

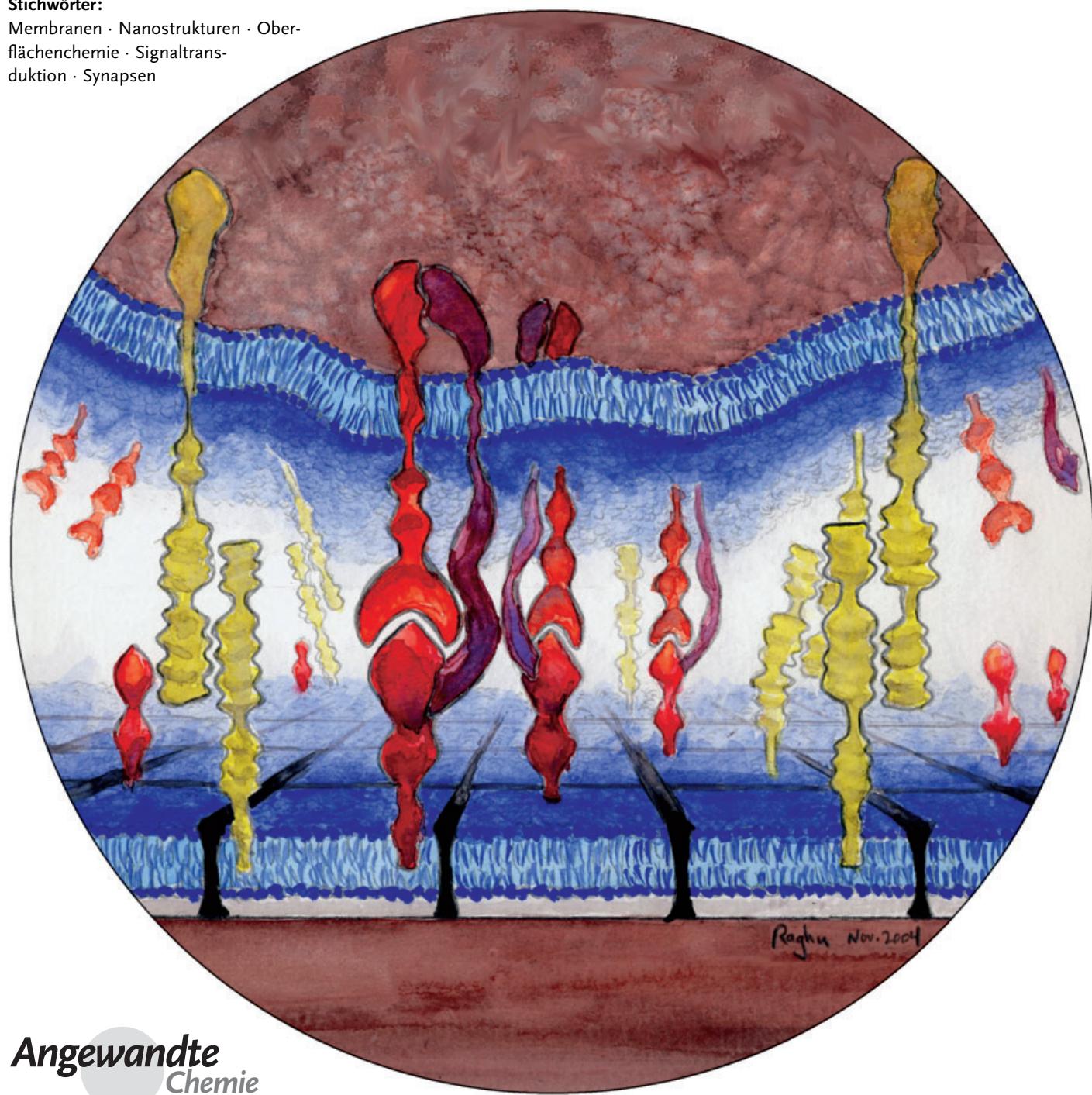
Membrankontaktstellen

Molekulare Organisation und Signaltransduktion an Kontaktstellen zwischen Membranen

Jay T. Groves*

Stichwörter:

Membranen · Nanostrukturen · Oberflächenchemie · Signaltransduktion · Synapsen



Oberflächen schaffen eine Umgebung, in der zahlreiche Kräfte zusammenwirken und dabei eine Vielzahl komplexer chemischer Prozesse auslösen. Dies gilt vor allem für Zellmembranen, deren Fluidität und Flexibilität eine Antwort auf chemische Wechselwirkungen an der Oberfläche ermöglichen, wie man sie bei anorganischen Materialien in dieser Form nicht findet. Die Bildung räumlicher Proteinmuster an Membranoberflächen im Bereich von Membrankontaktstellen liefert viele Beispiele für solche Phänomene und spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der interzellulären Signaltransduktion. Entsprechend interessieren sich sowohl Physikochemiker als auch Zellbiologen für Wechselwirkungen an Membranoberflächen. Aktuelle, fachübergreifende Untersuchungen zur Bildung von Proteinmustern in immunologischen Synapsen und zur Rekonstitution und Manipulation von Membranen unter Verwendung moderner bildgebender Verfahren werden in diesem Aufsatz vorgestellt.

1. Einleitung

Die Fähigkeit von Zellen, untereinander Signale auszutauschen, ist ein wesentliches Erfordernis für alle Vielzeller. Tausende membranassoziierten Rezeptoren und Botenstoffe übertragen Signale zwischen Zellen; von besonderem Interesse ist hierbei die Aufklärung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. In vielen Fällen können allerdings einzelne Bindungereignisse allein das bemerkenswerte Verhalten dieser Proteine in Zellen nicht erklären. Kollektive Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Bildung von Molekülclustern werden als wichtige Elemente der Signaltransduktion angesehen und entsprechen einer ersten Ebene der Kooperativität.^[1-6] Zudem erkannte man in der koordinierten Umordnung von Zellmembran-Rezeptoren in Form bestimmter Muster ein wichtiges Merkmal interzellulärer Signalweitergabe. Beispiele dafür finden sich in den immunologischen Synapsen, die während der letzten Jahre an den Membrankontaktstellen zwischen verschiedenen Immunzellen und ihren Zielzellen entdeckt wurden.^[7-15] Räumliche Proteinmuster entwickeln sich innerhalb der Kontaktstellen, wenn Rezeptorpopulationen auf einer Zellmembran mit den dazugehörigen Liganden auf der gegenüberliegenden Membran in Kontakt treten. Diese Muster können einen Umfang von mehreren Mikrometern haben und reichen so viel weiter als direkte Kontaktwechselwirkungen zwischen Proteinen. Sie korrelieren stark mit den nachfolgend auftretenden intrazellulären signalgebenden und Effektorfunktionen.

Die räumliche Einschränkung der interzellulären Kontaktstellen auf eine Größenordnung von einigen Moleküllängen hat tiefgreifende Konsequenzen für die biochemischen Reaktionen, die dort ablaufen. Im Falle der immunologischen Synapsen entstehen die Proteinmuster durch die enge Kooperativität zwischen inter- und intramembranären Proteinbindungereignissen, membranmechanischen Einschränkungen und der Umordnung des Cytoskeletts, durch die es zu einer lateralen Sortierung der Proteine innerhalb ihrer jeweiligen fluiden Membranen kommt.^[16-18] Spezifisch für eine Membrankontaktstelle ist, dass Kräfte auftreten können, die

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3591
2. Räumliche Muster und Signalgebung von Zellen	3592
3. Experimentelle Modellsysteme	3596
4. Bildgebende Verfahren	3598
5. Schlussfolgerungen und Ausblick	3602

die Bildung von Mustern fördern, ohne dass dabei direkte Bindungen zwischen Proteinen zu beobachten sind. Beispielsweise erzeugt eine Krümmung der Membran eine abstoßende Kraft auf Rezeptor-Ligand-Komplexe mit unterschiedlichen bevorzugten Membranabständen. Entsprechend wird die effektive Geschwindigkeit der Bildung eines weiteren Rezeptor-Ligand-Komplexes in der Nachbarschaft eines Komplexes ähnlicher Größe durch die von den Membranen bewirkte Vororientierung erhöht. Diese Art von Rückkopplungsschleife kann zur Bildung umfangreicher Muster an Membrankontaktstellen führen.^[19-23] Alternativ kann die bevorzugte Assoziation mit speziellen Membrandomänen (Rafts^[140]) zur Colokalisierung führen. Die fehlende Spezifität dieser Kräfte lässt vermuten, dass die Bildung räumlicher Muster innerhalb interzellulärer Kontaktstellen einen weitreichenden Einfluss hat.

Auch außerhalb biologischer Systeme ist die reaktionsgetriebene Bildung räumlicher Muster ein verbreitetes physikalisches Phänomen mit wichtigen Auswirkungen, z. B. in der heterogenen Katalyse.^[24-26] Die Komplexität der Musterbildung in lebenden Systemen ist allerdings beispiellos. Die enormen Fortschritte bei der Aufklärung molekularer Aspekte zellulärer Signalsysteme wie der immunologischen Synapse eröffnen Möglichkeiten für empfindliche quantitative und rechnergestützte Untersuchungen der physikalischen Mechanismen, die der Signalgebung in Zellmembranen zu grunde liegen.

In diesem Aufsatz werden die neuesten Entwicklungen bei der Untersuchung der physikalischen Mechanismen der Signaltransduktion an interzellulären Kontaktstellen zusammengefasst. Die immunologischen Synapsen sollen als Beispiel fungieren, an dem Leitmotive kollektiver Signalsysteme an interzellulären Kontaktstellen verdeutlicht werden. Sie werden

[*] Dr. J. T. Groves
Department of Chemistry
University of California Berkeley
Fax: (+1) 510-642-8821
E-mail: JTGroves@lbl.gov

aus physikalischer Sichtweise und im Zusammenhang mit quantitativen Interpretationen diskutiert. Experimentelle Membransystem-Modelle und Messtechniken, die die hierarchische Kooperativität der Wechselwirkungen zwischen Populationen von Signalmolekülen an Membrankontaktstellen erfassen, werden beleuchtet.

