

3. Materialien und Methoden

3.1. Modellmembranen und Chemikalien

3.1.1. Trägermaterialien und Reinigung

Als transparente Trägermaterialien für die Modellmembranen dienten Deckplättchen (Glas, rund, 18 mm Durchmesser) für alle mikroskopischen Untersuchungen. Für Charakterisierungen der Modellmembranen mittels Ellipsometer und AFM kamen Träger aus Silizium zum Einsatz. Diese Materialien wurden vor dem Gebrauch einer Reinigung unterzogen, um eine sehr homogene und chemisch eindeutige Oberfläche zu erhalten. Nach mechanischem Polieren wurden die Glaträger dafür mit einer Mischung aus konz. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (7/3) für 30 min bei 80°C im Ultraschallbad behandelt (oxydative Entfernung aller Oberflächenverunreinigungen). Siliziumwafer wurden im ersten Schritt mit $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1/1/5) unter den gleichen Bedingungen behandelt. Danach wurde 30 min mit MilliQ[®] (hochreines Wasser mit einer Leitfähigkeit von $18,2 \mu\text{S}$) gespült. Um alle Oberflächenmoleküle zum Silanol zu reduzieren, folgte ein Reinigungsschritt mit $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1/1/5) für 30 min bei 80°C im Ultraschallbad. Schließlich wurden die Träger 30 min mit ultrareinem Wasser gespült und getrocknet.

3.1.2. Membranlipide und Concanavalin A

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC), 1-Palmitoyl, 2-Oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC), 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DMPC) wurden bei Sigma (Deisenhofen, Deutschland) gekauft. Die Reinheit der Lipide wurde mittels HPLC und HPTLC analysiert und war immer größer als 99%. POPC wurde während dieser Arbeiten häufig untersucht, es zeigten sich jedoch keine oxydativen Zersetzungsprodukte. Die Fluoreszenzmarker 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-PE) und 1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amido]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholin (NBD-PC) wurden bei Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) gekauft. α -Methylmannosid, Glutaranhydrid, ConA und FITC ConA wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

3.1.3. Glykolipide

Neutrale Glykosphingolipide wurden von der Arbeitsgruppe Müthing an der Universität Bielefeld mittels High-Performance Thin-Layer Chromatographie gereinigt. Die Detektion der Ganglioside erfolgte durch nichtdestruktive Visualisierung mit Hilfe von anionischen lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen. Diese wurden anschließend in einer Sepharose Anionenaustauscher Chromatographie wieder abgetrennt [122, 123].

Das lösliche Sialyl Lewis X (sLe^x) wurde von Synthesome (Moskau, Rußland) bezogen.

Lipidverankerte sLe^x-Derivate wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um R.R. Schmidt von Ch.Gege und G. Hummel an der Universität Konstanz synthetisiert und ihre Reinheit mittels HPTLC und NMR bestimmt [124, 125]. Neben dem löslichen sLe^x wurden Glykolipide hergestellt, bei denen das Oligosaccharid entweder durch unterschiedlich lange Ethoxyeinheiten oder durch Galaktose oder ohne Spacer direkt mit dem Lipidanker verknüpft ist.

3.1.4. P-Selektin

P-Selektin wurde in unserer Arbeitsgruppe aus Thrombozyten isoliert, gereinigt und konzentriert. Humane Thrombozyten wurden zunächst durch schrittweise Zentrifugation (200xg und 1500g) von Erythrozyten weitgehend getrennt. Das Thrombozytenkonzentrat wurde durch einen Frier-Tau-Prozeß lysiert, anschließend wurden die Membranbestandteile bei 2000xg abzentrifugiert und mit 1%iger Triton-X100 behandelt. Dadurch gehen Membranproteine in Lösung und nicht gelöste zytoskelettverankerte Membranbestandteile können bei 2000xg abgetrennt werden.

Die so gewonnenen P-Selektinreichen Membranproteine wurden affinitätschromatografisch über eine ConcanavalinA-Säule gereinigt. Die P-Selektin-ConA Bindungen wurden mittels Methylmannosid verdrängt, damit konnte das Selektin mit Octylglykosid als Lösungsvermittler von der Chromatographiesäule eluiert werden.

