI, L. LOEW, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ, AND K. ZAAL, *Fluorescent staining of subcellular organelles: ER, Golgi complex, and mitochondria*, Current Protocols in Cell Biology, (2001), p. Chapter 4.
- [166] H. A. THIERINGER, P. G. JONES, AND M. INOUE, *Cold shock and adaptation*, BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 20 (1998), pp. 49–57.
- [167] J. TOMASEK, G. GABBIANI, B. HINZ, C. CHAPONNIER, AND R. BROWN, *Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3 (2002), pp. 349–363.
- [168] B. VALEUR, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [169] G. VAN ECHTEN-DECKERT AND T. HERGET, *Sphingolipid metabolism in neural cells*, Biochimica et Biophysica Acta, 1758 (2006), pp. 1978–1994.
- [170] G. VAN MEER, D. R. VOELKER, AND G. W. FEIGENSON, *Membrane lipids: where they are and how they behave*, Nature reviews. Molecular cell biology, 9 (2008), pp. 112–24.
- [171] S. L. VEATCH AND S. KELLER, *Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes*, Biochimica et Biophysica Acta, 1746 (2005), pp. 172–85.
- [172] H. VERSCHUEREN, *Interference reflection microscopy in cell biology: methodology and applications*, Journal of Cell Science, 75 (1985), pp. 279–301.
- [173] K. VISSCHER, G. BRAKENHOFF, AND T. VISSER, *Fluorescence saturation in confocal microscopy*, Journal of Microscopy, 175 (1994), pp. 162–165.
- [174] W. W. WEBB, *Fluorescence correlation spectroscopy: inception, biophysical experimentations, and prospectus*, Applied Optics, 40 (2001), pp. 3969–3983.
- [175] R. WEHNER AND W. GEHRING, *Zoologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 24. ed., 2007.
- [176] J. WENGER, F. CONCHONAUD, J. DINTINGER, L. WAWREZINIECK, T. W. EBEBSEN, H. RIGNEAULT, D. MARGUET, AND P.-F. LENNE, *Diffusion analysis within single nanometric apertures reveals the ultrafine cell membrane organization*, Biophysical Journal, 92 (2007), pp. 913–9.
- [177] S. WERNER AND R. GROSE, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*, Physiological Reviews, 83 (2003), pp. 835–70.
- [178] G. WILSON AND C. F. FOX, *Biogenesis of Microbial Transport Systems : Evidence for Coupled Incorporation of Newly Synthesized Lipids and Proteins into Membrane*, J.Mol.Biol., 55 (1971), pp. 49–60.

- [179] J. WILSON AND J. HAWKES, *Optoelectronics: an Introduction*, 1989.
- [180] P. WISEMAN, C. BROWN, D. WEBB, M. ELLISMAN, AND A. F. HORWITZ, *Spatial mapping of integrin interactions and dynamics during cell migration by image correlation microscopy*, *Journal of Cell Science*, 117 (2004), pp. 5521–5534.
- [181] K. YAMANA, T. IWAI, Y. OHTANI, S. SATO, M. NAKAMURA, AND H. NAKANO, *Bis-pyrene-labeled oligonucleotides: sequence specificity of excimer and monomer fluorescence changes upon hybridization with DNA*, *Bioconjugate Chemistry*, 13 (2002), pp. 1266–73.
- [182] P. YEAGLE, *The Structure of Biological Membranes*, CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 1st ed., 1992.
- [183] A. ZIELINSKI, *Untersuchung der Antwort humaner Endothelzellen auf Substratdeformation*, PhD thesis, 2012.
- [184] W. ZINTH AND U. ZINTH, *Optik*, Oldenbourg Verlag, 2013.