2. Räumliche Muster und Signalgebung von Zellen

2.1. Interzelluläre Synapsen

Das Immunsystem identifiziert und zerstört Zellen, die von einem Pathogen infiziert wurden oder in einen von der Norm abweichenden Lebenszyklus eingetreten sind. Eine Klasse von Immunzellen, die an dieser Überwachung beteiligt ist, ist die der T-Lymphocyten (T-Zellen). Diese stehen an vorderster Front des adaptiven Immunsystems und werden hauptsächlich durch die Wechselwirkung von T-Zellrezeptoren (TCRs) auf der T-Zelle mit Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, major histocompatibility complex) aktiviert, die Peptidfragmente auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APCs) präsentieren. Je nach Art dieser Wechselwirkungen können unterschiedliche Signale weitergeleitet werden. Die Erkennung des Peptid/MHC (pMHC) durch TCRs auf aktivierte cytotoxischen CD8⁺-T-Zellen löst die Lyse der Zielzelle aus. Im Unterschied dazu führt die Erkennung von Eigen-pMHC auf APCs im Thymus durch TCRs auf Thymozyten (unreifen T-Zellen) zur Zerstörung der autoreaktiven Thymozyten durch Apoptose. Ein Versagen dieses Selektionsprozesses im Thymus löst Autoimmunerkrankungen aus. Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Psoriasis können alle auf fehlerhafte Signalgebung an T-Zellsynapsen zurückgeführt werden.

Bei T-Zellen läuft der Erkennungsprozess über die Bildung einer immunologischen Synapse mit der Zielzelle ab.^[10,11,13–15,17,27–31] Zahlreiche aktuelle Untersuchungen haben präzise organisierte, dynamische Muster von Rezeptoren und Signalmolekülen in der Synapse aufgedeckt^[7–9,32–35] (Abbildung 1). Immunologische Synapsen sind nicht auf T-Zellen beschränkt: NK-Zellen (natürliche Killerzellen), die eine Schlüsselrolle bei der angeborenen Immunantwort spielen, bilden ebenfalls zahlreiche Synapsenmuster während des Kontakts mit ihren Zielzellen. Das Hauptaugenmerk dieses Aufsatzes liegt zwar auf den T-Zellen, doch viele der be-

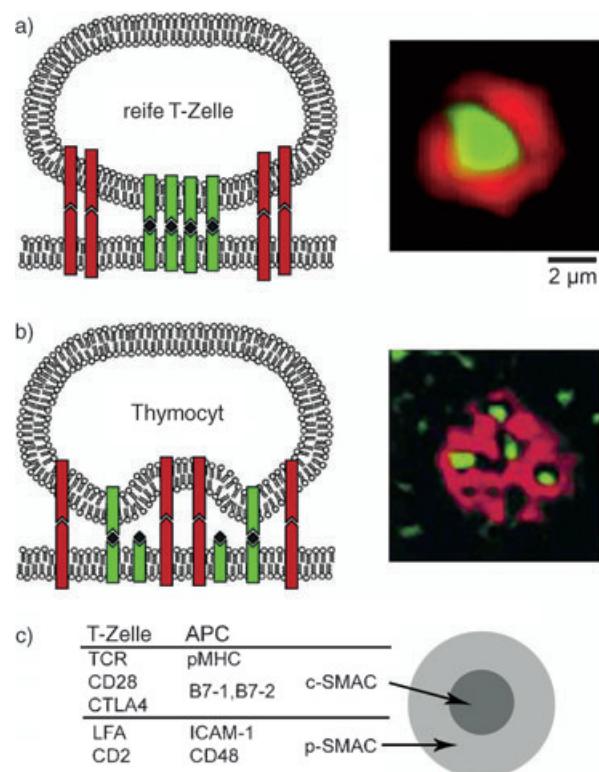


Abbildung 1. Musterbildung in Synapsen verschiedener Immunzellypen: schematische Darstellung (links) und Fluoreszenzaufnahmen an lebenden Zellen (rechts). a) Reife T-Zellsynapse mit dem TCR-Peptid/MHC (grün) im Zentrum (c-SMAC) und LFA1-ICAM1 (rot) an der Peripherie (p-SMAC). Die Fluoreszenzaufnahme ist Lit. [8] entnommen. b) Schema und Fluoreszenzaufnahme einer Thymocytensynapse (Farben wie in (a)). Die Fluoreszenzaufnahme ist Lit. [48] entnommen. c) Schema der molekularen Anatomie einer reifen T-Zellsynapse.

schriebenen Merkmale wurden auch bei NK-Zellsynapsen beobachtet.^[10]

Im Falle der Synapsen reifer T-Zellen besteht die bevorzugte Struktur für eine dauerhafte Signalgebung aus einem zentralen supramolekularen Aktivierungscluster (c-SMAC) mit einer Ausdehnung von 1–3 µm, in dem sich TCR-pMHC-Komplexe ansammeln. Andere costimulatorische Moleküle auf der T-Zelloberfläche, darunter CD28 und das Antigen 4 der cytotoxischen T-Lymphocyten (CTLA4), werden im c-SMAC mit den zugehörigen Liganden auf der APC-Oberfläche, B7-1 und B7-2, angereichert. Der c-SMAC wird von einem peripheren Ring umgeben, in dem sich Komplexe zwischen LFA1 (leukocyte function-associated antigen 1) auf der T-Zelle und interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1) auf der APC befinden (Abbildung 1a). In dieser Struktur, auch als peripherer supramolekularer Aktivierungscluster (p-SMAC) bezeichnet, reichern sich auch größere costimulatorische Moleküle an, darunter CD2 auf der T-Zelle und sein Ligand CD48 auf der APC. Die Größe der TCR-pMHC-Komplexe definiert den Abstand (ca. 15 nm) zwischen den Membranen innerhalb des c-SMAC. Die längeren LFA1-ICAM1-Komplexe (ca. 40 nm) zwingen den gegenüberliegenden Membranen einen größeren Abstand inner-



Jay T. Groves erhielt den BSc in Physik und Chemie an der Tufts University und promovierte in Biophysik an der Stanford University. Nach einem Jahr als Visiting Scholar an der Academia Sinica in Taipei, Taiwan, kehrte er in die USA zurück und ging als Division Director's Fellow an das Lawrence Berkeley National Laboratory. 2001 wechselte er zur Fakultät für Chemie an der University of California, Berkeley. Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Lipiddmembranen und ihrer Bedeutung für lebende molekulare Systeme.

halb des peripheren Rings von Adhäsionsmolekülen auf. Letztlich wird ein ausgefeiltes Zusammenspiel von costimulatorischen, Adhäsions- und Signalmolekülen^[31,36-39] zusammen mit Cytoskelett-Anbindungen^[18,40-42] und Lipid-Rafts^[43-46] innerhalb der immunologischen Synapsen organisiert.

Thymozyten-ACP-Wechselwirkungen werden von den gleichen primären Rezeptor-Liganden-Paaren vermittelt wie die von Synapsen reifer T-Zellen, nur ist die räumliche Organisation anders. In Thymozyten-ACP-Synapsen werden keine c-SMACs gebildet. Stattdessen kondensieren multifokale Zusammenballungen von TCR-pMHC und zerfallen wieder in einem See von LFA1-ICAM1-Komplexen^[47,48] (Abbildung 1b). Für die abweichenden Muster wurde eine thermodynamische Ursache vorgeschlagen, basierend auf einem unterschiedlichen Ausmaß an TCR-Expression.^[49] (siehe Abschnitt 2.2). Es steht allerdings noch nicht fest, in welchem Umfang die unterschiedlichen Proteinmuster in den Synapsen reifer T-Zellen und Thymozyten zu den unterschiedlichen zellulären Antworten auf die TCR-Aktivierung beitragen.

Die Informationen über die strukturelle Organisation der oben beschriebenen immunologischen Synapsen wurden mit verschiedenen optischen und elektronischen bildgebenden Verfahren erhalten. Die Proteinmuster wurden durch die Abbildung fluoreszenzmarkierter Proteine in lebenden Zellen^[7,9,34,47] und in hybriden Synapsen zwischen lebenden Zellen und trägergestützten Membranen sichtbar gemacht.^[8,48,50] Die topographischen Muster des Raumes zwischen den Membranen in immunologischen Synapsen wurden in hybriden Synapsen aus Zellen und trägergestützten Membranen mit Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) abgebildet.^[8] Die Vermessung der Zwischenräume zwischen zwei lebenden Zellen in einer Synapse war auch auf elektronenmikroskopischen Bildern zweidimensionaler Schnitte möglich, die senkrecht zur Synapse geführt wurden.^[51,52]

Die immunologischen Synapsen haben wahrscheinlich mehrere Funktionen mit unterschiedlicher Bedeutung für die verschiedenen Zell-Zell-Wechselwirkungen. Im Prozess der Synapsenbildung (siehe unten) gibt es zahlreiche Stellen, an denen die Assoziation eines reifen Synapsenmusters gehemmt oder reguliert werden kann. Ist die Synapse einmal gebildet, kann die erhöhte Konzentration der TCRs im c-SMAC die Stimulation durch TCRs verstärken, zumindest am Anfang. Auch eine verstärkte Herunterregulierung der TCR-Konzentration im c-SMAC ist möglich, wodurch letztlich das Signal geschwächt wird. Wahrscheinlich ist das reife Synapsenmuster ein Mechanismus zur Ausbalancierung von TCR-Signalgebung und -Abbau.^[53] Über die Signalerzeugung hinaus spielt die Struktur der immunologischen Synapse möglicherweise eine Rolle bei der Effektorfunktion, indem sie die Sekretion von Cytokinen oder lytischen Granulae zur Zielzelle lenkt.^[54]

Immunologische Synapsen können auch von Pathogenen benutzt werden: So wurde kürzlich sowohl beim menschlichen Immunschwäche-Virus (HIV) als auch beim menschlichen T-Zell-Leukämievirus Typ 1 (HTLV-1) nachgewiesen, dass sie die Konzentration der besetzten Rezeptoren und die

komakte Struktur in der Synapse ausnutzen, um ihre Übertragung von Zelle zu Zelle zu erleichtern.^[55-57] Prionproteine breiten sich anscheinend ebenfalls vom Immun- zum Nervensystem über neuroimmunologische Synapsen aus.^[58,59]

Die frühen Stadien der Synapsenbildung und der postsynaptischen Partnererkennung im Zentralnervensystem ähneln den Aufgaben, mit denen Immunzellen bei ihrer Überwachungsfunktion konfrontiert sind, und so häufen sich in letzter Zeit Befunde, die auf gemeinsame Motive bei Synapsen im Nerven- und im Immunsystem hinweisen.^[12,51] Beispielsweise wurden für wichtige Proteine, darunter MHC,^[60] Agrin^[61,62] und Neuropophilin-1^[63,64] Funktionen in Synapsen beider Systeme nachgewiesen.