3.2. Zellkultivation

E-Selektin-transfizierte Chinese Hamster Ovarial Zellen (CHO-E Zellen) waren ein Geschenk von P. Vasalli. Die Zellen wurden in MEM- α Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 nM Penicillin/Streptomycin kultiviert. 5×10^4 CHO-E Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C in 5% CO₂ drei bis vier Tage inkubiert, bis sie nahezu konfluent ausgewachsen waren. Nach einer dreiminütigen Trypsinisierung mit 2 ml 0,25% Trypsin in EDTA wurden die Zellen in

Zentrifugationsröhrchen überführt, für 3 min bei 430xg zentrifugiert und gewaschen. Danach erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Zellen mit Calcium GreenTM -2 AM (Molecular Probes, Inc. Europe BV Leiden, Holland). Die so behandelten Zellen bleiben bei ständigem Schütteln für ca. vier Stunden in Suspension, in dieser Zeit wurden die Zellrollexperimente durchgeführt (Kapitel 3.12.2).

3.3. Immuno-Goldmarkierung und Präparation für Elektronenmikroskopie

Ca. $1,8 \times 10^7$ Zellen wurden in PBS gewaschen, mit 2,5% Formaldehyd in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, mit PBS gespült, anschließend mit 50 mM Glycin in PBS (blockiert freie Aldehydgruppen) und schließlich mit 0,5% BSA und 0,2% Gelatine in PBS (PBG) gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit spezifischem anti-E-Selektin IgG der Ratte unter Schütteln inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBG wurden die Zellen für eine Stunde mit 12 nm goldmarkiertem sekundärem Antikörper inkubiert (anti-rat IgG der Ziege; Dianova) und danach sorgfältig mit PBG und PBS gewaschen (alle Zentrifugationen wurden bei 1200 rpm = 120xg durchgeführt).

Für die Einbettung wurden die Zellen zwei Stunden mit 4% Formaldehyd/5% Glutaraldehyd in PBS nachfixiert, danach mit PBS gewaschen und in 1,25% Agar suspendiert. Kleine Zell-Agar Stücke wurden konventionell in Aceton getrocknet, in Durcupan (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) eingebettet und bei 65°C und 100°C ausgehärtet. Ultradünne Schnitte wurden mit UO₂-Acetat und Pb-Citrat bedampft.

3.4. Kunststoffpartikel

Die Kunststoffpartikel als künstliche Modellzellen bestanden aus Melamin und hatten einen Durchmesser von 250 nm, 850 nm, 2,6 µm bzw. 7 µm (AERES GmbH Berlin). Die Partikel wurden zur Funktionalisierung mit einer Lipiddoppelschicht überzogen. Dazu wurden sie in einem ersten Arbeitsgang in trockenem Chloroform über ca. 16 Stunden unter Rühren mit Cyanurchlorid und N,N-Diisopropylethylamin bei Raumtemperatur aktiviert. Das überschüssige Cyanurchlorid wurde entfernt, und nach 3 min Zentrifugation bei 120xg wurden die Partikel wieder in Chloroform aufgenommen und mit DPPE umgesetzt. Durch die selektive Kopplung der DPPE-Aminogruppe am Cyanurchlorid weisen die Alkylreste nach außen und verleihen den Partikeln eine Hydrophobizität.

Im zweiten Arbeitsgang wurde auf diesen Monolayer durch Vesikelfusion ein Bilayer komplettiert. Dafür wurden ein Teil der Partikel mit einem ca. 10-50fachen Überschuß (berechnet nach Lipidmenge) an ca. 100 nm großen Liposomen versetzt und ca. 16 Stunden

geschüttelt. In dieser Zeit fusionierte ein Teil der Liposomen zu einem dichten Bilayer auf den Partikeln. Der Liposomenüberschuß wurde durch Zentrifugation (3 min 120xg) von den Partikeln entfernt.

3.5. Liposomenpräparationen

Zur Herstellung der verschiedenen einfachen oder ligandhaltigen Liposomenpopulationen wurden die entsprechenden Lipide oder Lipidmischungen in frisch destilliertem Chloroform/Methanol (2:1/v:v) gelöst (Endkonzentration ca. 30 $\mu\text{mol/ml}$), in einen Rundkolben gefüllt und zur Bildung eines Lipidfilms am Vakuumrotationsverdampfer bei ca. 35°C getrocknet. Im Falle einer Fluoreszenzmarkierung wurden zur Chloroform-Stammlösung 2 mol% die lipophilen Fluoreszenzmarker NBD-PE oder Rhodamin-PE (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von PBS (1% Ca^{2+}) und die Dispergierung der Lipide mit Hilfe von Glasperlen durch manuelles Schütteln über 10 Minuten. In Abhängigkeit der jeweiligen Phasenübergangstemperatur wurde das Schütteln bei Raumtemperatur für SPC und bei ca. 45°C für DPPC und DSPC durchgeführt. Die Dispersionen wurden anschließend über mind. 16h mechanisch geschüttelt (100 Bewegungen/min) und danach fünfmal durch eine Polycarbonatmembran (Nucleopor, Porengröße 200nm) extrudiert (Extruder, Lipex Biomembrane, Vancouver, Canada).