2.2. Physikalische Antriebskräfte

Aktiver Transport über das Cytoskelett spielt eine zentrale Rolle bei der Musterbildung in immunologischen Synapsen und ist eine der ersten Aktivitäten, die durch die Signale des T-Zellrezeptors ausgelöst werden.^[18,40-42] Innerhalb von Minuten nach dem ersten Kontakt mit dem antigenen pMHC werden die TCRs zum Zentrum der sich bildenden Synapse hin transportiert. Transportgeschwindigkeiten zwischen 0.04 und 0.1 $\mu\text{m s}^{-1}$ wurden mit dreidimensionaler Fluoreszenzverfolgungs-Mikroskopie bestimmt.^[65] Der TCR bindet über die TCR- ζ -Kette und den Cytoskelett-Regulator Vav direkt an das Actin-Cytoskelett.^[66,67] Blockiert man den aktiven Transport durch das Cytoskelett, z.B. mit einem Inhibitor der Actin-Polymerisation wie Cytochalasin D, kommt auch die Synapsenbildung in den T-Zellen nicht zustande.^[8] Die TCRs sammeln sich im c-SMAC und verdrängen dabei verschiedene Adhäsions- und costimulatorische Moleküle, darunter LFA1, aus der zentralen Region, und diese beginnen, die umgebende p-SMAC-Struktur zu bilden. Es wurde berichtet, dass das Mikrotubuli organisierende Zentrum (MTOC) über den p-SMAC mit der Membran verankert ist,^[68] was darauf schließen lässt, dass dieses Tubulingerüst während der Synapsenbildung mit der Funktion des Actin-Cytoskeletts koordiniert wird. Diese Rolle der MTOCs für die Signalgebung der Synapsen wird weiter durch den Befund gestützt, dass Nocodazol, ein potenter Inhibitor der Mikrotubuli, die TCR-Aktivierung stört.^[69]

Das Cytoskelett steuert nicht nur verschiedene Antriebskräfte zur Entstehung von Proteinmustern in der immunologischen Synapse bei, sondern übernimmt wahrscheinlich auch an einigen Stellen wichtige regulatorische Aufgaben. So hängt die dauerhafte Akkumulation von Actin in der T-Zellsynapse von der Konzentration des Agonisten pMHC ebenso ab wie von der Beteiligung der costimulatorischen Rezeptoren CD28 oder LFA1.^[70] Signale von costimulatorischen Molekülen könnten so die Bildung von weiträumigen Proteinmustern durch ihren Einfluss auf die Dynamik des Actin-Cytoskeletts regulieren. Anderen Beobachtungen zufolge könnte das Cytoskelett an der Regulation der Synapsenfunktion mitwirken, vermittelt durch die Ezrin-Radixin-Moesin-(ERM)-Proteine.^[71] Die EMR-Proteine wirken als allgemeine Brückenmoleküle zwischen dem corticalen Netzwerk der Actinfilamente und der Plasmamembran^[72] und sind bekannt

termaßen an der immunologischen Synapse der T-Zelle beteiligt.^[73] Die frühen Stadien der TCR-Signalübermittlung können eine Inaktivierung der EMR-Proteine auslösen. Ergebnis ist eine teilweise Loslösung des corticalen Actin-Cytoskeletts, was zu einer effizienteren Bildung des T-Zell-APC-Konjugats zu führen scheint. Zurzeit ist allerdings noch offen, wie diese vielfältigen Funktionen des Cytoskeletts integriert werden und welche Arten von Rückkopplungsmechanismen die Regulation übernehmen.

Membrangesteuerte Selbstorganisationsmechanismen wurden auch bei der Bildung der Synapsen vermutet. Die Größenunterschiede zwischen den verschiedenen Rezeptor-Ligand-Komplexen, die sich innerhalb der T-Zellsynapsen bilden, verursachen spezifische topographische Variationen des dazwischen liegenden Raumes.^[74] Dies ließ sich direkt elektronenmikroskopisch^[51,52] und in T-Zellsynapsen durch RICM^[8] beobachten; die schematische Darstellung der Membran topographie auf der linken Seite von Abbildung 1 beruht auf diesen Ergebnissen. Wenn sich erst einmal topographische Strukturen an Kontaktstellen zwischen Membranen zu bilden beginnen, können andere Moleküle der Zelloberfläche indirekt durch Größenausschlußeffekte in räumliche Muster gedrängt werden. Hinweise für eine solche Sortierung nach Größe ergaben sich aus einer Serie von Versuchen, in der durch die genetische Verlängerung der extrazellulären Domäne von CD48 (einem costimulatorischen Liganden im APC) dessen natürliche Fähigkeit zur Steigerung der Antigenerkennung durch T-Zellen abgeschaltet wurde.^[75]

Mechanische Einschränkungen der Membran sind die treibende Kraft für eine Größen sortierung von Proteinen an Membrankontaktstellen. Das Zusammenspiel zwischen Proteinorganisation und Membrangestalt bei der Bildung der Synapsenmuster wurde mithilfe von theoretischen Modellen für die kollektive Wechselwirkung zwischen Populationen von Zelloberflächenrezeptoren und Liganden auf gegenüberliegenden Membranen untersucht.^[19–21,49,76,77] Die Rezeptor-Ligand-Bindung kann als Reaktions-Diffusions-Prozess modelliert werden, der mathematisch durch Smoluchowski-Gleichungen beschrieben werden kann. In dieser Darstellung wird die Rezeptor-Ligand-Bindung durch die Geschwindigkeiten der Assoziation (on) und der Dissoziation (off) charakterisiert. Rezeptoren und Liganden können innerhalb der zweidimensionalen Fläche ihrer jeweiligen Membranen frei diffundieren. Die effektive lokale Reaktionsgeschwindigkeit zwischen entsprechenden Rezeptor-Ligand-Paaren hängt von ihren lokalen Konzentrationen, der jeweiligen Assoziationsgeschwindigkeit, dem lokalen Membranabstand und der Größe des Komplexes ab. Ein besonderes Merkmal dieser Modellierungsstrategie ist die Berücksichtigung der sich entwickelnden Topographie der Membrankontaktstelle. Der Energiegehalt der Membranform wird berechnet unter Berücksichtigung der Beiträge der Biegung und Streckung der Membran und der Beiträge durch die Verzerrungen, die durch die Bildung der Rezeptor-Ligand-Komplexe verursacht werden. Die zeitliche Entwicklung der Membrangestalt wird dann mittels einer zeitabhängigen Landau-Ginzburg-Gleichung mit den Reaktions-Diffusions-Gleichungen verknüpft. Auf diese Weise kann die enge Rückkopplung zwischen Proteinbindung und Membrangestalt untersucht werden.

Während der Synapsenreifung verändert sich das Muster der immunologischen Synapsen in charakteristischer Weise. Im Frühstadium besteht die T-Helferzellsynapse aus einem äußeren Ring von TCR-pMHC, der eine zentrale Ansammlung von LFA1-ICAM1-Komplexen umgibt. Das Frühstadium der Synapse cytotoxischer T-Zellen ist weniger gut organisiert. Im weiteren Verlauf des Signalprozesses durchlaufen die Synapsen beider T-Zelltypen eine Umorganisation, in der TCR und pMHC zum c-SMAC sowie LFA1 und ICAM1 zur Peripherie wandern. Zahlreiche andere Moleküle der Zelloberfläche werden während dieses Prozesses ebenfalls umsortiert. Berechnungen, die auf gemessenen Werten für die Proteinbindungs kinetiken, die Steifheit/Elastizität der Membran gegen Biegung und die Größe der Proteinkomplexe beruhen, ergeben Umorganisationen der Muster, die den in T-Zellsynapsen beobachteten räumlich und zeitlich bemerkenswert ähnlich sind (Abbildung 2). Die beiden oberen

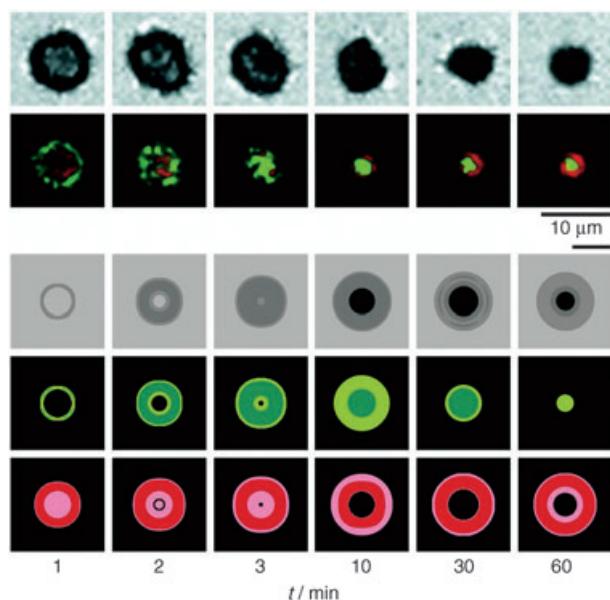


Abbildung 2. Zu mehreren Zeitpunkten aufgenommene RICM-Bilder (obere Reihe) und überlagerte Fluoreszenzaufnahmen (untere Reihe) der Bildung einer immunologischen T-Zellsynapse mit einer trägergestützten Membran. Markiert sind ICAM (rot) und MHC (grün). Die Daten sind Lit. [8] entnommen. In den unteren drei Reihen sind die berechnete Topographie und die Muster von MHC und ICAM dargestellt. Bei den berechneten Mustern der Proteinkonzentration in den Reihen 4 und 5 sind Regionen mit unterdurchschnittlichen Proteinkonzentrationen schwarz gefärbt, während Regionen, in denen Protein angereichert ist, zunehmend dunkler grün (MHC) oder rot (ICAM) gefärbt sind. Die Kontrastoptimierung der Fluoreszenzdaten (Reihe 2) führt zu ähnlichen Ergebnissen.

Reihen der Abbildung veranschaulichen die schrittweise Bildung einer hybriden immunologischen Synapse zwischen einer lebenden Zelle und einer trägergestützten Membran.^[8] In den RICM-Aufnahmen in der oberen Reihe sieht man die Veränderung der Topographie der Kontaktstelle. Hellere Stellen auf dem Bild deuten auf Regionen mit größerem Abstand zwischen den Membranen hin. In der zweiten Reihe ist eine Serie überlagerter Fluoreszenzbilder zu sehen, die die

Verteilung von MHC (grün) und ICAM (rot) in der Kontaktregion zeigen. Die unteren drei Reihen veranschaulichen Topographie, MHC- und ICAM-Profile, wie sie sich aus Berechnungen nach der oben beschriebenen Modellierungsstrategie der membrangekoppelten Reaktion/Diffusion ergeben.^[19] Auch wenn das Modell vermuten lässt, dass membranvermittelte Kräfte die Musterbildung ohne gerichteten Transport durch das Cytoskelett antreiben könnten, sollte man berücksichtigen, dass die mechanischen Eigenschaften der Zellmembran signifikant durch das Cytoskelett beeinflusst werden.^[78] So ist ein indirekter Einfluss des Cytoskeletts unausweichlich; außerdem kann bei der Musterbildung manchmal ein gerichteter „Anschub“ durch das Cytoskelett nötig sein.^[21]

Ungeachtet der Rolle des Cytoskeletts entwickeln die Membranen im Ungleichgewicht ein Kraftgefüge, das die Proteine auf der Zelloberfläche insgesamt beeinflusst. Diese allgegenwärtigen, membranvermittelten Kräfte tragen zur Gesamtorganisation der Proteine innerhalb der Synapse bei. Nehmen wir beispielsweise an, dass das Actin-Cytoskelett und der MTOC durch koordiniertes Zusammenwirken ein Muster der Membrantopographie an einer interzellulären Kontaktstelle erzeugen. Diese Topographie wird dann membranvermittelte Triebkräfte entwickeln, die die räumliche Organisation der nicht ans Cytoskelett gebundenen Moleküle beeinflussen. Cytoskelett- und membranvermittelte Mechanismen der räumlichen Organisation werden so in einer interzellulären Kontaktstelle untrennbar miteinander verknüpft. Die Entwicklung quantitativer Modelle für die Mechanismen der Signaltransduktion zwischen Zellen wird daher vermutlich eine gemeinsame Behandlung der Membran- und der Cytoskelett-Effekte erfordern.

Membranvermittelte Kräfte reagieren von Natur aus sehr empfindlich auf Proteinbindungskinetiken. Dies röhrt von der grundsätzlichen Tatsache her, dass die Bewegung eines gebundenen Intermembran-Proteinkomplexes durch die weilige Topographie der Kontaktstelle stark gehindert wird. Damit sich ein Komplex lateral innerhalb der Membran bewegen kann, muss sich der Raum zwischen den Membranen anpassen. Für ungebundene Zelloberflächenproteine gibt es keine entsprechende Hinderung (Abbildung 3). Die Reaktions-Diffusions-Dynamik der Proteinorganisation kann

daher empfindlicher in Bezug auf die Reaktionskinetik als auf die Diffusionskinetik sein. Das Ausmaß, in dem die Proteinbindungskinetiken die Musterbildung durch membranvermittelte Reaktions-Diffusions-Prozesse in der T-Zellsynapse beeinflussen, ist noch nicht klar. Eine umfassende Analyse biologischer Daten, die die Proteinbindungskinetiken mit der Zellaktivierung in Beziehung setzt, liefert jedoch interessante Korrelationen mit den berechneten Tendenzen zur Musterbildung. Proteinbindungskinetiken, die dem Modell nach zur Bildung reifer Synapsenmuster führen, korrelieren stark mit der Aktivierung von T-Helferzellen. Dagegen lässt sich keine Korrelation zwischen den Tendenzen zur Musterbildung und der Lyse von Zielzellen durch cytotoxische T-Zellen nachweisen – dies kann eine Folge unterschiedlicher Arten von Signalen und Signalgebungsmechanismen sein, die über die immunologische Synapse weitergegeben werden.^[76] Aufgrund von Modellierungen wurde auch vermutet, dass die dynamischen, multifokalen Synapsen, die an der Thymocytenselektion beteiligt sind, durch niedrige TCR-Expression und thermische Membranfluktuationen entstehen können. Dies impliziert einen möglichen Mechanismus, bei dem über die Stärke der TCR-Expression in Thymocyten eine unterschiedliche Signalweiterleitung durch dieselben Moleküle wie bei der T-Zellaktivierung vermittelt werden könnte.^[49] Wegen der Empfindlichkeit der membranvermittelten Kräfte gegen die Proteinbindungskinetik bieten sie sich für die Signalverstärkung an.

Die oben beschriebenen, membranvermittelten Kräfte werden in erster Linie durch die mechanische Krümmung verursacht. Eine andere Klasse von der Membran ausgehender Kräfte röhrt von Tendenzen zur lateralen Phasentrennung innerhalb der Membran her.^[79] Diese vieldiskutierten Raft-Strukturen werden in zahlreichen Signaltransduktionsprozessen,^[80,81] z.B. in der T-Zellsynapse,^[43,44,82,83] vermutet. Während die physikalische Chemie der Trennung nicht mischbarer Phasen in Lipiddoppelschicht-Mischungen bereits quantitativ präzise beschrieben werden kann,^[84,85] liegt eine vergleichbare quantitative Interpretation von Phasentrennungsphänomenen in Membranen lebender Zellen noch in weiter Ferne. Wegen der oben diskutierten mechanischen Membrankrümmung könnten solche Membrandomänen mit getrennten Phasen einen erheblichen Einfluss ausüben. Daher ist die Entwicklung effizienter Methoden zur Untersuchung dieser Prozesse im Zusammenhang mit der topographischen Krümmung der Membran und den Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett von großer Bedeutung.

Man kann davon ausgehen, dass räumliche Muster von Molekülen an interzellulären Kontaktstellen kollektiv Informationen übermitteln, die die bloße Summe der Einzelbeiträge zum Signal übersteigen. Hinweise auf die Korrelation der räumlichen Anordnung von Rezeptorproteinen mit der Signalaktivität gibt es außer bei immunologischen Synapsen auch bei der Chemorezeption in Bakterien,^[5] der Signalvermittlung durch Integrine,^[3] der Adhäsion von Zellen an der extrazellulären Matrix^[4] und den ubiquitären Raft-Domänen von Zellmembranen.^[80,86] Ungeklärt ist allerdings noch, welche Menge an zusätzlicher Information das räumliche Muster tatsächlich übermittelt.

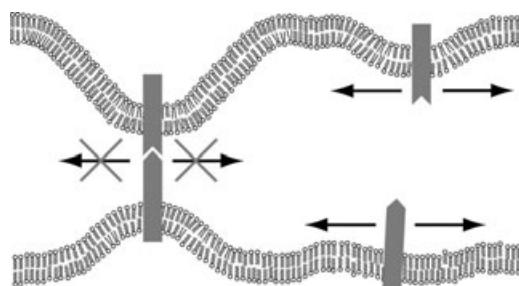


Abbildung 3. Einschränkung der lateralen Diffusion von Intermembran-Proteinkomplexen in den Membranen. Die topographischen Variationen der Membran hindern die laterale Bewegung, es sei denn, der Abstand der benachbarten Membran ist mit der Komplexgröße vergleichbar. Nichtkomplexierte Proteine dagegen diffundieren frei in ihrer jeweiligen Membran.