3.6. Vesikelfusion

Die Vesikelfusionstechnik ermöglicht das Aufbringen einer Lipid-Bischicht auf einen Feststoffträger. Dazu wurden die gereinigten oder auch hydrophobisierten Trägermaterialien (siehe Kapitel 3.1.1) mit einer Liposomensuspension inkubiert. Dabei kommt es zum spontanen Aufspreiten der Vesikel auf der festen Oberfläche.

Nach Entfernen der nicht gespreiteten Vesikel wurden ellipsometrische, fluoreszenzmikroskopische und zykovoltammetrische Untersuchungen der Struktur der Lipidlayer durchgeführt.

3.7. Self-Assembling

Frisch gereinigte Trägermaterialien (siehe Kapitel 3.1.1) wurden mit Monochlor-dimethyl-octadecyl-Silan (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bei 50°C für 30 Minuten inkubiert. Bei dieser Prozedur bildet sich, bedingt durch die sehr hohe Hydroxylgruppendichte

an der Feststoffoberfläche, ein äußerst homogener Monolayer, der dem Material hydrophobe Oberflächeneigenschaften verleiht [Abbildung 6].

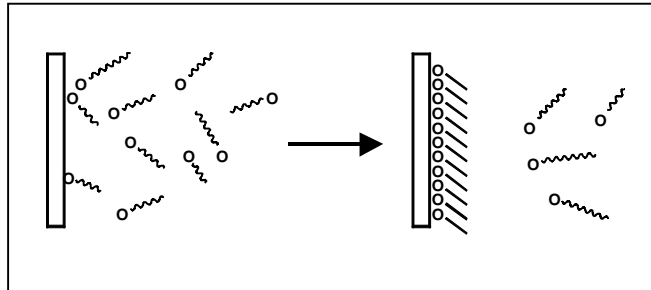


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Bildung einer organisierten Monoschicht an einer hydrophilen Oberfläche durch molekulare Adsorption aus organischer Lösung.

Die so vorbehandelten Träger wurden wie im folgenden Kapitel 3.8 beschrieben nach der Langmuir-Blodgett-Technik weiterbehandelt.

Auf gleiche Weise wurde bei der Beschichtung der Glasoberflächen mit Monochlor-dimethyl-aminopropylsilan (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verfahren.

Eine weitere Self-Assembling-Methode zur Modifizierung frisch gereinigter Trägermaterialien bestand in der Kopplung der Glasoberfläche mit Cyanurchlorid. Die zweite Bindungswalenz des Cyanurchlorids stand einer weiteren kovalenten Bindung zur Verfügung und wurde für die Bildung einer monomolekularen Proteinschicht (zum Beispiel P-Selektin) benutzt.

3.8. Langmuir-Blodgett-Technik

Die in frisch destilliertem Chloroform/Methanol (2:1/v:v) gelösten Lipide oder Lipidgemische (Prozentangaben erfolgen immer in mol%) wurden auf der Wasser/Luft Grenzflächen eines Langmuir-Troges (Filmwaage Typ R&K Riegler & Kirstein GmbH, Deutschland) aufgespreitet. Als Subphase wurde MilliQ[®] Wasser verwendet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels (15 min bei Raumtemperatur) wurde der Lipidfilm bei 25°C mit einer Geschwindigkeit von 0.01 nm² min⁻¹ Molekül⁻¹ bis 38 mN/m komprimiert. Bei diesem Lateraldruck wurde der Lipidfilm auf die wie in Kapitel 3.7 hydrophobisierten Materialien nach einem x-Typ Transfer übertragen. Die Tauchgeschwindigkeit betrug dabei 0,5 mm/s, und das Übertragungsverhältnis lag zwischen 0,95 und 1.

Diese feststofffixierten Modellmembranen wurden innerhalb der nächsten zwei Stunden für weitere Experimente verwendet.