3. Experimentelle Modellsysteme

3.1. Hybride Synapsen aus Zellen und trägergestützten Membranen

Eine bemerkenswerte und vorteilhafte Eigenschaft von Lipidmembranen ist die Tendenz von Vesikeln mit Lipiddoppelschichten, sich spontan auf einer geeigneten Oberfläche (z.B. auf Siliciumoxid oder manchen Polymeren) in Form einer einzelnen, kontinuierlichen Lipidmembran anzusiedeln.^[87,88] Dieser Fusionsprozess von Vesikeln ist ein generelles Phänomen. Eine große Zahl unterschiedlich zusammengesetzter Membranen, unter anderem aus geladenen Phospholipiden, Glycolipiden, membrangebundenen Proteinen (z.B. über Glycosylphosphatidylinositol-Linker (GPI) verknüpft), Transmembranproteinen und sogar Membran-Rafts, können unter prinzipiell gleichen Bedingungen abgelagert werden.^[89] Die Orientierung der Membranen bleibt während des Fusionsprozesses erhalten.^[90] Auch die biologische Funktion kann erhalten bleiben, wie sich an aktiven immunologischen Synapsen belegen lässt, die sich zwischen trägergebundenen Membranen und lebenden T-Zellen bilden. Eine solche Hybridsynapse ist in Abbildung 4 dargestellt. Tatsäch-

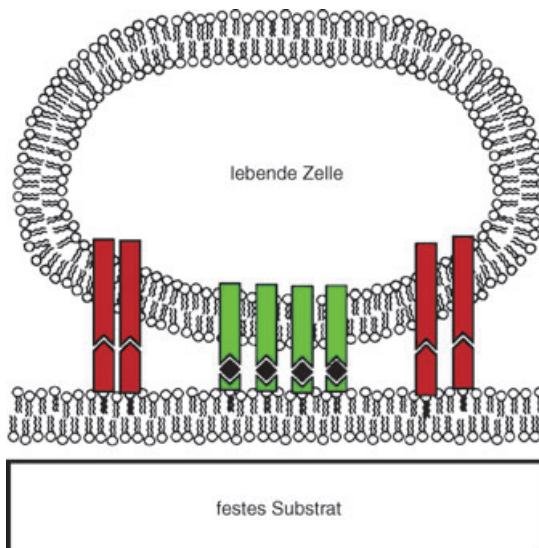


Abbildung 4. Hybride Synapse aus einer lebenden Zelle und einer trägergestützten Membran. In diesem Beispiel werden die entsprechenden Liganden für die Rezeptoren auf der Zelloberfläche in GPI-gebundener Form in der trägergestützten Membran präsentiert.

lich sind die am besten aufgelösten dynamischen Aufnahmen der Synapsenbildung in T-Zellen mit trägergestützten Membranen anstelle von APCs gelungen.^[8,50] Die Bilder in Abbildung 1a und 1b stammen beide von einer Synapse mit trägergestützter Membran. In diesen Beispielen bilden reife T-Zellen (1a)^[8] oder Thymozyten (1b)^[48] immunologische Synapsen mit trägergestützten Membranen, die membrangebundene Formen von pMHC und ICAM1 präsentieren. Eine entscheidende Eigenschaft dieser Membranen, die die Bildung hybrider Synapsen erst ermöglicht, ist die freie laterale Diffusion von Lipiden und membrangebundenen

Proteinen. Trägergestützte Doppelschichten sind typischerweise vom Trägermaterial durch einen ca. 1 nm dicken Wasserfilm getrennt^[91–93] und behalten viele der Eigenschaften freier Membranen bei, einschließlich der lateralen Fluidität. Die Fluidität wirkt über große Entfernung, sodass bewegliche Bestandteile beider Doppelschichthälften frei über die gesamte Oberfläche des Trägers diffundieren können.^[94]

Ein entscheidender Fortschritt bei der Entwicklung trägergestützter Membranen war, dass in den Membranen Barrieren gegen eine laterale Diffusion gezogen werden können, wodurch sich die Membranen in einzelne Felder aufteilen lassen. Diese Aufteilung gelingt, indem man die Membranen auf vorstrukturierte Sustrate aufträgt, die sich durch mikro- oder nanolithographische Verfahren (z.B. Photolithographie, Mikrokontakt-Druckverfahren oder Elektronenstrahl-Lithographie) herstellen lassen.^[95–101] Lipide und bewegliche Proteine innerhalb der Membran behalten ihre ungestörte Diffusion bei, können sich aber über die Barrieren hinweg nicht mischen. Ein Vorteil dieser Strategie ist, dass lithographische Verfahrenstechniken verwendet werden können, die bereits in großem Umfang für die Halbleiterindustrie entwickelt wurden, um räumliche Anordnungen bis hinab zu ca. 10 nm (der Grenze der Elektronenstrahl-Lithographie nach gegenwärtigem Stand der Technik) zu steuern. Ein Fluoreszenzbild einer trägergestützten Membran auf einem strukturierten Substrat findet sich in Abbildung 5. Das Substrat wurde mit konzentrischen hexagonalen, 100 nm breiten Linien aus Chrom mit einem Abstand von 1 μm versehen. Fluoreszenzsonden in der Membran wurden punktuell ausgebleicht. Das Muster der Fluoreszenzregeneration illustriert deutlich die Bereiche eingeschränkter Diffusion innerhalb der trägergestützten Membran.

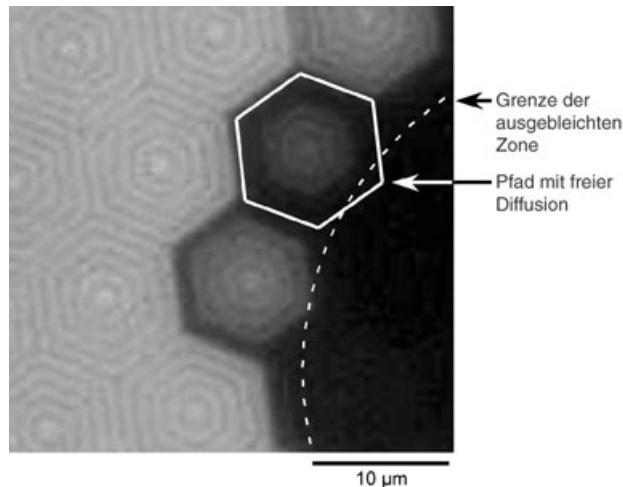


Abbildung 5. Fluoreszenzrückbildung nach Ausbleichen (FRAP, fluorescence recovery after photobleaching) in einer durch den Träger kompartimentierten Membran. Der Träger wurde durch Elektronenstrahl-Lithographie strukturiert. Eine Membran überdeckt die freien Regionen des darunterliegenden Siliciumdioxidträgers und fließt frei innerhalb der durch Diffusion zugänglichen Bereiche. Das erhaltene Muster der Fluoreszenzrückbildung befindet sich im Diffusionsgleichgewicht. (Die Abbildung wurde von K. Mossman zur Verfügung gestellt.)

Die Bildung solcher hybriden Synapsen ermöglicht es, die Beweglichkeit und Position von Zellproteinen räumlich einzugrenzen. Für diese Zellaufteilung benötigt man allerdings Substratmuster von subzellulärer Größe (also im Nanometer-Bereich). Neue Methoden der Membranstrukturierung in Form einer Kombination aus Rastersonden-Lithographie (SPL, scanning probe lithography) mit Gittern aus Diffusionsbarrieren, die mit Elektronenstrahl-Lithographie hergestellt wurden, erweitern die Möglichkeiten der Flüssigmembran-Strukturierung bis hinunter in den Submikrometer-Bereich.^[102]

Membranen können auf Siliciumdioxid-Mikrokügelchen in fast gleicher Weise aufgetragen werden wie auf monolithische Substrate.^[91,103,104] Dies erleichtert die Einführung von membranoberflächengebundenen Signalmolekülen in Zellkulturen. So wurden kürzlich membranumhüllte Mikrokügelchen hergestellt, die die GPI-gebundene Variante des postsynaptischen Zelloberflächenproteins Neuroligin-1 präsentierte. Die funktionalisierten Kügelchen wurden anschließend in eine Kultur primärer Hippocampus-Nervenzellen eingeführt. Durch die Wechselwirkung mit β -Neurexin auf der Oberfläche der Nervenzellen induzierte das Neuroligin-1 die Bildung früher Stadien der Synaptogenese in den Neuronen (Abbildung 6). Die Aktivität von Neuroligin-1 schien die Präsentation in einer Membranumgebung zu erfordern – vermutlich sind Umordnungen dieses Proteins auf der Oberfläche für seine Funktion erforderlich.

3.2. Zelfreie Systeme

Von erheblichem Interesse ist die Entwicklung völlig zellfreier Modellsysteme zur präzisen Analyse von Reaktionsprozessen an Membrankontaktstellen. Solche Modelle wurden mitträgergestützten Membranen auf unterschiedliche Weise hergestellt. Die Kontakte entstehen, wenn man unilamellare Riesenvesikel (GUVs, giant unilamellar vesicles) mitträgergestützten Membranen zusammenbringt. Mit RICM^[105] zur Abbildung der Topographie im Nanometerbereich der so hergestellten Membrankontakte ließ sich eine Reihe von Phänomenen sichtbar machen, darunter die Koexistenz multipler Adhäsionszustände.^[106–109] Eine andere Methode zur Bildung von Kontaktstellen zweier trägergestützter Membranen besteht in der Kombination von Langmuir-Blodgett- und Langmuir-Schaeffer-Transfertechniken für Monoschichten. Zwei Membranen werden durch aufeinander folgende Transfers von vier Monoschichten von einer Luft-Wasser-Grenzfläche auf einen festen Träger aufgetragen. Der Vorteil dabei ist, dass man eine große Oberfläche einheitlich mit einer planaren Membran beschichten kann; dies hat sich auch für Neutronenstreuungsmessungen als nützlich erwiesen.^[110,111] Problematisch sind bei der Langmuir-Methode allerdings das Arbeiten mit Transmembranproteinen und die erforderliche Intermembran-Adhäsion zur Übertragung der Monoschichten; dies schließt die direkte Bildung schwach adhäsiver Zustände an den Kontaktstellen aus (wie weiter unten beschrieben). Ein dritter Typ von Membrankontaktstellen kann durch das Zerreissen von unilamellaren Riesenvesikeln aufträgergestützten Membranen hergestellt werden. Diese Methode liefert planare Kontaktstellen mit einer typischen Größe von 10–50 μm in unterschiedlichen Adhäsionszuständen, die gut für eine Bildherstellung mithilfe von optischen und Rastersondenverfahren geeignet sind.^[112–115] Diese Art von Kontaktstellen hat sich auch als nützlich für die Untersuchung membranvermittelter Reorganisation von Proteinen hin zu geordneten Zuständen erwiesen^[23] und wird in Abschnitt 4.2 im Zusammenhang mit der Abbildung der Membran topographie diskutiert.

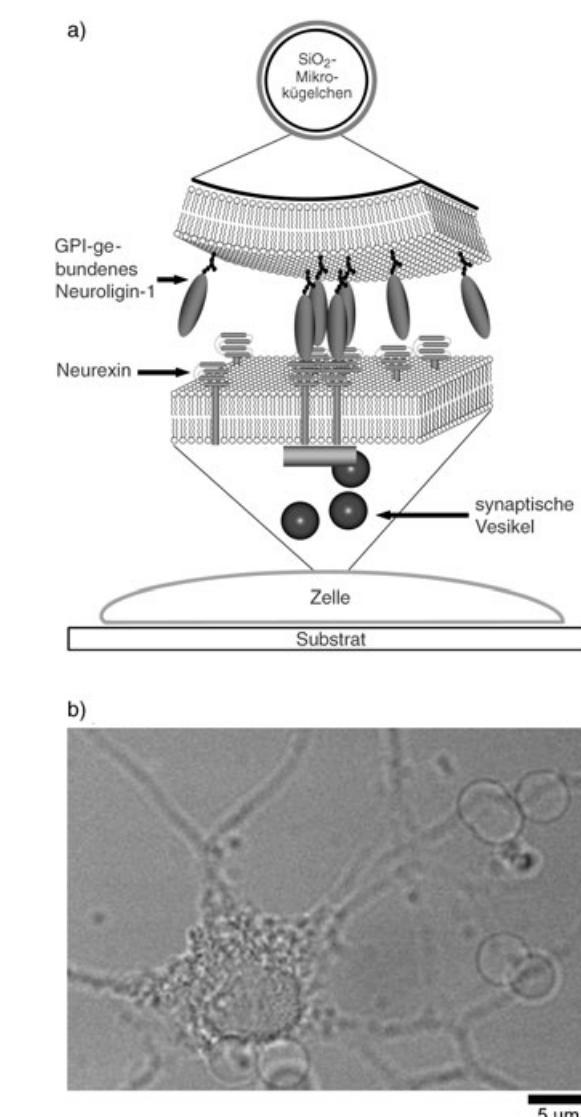


Abbildung 6. a) Membranumhülltes Kügelchen, das die GPI-gebundene Form von Neuroligin-1 trägt. Neuroligin-1 bindet an seinen zugehörigen Rezeptor, β -Neurexin, auf der Oberfläche des Neurons und löst die frühen Stadien der Synaptogenese aus. b) Hellfeld/Phasenkontrast-Aufnahme, auf der die Wechselwirkung zwischen den membranumhüllten Kügelchen und primären Neuronen erkennbar ist. (Die Abbildung wurde von M. Baksh und S. Pautot zur Verfügung gestellt.)

Membran-Membran-Wechselwirkungen können auch anhand des kolloidalen Verhaltens einer Population vom membranbeschichteten Kügelchen charakterisiert werden.^[116,117] Das Verhalten eines kolloidalen Systems wird durch das Potential der paarweisen Wechselwirkung zwischen

den hervorgehoben. Diese Methode liefert planare Kontaktstellen mit einer typischen Größe von 10–50 μm in unterschiedlichen Adhäsionszuständen, die gut für eine Bildherstellung mithilfe von optischen und Rastersondenverfahren geeignet sind.^[112–115] Diese Art von Kontaktstellen hat sich auch als nützlich für die Untersuchung membranvermittelter Reorganisation von Proteinen hin zu geordneten Zuständen erwiesen^[23] und wird in Abschnitt 4.2 im Zusammenhang mit der Abbildung der Membran topographie diskutiert.

Membran-Membran-Wechselwirkungen können auch anhand des kolloidalen Verhaltens einer Population vom membranbeschichteten Kügelchen charakterisiert werden.^[116,117] Das Verhalten eines kolloidalen Systems wird durch das Potential der paarweisen Wechselwirkung zwischen

den Partikeln bestimmt. Im Falle membranderivatisierter Siliciumdioxid-Kügelchen wird dieses Potential von den Wechselwirkungen zwischen den Membranen dominiert. Das Verhalten der gesamten Phase des Systems reagiert damit auf kleine Veränderungen der Membran-Membran-Wechselwirkungen. So vermag die Bindung eines Proteins an einen membranassoziierten Liganden bei einer Dichte von nur einer 10^{-4} -Monoschicht einen Phasenübergang auszulösen. Ein typischer Übergang in eine kolloidale Phase, der durch Proteinbindung an einen Liganden auf der Membranoberfläche ausgelöst wurde, ist in Abbildung 7 gezeigt. Dabei werden membranderivatisierte Kügelchen unter Wasser dispergiert, wo sie sich, der Schwerkraft folgend, auf dem darunterliegenden Substrat absetzen und ein zweidimensionales Kolloid bilden. Die Kügelchen zeigen freie laterale Diffusion und das System verhält sich wie eine ergodische Flüssigkeit. Für hochempfindliche Testsysteme wird die Membranzusammensetzung so eingestellt, dass das Kolloid schwach kondensiert (erstes Bild in Abbildung 7a). Das Kondensat steht im Fließgleichgewicht, einzelne Kügelchen „verdampfen“ ständig und rekondensieren in Clustern. Dabei bleibt die Gesamtstruktur unverändert. Für die quantitative Analyse der kolloidalen Phase wird die Paarverteilungsfunktion $g(r)$ bestimmt.

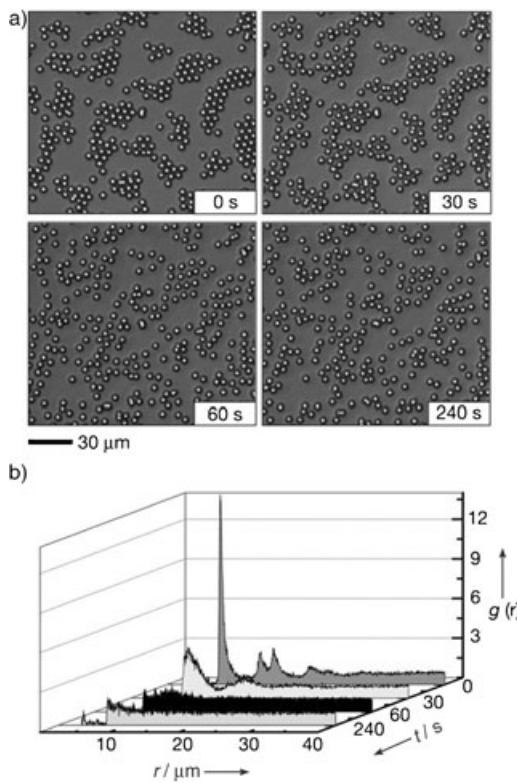


Abbildung 7. Durch Proteinbindung ausgelöster Übergang in eine kolloidale Phase membranbeschichteter Kügelchen. a) Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten, die den Übergang von einer kondensierten in eine disperse kolloidale Phase zeigen. Der Übergang wird durch die Zugabe von Protein (IgG-Antikörper mit einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, spezifisch für einen Liganden auf der Membranoberfläche) ausgelöst. Die Übergänge fanden nur statt, wenn auch der entsprechende Ligand in die Membran eingebaut war. b) Zugehörige Diagramme der Paarverteilungsfunktion $g(r)$ (in bearbeiteter Form aus Lit. [116]).

Man kann auch mehrere Typen membranderivatisierter Kügelchen mischen und Fluoreszenzmarkierungen zur Unterscheidung verwenden. In einem solchen binären Kolloid lassen sich die Wechselwirkungen zwischen membranassoziierten Proteinen durch die Analyse der Kolloidverteilung charakterisieren. Die Verteilungsfunktion für heterogene Paare, die die relativen Positionen der Kügelchen verschieden Typs zählt, gibt ein Maß für die Stärke der Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlich zusammengesetzten Membranen. Diese Strategie zur Charakterisierung von Bindungsaffinitäten von Intermembranproteinen, die einen relativ hohen Durchsatz ermöglicht, könnte für die Erhebung großer Mengen an Proteinbindungsdaten mit Relevanz für interzelluläre Adhäsion und Signalgebung von Nutzen sein.

4. Bildgebende Verfahren

4.1. Fluoreszenzmikroskopie dynamischer Prozesse

Die Fluoreszenzmikroskopie ist ausgesprochen nützlich, um statische und dynamische Aspekte der molekularen Organisation von Membranen abzubilden. Die direkte Abbildung der Fluoreszenz von Sondenmolekülen, die mit Membrankomponenten verknüpft sind, macht sofort in lateraler Auflösung bis hin zur Beugungsgrenze Unterschiede in der Zusammensetzung sichtbar. Mithilfe der quantitativen Analyse der Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb eines bestimmten Volumens wurde der Fluss von mit GFP (green fluorescent protein) markierten TCRs in den c-SMAC während der Bildung der immunologischen Synapse verfolgt.^[65] Eine vergleichbare Strategie lag einer eleganten Versuchsreihe zugrunde, bei der die Menge des Agonisten pMHC in einer T-Zellsynapse Molekül für Molekül gezählt wurde.^[118] Dieser Wert wurde dann mit der intrazellulären Signalaktivität korreliert, um nachzuweisen, dass ein einzelner agonistischer pMHC-Ligand ein transientes TCR-Signal auslösen kann. Noch interessanter ist, dass die Blockierung des Costimulators CD4 die Empfindlichkeit der TCR-Signalgebung spürbar reduzierte; dies lässt auf eine Funktion von CD4 bei der Signalverstärkung schließen. Diese Experimente verdeutlichen, mit welcher enormen Detailgenauigkeit die Vorgänge bei der Signaltransduktion in immunologischen Synapsen auf molekularer Ebene inzwischen verfolgt werden können. Die Signalgebung selbst wurde auf konventionelle Weise mithilfe des calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2AM, mit dem die T-Zellen beladen wurden, beobachtet. Einzelne pMHC-Agonisten wurden mit dem Phycobiliprotein Phycoerythrin markiert. Phycoerythrin ist ein ca. 240 kDa schweres Protein mit ca. 34 Fluorophoren, die es zu einem extrem stark fluoreszierenden Einzelmolekül machen, das durch konfokale Mikroskopie beobachtet werden kann.