3.9. Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist eine leistungsfähige optische Meßmethode zur Bestimmung sehr dünner Schichten. Dabei wird die Änderung des Polarisationszustandes einer einfallenden Lichtwelle infolge der Reflexion oder Transmission an einer massiven Probe bestimmt. Aus ihr lassen sich Rückschlüsse auf die optischen und die daraus abgeleiteten Eigenschaften wie zum Beispiel die Schichtdicke der Probe ziehen. Die besondere Stärke dieser Meßmethode liegt dabei in der hohen Empfindlichkeit und Meßgenauigkeit auch bei sehr geringen Schichtdicken (zum Beispiel Phospholipidmonolayer), sowie in der zerstörungsfreien Untersuchung der Proben.

Für die ellipsometrischen Messungen dieser Arbeit stand ein Tischellipsometer SE 400 (SENTECH GmbH, Berlin) mit kontinuierlich in X-Y-Richtung veränderbarer Probenhalterung für die Mapping Ellipsometrie zur Verfügung. Für die Messungen wurden die Lipidschichten auf Siliziumscheiben 8x8 mm aufgetragen.

3.10. Rasterkraft Mikroskopie (AFM)

Das Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope = AFM) stellt eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops dar. Das AFM erlaubt Untersuchungen in molekularen und atomaren Dimensionen, ohne besondere Anforderungen an die elektrische Leitfähigkeit der zu untersuchenden Probe zu stellen [126]. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Oberflächen biologischer, auch mechanisch empfindlicher Systeme in ihrer natürlichen Umgebung ohne spezielle Präparation mit hoher Auflösung darzustellen [127,128].

Beim AFM wird eine Abtastspitze, die sich am Ende einer federnden Zunge (Cantilever) befindet, rasterförmig über die Probenoberfläche geführt. Die Spitze hat im Abtastbereich einen Durchmesser von nur ca. 50 nm. Ein Detektor mißt die Auslenkung des Cantilevers in der z-Achse, entsprechend der Topografie der Probenoberfläche. Die dreidimensionale Abbildung der Oberfläche wird nun durch die Darstellung der gemessenen z-Auslenkung des Cantilevers als Funktion der x-y-Position der Rasterbewegung der Probe erzeugt.

Die Rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. U. Bakowsky (Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik, Halle) am Nanoscope IIIa (digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt. Die hydratisierten Proben befanden sich unter MilliQ[®], PBS oder MEM α .

3.11. Zyklovoltammetrie

Die Zyklovoltammetrie ist eine kapazitive Strommessung, bei der das System Elektrode-Lipidschicht-Elektrolyt als idealer Plattenkondensator angesehen wird. Mit ihr ist es möglich, die effektive Schichtdicke der Modellmembran zu ermitteln. Zusätzlich kann durch die Verwendung verschieden großer Moleküle als wandernde Ladungsträger die Durchlässigkeit der Membran zum Beispiel durch Risse und Löcher charakterisiert werden.

In der üblichen zykvoltammetrischen Dreielektroden-Versuchsanordnung wird eine beschichtete stationäre Arbeitselektrode (Glas-Kohlenstoff- oder Goldelektrode) in einen ruhenden Elektrolyten eingetaucht. Dieser Elektrode wird ausgehend von einem Anfangspotential ein sich zeitlich änderndes Elektrodenpotential aufgeprägt, das nach Erreichen eines Umkehrpotentials wiederum zeitlich linear zum Ausgangswert zurückgeführt wird.

Da keine absoluten Einzelelektrodenpotentiale gemessen werden können, ist das Elektrodenpotential der Arbeitselektrode immer auf eine nicht polarisierte Referenzelektrode bezogen, zum Beispiel Ag/AgCl oder die gesättigte Kalomelektrode. Um einer Zerstörung der Referenzelektrode, einer induzierten Polarisierung oder Reaktion an der Arbeitselektrode und einer durch den inneren Widerstand des Elektrolyten bedingten Strom hervorgerufenen Differenz zwischen Sollpotential und Meßzellpotential vorzubeugen, wird eine zusätzliche Hilfs- oder Gegenelektrode verwendet. Bei dieser Anordnung wird nahezu der gesamte Strom über die Gegenelektrode abgeleitet, während die Referenzelektrode aufgrund ihrer hohen Impedanz stromlos bleibt. Mit Hilfe eines kommerziellen Potentiostaten läßt sich nun das gewünschte Sollpotential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode einstellen. Durch Operationsverstärker wird an der Arbeitselektrode ein Strom erzwungen.

Die verwendete Apparatur für die zykvoltammetrischen Experimente besaß neben dem Potentiostaten (Potentioscan Wenking POS 88, Bank Elektronik, Deutschland) mit der selbstgebauten Meßzelle einen Funktionsgenerator, mit dem das gewünschte Potentialprogramm gesteuert wurde. Die analog anfallenden Daten wurden im Computer gewandelt und mit dem Programm SIGNALYS (Kontron, Deutschland) aufgezeichnet.