Mittlerweile werden von einigen Arbeitsgruppen Einzelmoleküle beobachtet, um auf diese Weise Molekülbewegungen während der Synapsenbildung nachzuvollziehen. Dazu setzen sie die Total-Internal-Reflection-Fluorescence(TIRF)-Mikroskopie ein. Bei der Objektivlinsen-Variante der TIRF-Mikroskopie wird ein Laserstrahl außerhalb des Zentrums auf die rückseitige Brennebene eines Objektivs mit sehr

hoher numerischer Apertur (z.B. NA = 1.45) fokussiert. Der Strahl wird dann durch die Objektivlinse parallel ausgerichtet und tritt unter einem Glanzwinkel aus. Trifft der Strahl dann auf die Probe, wird er an der Grenzfläche Deckglas/Wasser nach innen totalreflektiert. Nur ein evaneszentes Feld durchdringt die Probe und regt die Fluorophore innerhalb einer dünnen Schicht von etwa 50–100 nm oberhalb des Deckglases an. Dies ist ideal zur Abbildung von Molekülen in Synapsen mit trägergestützten Membranen. Der besonders niedrige Fluoreszenzhintergrund der TIRF-Mikroskopie macht die einfache Beobachtung von einzelnen Fluorophoren möglich; dementsprechend sollte diese Methode die Eignung der Einzelmolekülbeobachtung in hybriden Synapsen stark verbessern. Ein Beispiel für einen Versuchsaufbau und repräsentative Diffusionsspuren von Einzelmolekülen in einer trägergestützten Membran sind in Abbildung 8a und b gezeigt.

Eine andere nützliche Methode zur Bestimmung der molekularen Beweglichkeit ist die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS). In den 1970er Jahren entwickelt,^[119] hat

die FCS in letzter Zeit eine Renaissance erfahren, ausgelöst durch die Verfügbarkeit von schnellen Hardware-Korrelatoren, empfindlichen Lawinenphotodioden (APD, avalanche photodiodes) und Objektiven mit extrem hoher numerischer Apertur.^[120–125] Bei der Anwendung der FCS an Membransystemen wird normalerweise ein Laserstrahl durch ein Objektiv hoher Apertur in Form einer beugungsbegrenzten Einschnürung fokussiert (<0.5 μm). Die Diffusion von Fluorophoren in das Anregungsvolumen hinein und aus diesem heraus erzeugt zeitlich korrelierte Fluktuationen in der Intensität (Abbildung 8c und d). Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die Diffusion der Fluorophore innerhalb des Anregungsvolumens. Kreuzkorrelationen zwischen Signalen verschiedenfarbiger Fluorophore können spezifische molekulare Wechselwirkungen aufdecken. Solche Beobachtungen können besonders nützlich sein, um die spezifischen Sequenzen molekularer Wechselwirkungen zu ermitteln, die in immunologischen Synapsen ablaufen. Auch hier sind die vereinfachten hybriden Synapsen aus lebenden Zellen und trägergestützten Membranen sicher sehr hilfreich.

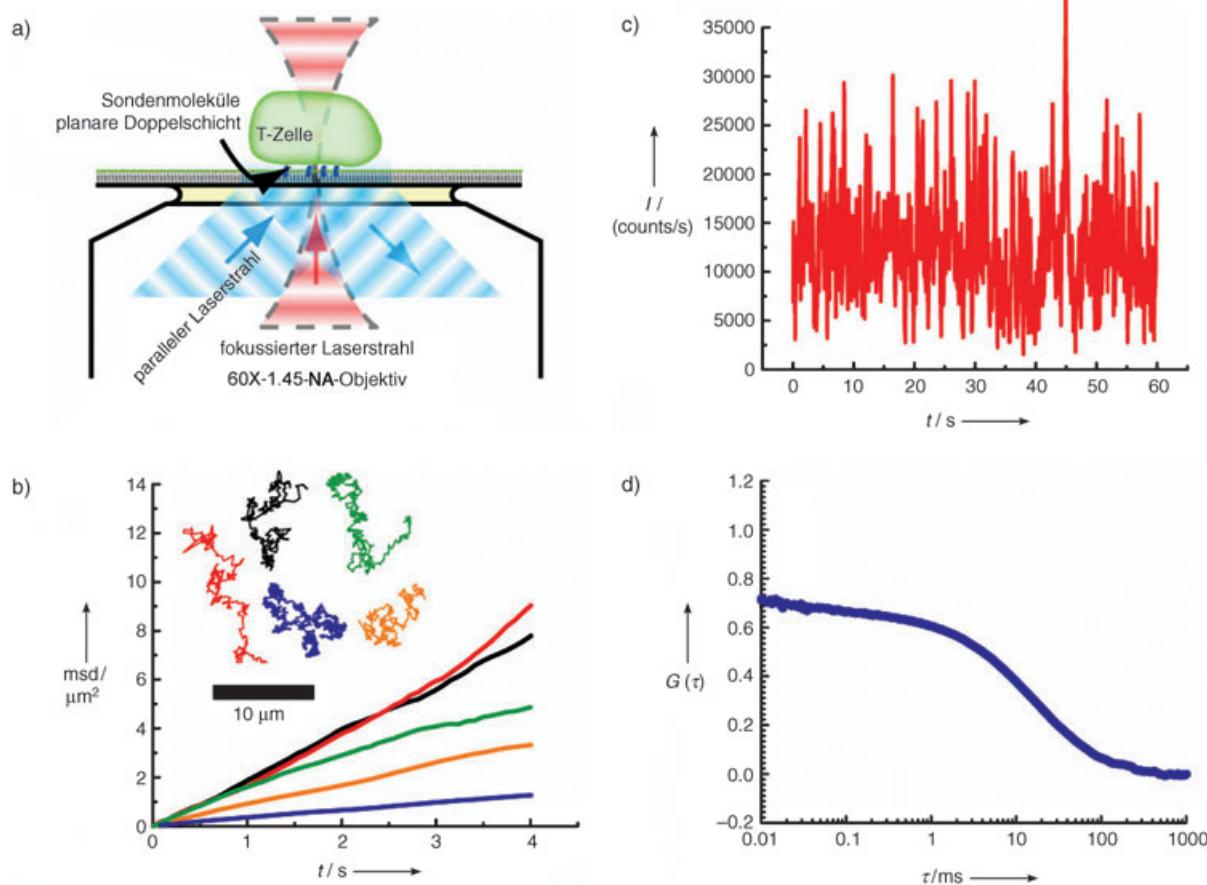


Abbildung 8. a) Kombiniertes System von TIRF- und FCS-Mikroskopie. Der parallel ausgerichtete TIRF-Anregungsstrahl (blau) verlässt das Objektiv unter einem Glanzwinkel, wird an der Grenzschicht zwischen Deckglas und Probe totalreflektiert und erzeugt dabei ein evaneszentes Feld an der Oberfläche. Die FCS-Anregung (rot) ist eng auf die Probengrenzfläche fokussiert. b) Charakteristische, mit TIRF-Mikroskopie aufgenommene Diffusionsspuren von Einzelmolekülen zusammen mit Diagrammen der durchschnittlichen Flächenbedeckung (msd , mean square displacement) fluoreszenzmarkierter Proteine, die an eine trägergestützte Membran gebunden sind. c) Zeitliche Schwankungen der Fluoreszenzintensität I , gemessen mit fokussierter Anregung (FCS-Messung), zeigen die Bewegungen fluoreszenzmarkierter Antikörper an, die an eine trägergestützte Membran gebunden sind. Die Schwankungen entstehen, wenn die Moleküle in das Anregungszentrum hinein- und aus diesem wieder hinausdiffundieren. d) Die Autokorrelation der Intensitätsschwankungen kann zur Quantifizierung der Molekularbewegung herangezogen werden. (Die Abbildung wurde von M. Forstner und A. Demond zur Verfügung gestellt).

4.2. Topographische Bildgebung

Zum besseren Verständnis räumlicher Einflussfaktoren in der immunologischen Synapse sind bildgebende Verfahren notwendig, die die Topographie der Membrankontaktstellen im Nanometerbereich auflösen können. Zwei kürzlich entwickelte Fluoreszenzabbildungstechniken ermöglichen das topographische Abbilden der Membrankontaktstellen im Subnanometer-Bereich in Echtzeit. Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) zwischen Membranen ist ausgesprochen empfindlich bei Membranabständen von bis zu 10 nm. Oberhalb dieses Bereichs ist die optische Interferometrie besonders nützlich. RICM war für über zehn Jahre die bestimmende Methode zur Abbildung topographischer Eigenschaften von Membranen in der Nähe von Oberflächen^[105–108,126–129] (ein aktueller Übersichtsartikel findet sich in Lit. [109]). In jüngster Zeit hat allerdings die Fluoreszenzinterferenzkontrast(FLIC)-Mikroskopie als leistungsfähige Alternative zu RICM an Bedeutung gewonnen.^[112,114,130,131] FRET- und FLIC-Verfahren zur Abbildung der Topographie an Membrankontaktstellen sind im Folgenden vorgestellt. Ein detaillierter Überblick über die optischen Grundlagen und die Implementierung dieser Techniken wird an anderer Stelle gegeben.^[132]

FRET findet zwischen Membranen statt, die mit komplementären Fluoreszenzsonden markiert wurden, wenn der Membran-Membran-Abstand in der Größenordnung des Förster-Abstandes des Farbstoffpaars (ca. 5 nm) liegt. Eine quantitative Analyse der FRET-Effizienz ermöglicht die Bestimmung des Abstandes zwischen den Membranen mit einer Genauigkeit im Subnanometerbereich.^[112,113] Ein allgemeines Schema für die Interpretation der FRET-Daten ist in Abbildung 9 gezeigt. Die Geschwindigkeit k_T des strahlungsfreien Energieübergangs von einem Donor auf eine Population von Acceptor, die in einer gegenüberliegenden Ebene verteilt sind, ergibt sich aus Gleichung (1).

$$k_T = \frac{\sigma \pi R_0^6}{2 \tau_D z^4} \quad (1)$$

Dabei ist σ die Konzentration der Acceptor-moleküle, R_0 der Förster-Abstand (5 nm für das Paar Texasrot/NBD^[133]), τ_D die Lebensdauer der Fluoreszenz des Donors in Abwesenheit des Acceptors und z der Abstand zwischen dem Donor und der Acceptor-Ebene. Zwei Hälften der Doppelschichtmembran ergeben zwei Acceptor-ebenen, die ca. 4 nm voneinander entfernt sind. Das NBD-Chromophor des üblicherweise verwendeten, am Schwanz markierten NBDPC (1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]decanoyl]-sn-glycerin-3-phosphocholin) lagert sich vorwiegend in der Region des Glycerins und des oberen Kettenbereichs der Membran ein.^[134] Für die Analyse kann man davon ausgehen, dass es nur eine Ebene besetzt. Die Gesamteffizienz E des FRET-Prozesses erhält man durch Aufsummieren der verschiedenen Übertragungswege, die in Gleichung (2) mit Hochkomma gekennzeichnet sind. Die Analyse der FRET-Effizienz nach den Gleichungen (1) und (2) ergibt den Abstand zwischen den Ebenen der Sondenmoleküle.