3.12. Zellrollexperimente

3.12.1. Aufbau der Durchflußapparatur

Die Durchflußapparatur wurde aus einem massiven Block von farblosem, durchsichtigen Polyacryl gefräst. Die äußeren Maße sind so gewählt, daß die Apparatur im beweglichen x-y-Tisch eines inversen Mikroskopes befestigt werden kann. Im unteren Teil des Kunststoffes wurde die eigentliche Durchflußkammer mit den Abmessungen 11 x 6 x 0,45 mm herausgearbeitet, die Ecken wurden dabei abgerundet, um Strömungswirbel zu verhindern. Die Kammer wird von unten mit einem runden Objektträger-Glasplättchen (Durchmesser 18 mm) mit Hilfe eines anschraubbaren Metallringes abgedeckt. Als Reservoir für das Fließmedium diente ein 250 ml Scheidetrichter, der an einem skalierten Stativständer in variabler Höhe befestigt wurde. Bevor das Fließmedium in die Durchflußkammer gelangt, muß es eine Blasenfalle passieren (ein 2 ml fassendes Glasgefäß, in dem sich ein Luftpolster befindet). Diese Blasenfalle ist mit einem Septum abgedichtet, durch das die Zellsuspension injiziert werden kann. Alle Schlauchverbindungen hatten einen Innendurchmesser von 1 mm.

3.12.2. Durchführung der Rollexperimente

Vor Beginn der Experimente wurde die Durchflußkammer am Mikroskop installiert. Der Mikroskoptisch wurde auf 37°C temperiert. Mit Hilfe des im Mikroskoptisch integrierten Luftgebläses wurde die Durchflußapparatur für mindestens 20 Minuten ebenfalls auf 37°C temperiert. Der Flüssigkeitsspiegel im Reservoir wurde auf die entsprechende Höhe gebracht, um eine bestimmte Durchflußmenge pro Zeit zu erreichen. Die Korrelation zwischen Höhendifferenz und Durchflußmenge wurde durch die ausgeflossene Menge Medium in einen 10 ml Maßkolben geeicht.

Die wie in Kapitel 3.2 vorbereiteten Zellen sollten sich in einer relativ hochkonzentrierten Suspension befinden, um im Mikroskop-Bildausschnitt möglichst viele Zellen auswerten zu können. Deshalb wurden die Zellen nicht im gesamten Fließmedium suspendiert, sondern 10^6 Zellen in 150 µl Medium direkt durch das Septum der Blasenfalle in den Flüssigkeitsstrom injiziert. Nach ca. 3 Sekunden waren die Zellen im Bildausschnitt angelangt, jetzt wurde der Fluß unterbrochen, um eine Zellsedimentation zu ermöglichen. Nach einer Sedimentationszeit von 5 Minuten befinden sich alle Zellen mit der Modellmembran der Kammer in Kontakt, und der Fluß wurde wieder hergestellt. Ab diesem Zeitpunkt wurde alle zwei Sekunden ein digitales Mikroskopbild abgespeichert. Durch diese Bildsequenz läßt sich die Bewegung jeder einzelnen Zelle nachvollziehen und auswerten.

Bei Versuchen mit den löslichen Inhibitoren der Arbeitsgruppe Ikami (Japan) wurden den Zellsuspensionen 30 ng der entsprechenden Substanzen zugefügt.

3.12.3. Laser-Scanning-Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen der Modellmembranen oder der Zellrollexperimente wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt (CLSM 410 invert, Carl Zeiss, Deutschland). Bei einem solchen inversen Mikroskop wird die Probe mit einem Laserstrahl gescannt. Die Wellenlänge des Laserlichtes lag mit 488 nm oder 543 nm im Bereich der Anregungsmaxima der von uns verwendeten Fluoreszenzmarker. Das Emissionslicht gelangt über mehrere Strahlenteiler und Kantenfilter zu einem Photomultiplier und wird dort elektronisch ausgewertet. Das konfokale Prinzip des Mikroskopes beruht auf einer variablen Lochblende vor dem Multiplier, die die Überstrahlungen des Emissionslichtes reduziert, die in z-Richtung der Probe entsteht. Dadurch ist es möglich, nur Fluoreszenzen zu detektieren, die sich in unmittelbarer Nähe des Untersuchungsobjektes befinden. Emissionslicht von darüber befindlichen Zellen bzw. Liposomen wird nicht erfaßt.