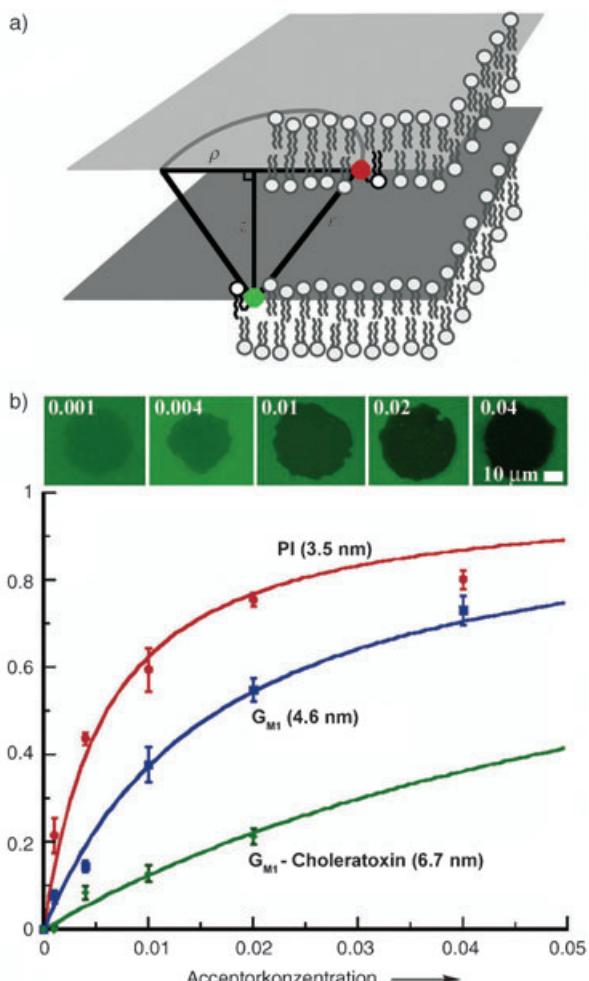


Abbildung 9. a) Schema zur Interpretation von FRET zwischen Membranen. Ein einzelnes Sondenmolekül in einer Membran kann im Allgemeinen durch Resonanz Energie auf eines von vielen Farbstoffmolekülen in der gegenüberliegenden Membran übertragen. Dies führt zu einer Abhängigkeit der FRET-Effizienz in vierter Potenz von z , im Unterschied zu der kanonischen Abhängigkeit sechster Potenz, die normalerweise einem FRET mit einer Eins-zu-Eins-Zuordnung von Donor und Acceptor zugrundegelegt wird. b) Daten zur FRET-Effizienz für PI-, G_{M1} - und G_{M1} -Choleratoxin-Membrankontaktstellen. Die Bildsequenz zeigt FRET-Daten von PI-Kontaktstellen für jede Acceptor-Konzentration (Texasrot-DHPE, Molenbruch σ wie angegeben; DPPE = *N*-(Texasrot-Sulfonyl)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin). Die durchgezogenen Kurven sind mithilfe von Gleichung (2) mit den angegebenen Abständen zwischen den Membranen (z) berechnet (in bearbeiteter Form aus Lit. [113]).

$$E = \frac{k'_T + k''_T}{k'_T + k''_T + 1/\tau_D} \quad (2)$$

Anpassungsfunktionen der quantitativen Messungen der FRET-Effizienz gemäß Gleichung (2) liefern den durchschnittlichen Abstand z zwischen den Fluorophoren verschiedener Membranen. Berechnete FRET-Effizienz-Kurven und gemessene Werte sind in Abbildung 9 gegen die Acceptor-Konzentration aufgetragen. Die Ergebnisse lassen auf durchschnittliche Abstände von 3.5, 4.6 und 6.7 nm für die PI-, G_{M1} - und G_{M1} -Choleratoxin-Kontaktstellen schließen (PI = Phos-

Membrankontaktstellen

phatidylinositol, $G_{M1} = \text{Gal}\beta1\text{-}3\text{GalNAc}\beta1\text{-}4(\text{NeuAca}2\text{-}3)\text{Gal}\beta1\text{-}4\text{Glc}\beta1\text{-}1'\text{-ceramid}$). Für das Texasrot-NBD-Paar wird ein Schätzwert von $R_0 = 5 \text{ nm}$ zugrunde gelegt,^[133] und für die Sonden in den beiden Membranschichten wurde bei der Texasrot-DPPE-Doppelschicht eine Distanz von 4 nm bestimmt. Für eine Besetzung beider Ebenen durch den Donor wurden keine Korrekturen durchgeführt, denn es gibt Hinweise, dass die negativ geladenen Sonden in der oberen Schicht einer trägergestützten Membran, die durch die Fusion kleiner unilamellarer Vesikel gebildet wurde, stark angereichert werden.^[135] Die Absolutwerte dieser Abstände hängen von den R_0 -Schätzwerten und in einem geringeren Ausmaß vom Abstand zwischen den beiden Membranschichten ab. Die erhaltenen relativen Abstände sind allerdings präzise. So ergibt beispielsweise die Röntgenstrukturanalyse von Mehrfach-Doppelschichten unter osmotischem Stress, dass G_{M1} 1.2 nm über die Oberfläche der Phosphatidylcholinmembran hinausragt,^[136] wir bestimmten einen Unterschied von 1.1 nm für den durch G_{M1} induzierten Membranabstand, relativ zu der DMPC-Membrankontaktstelle (DMPC = Dimyristoylphosphatidylcholin). Die Höhe des G_{M1} -Choleratoxin-Komplexes, die aus dem FRET zwischen den Membranen zu 3.2 nm bestimmt wurde, stimmt mit den Strukturinformationen aus der Röntgenkristallographie überein.^[137] Die am höchsten aufgelösten Messungen des Membranabstandes erhält man durch die Quantifizierung der FRET-Effizienz bei unterschiedlichen Acceptor-Konzentrationen; für Messungen zum Zweck der Bildgebung genügt dagegen eine einzige Acceptor-Konzentration. FRET ist ein Prozess mit kurzer Reichweite (10 nm), der nicht zur Auflösung topographischer Eigenschaften größerer Bereiche geeignet ist.

Für Messungen von Membran-Membran-Abständen jenseits der FRET-Reichweite eignet sich die FLIC-Mikroskopie.^[112, 114, 130, 131] Bei dieser Methode wird die räumliche Veränderung der Intensität innerhalb einer stehenden Lichtwelle genutzt, um die Fluoreszenzintensität von Sonden als Funktion ihrer Position entlang der optischen Achse zu modulieren, die bei dieser Versuchsanordnung senkrecht zur Grenzfläche steht. Ein entsprechendes Schema ist in Abbildung 10 mit einem oxidierten Silicium-Wafer gezeigt. Die optische Reflexion findet hauptsächlich an der Grenzfläche zwischen Silicium und Siliciumdioxid statt. Die Oxidschicht bietet einen kontrollierbaren Abstandhalter, der eine optimale Positionierung der Systemkomponenten relativ zu der stehenden Welle ermöglicht. Für Proteine an Grenzflächen von trägergestützten Membranen eignet sich eine 60 nm dicke Oxidschicht. Mit FLIC-Mikroskopie lassen sich Auflösungen im Nanometerbereich erzielen und dabei topographische Merkmale erfassen, die sich Hunderte von Nanometern von der Hauptebene entfernt befinden. Die FLIC-Intensitätsbilder können mithilfe der vereinfachten Beziehung für die Fluoreszenzintensität I_F gemäß Gleichung (3) in dreidimensionale Topographie-Daten umgewandelt werden.

$$I_F \propto \left((1 - r_f)^2 + 4 r_f \sin^2 \left(\frac{\phi_{ex}}{2} \right) \right) \left((1 - r_f)^2 + 4 r_f \sin^2 \left(\frac{\phi_{em}}{2} \right) \right) \quad (3)$$

Diese Gleichung ist von grundlegenden optischen Prinzipien abgeleitet.^[138] ϕ_{ex} und ϕ_{em} errechnen sich aus $(4\pi/$

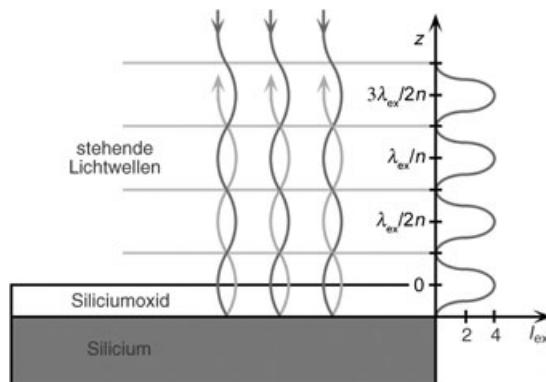


Abbildung 10. Schema eines FLIC-Aufbaus mit einem oxidierten Silicium-Wafer als Substrat. Die Reflexion an der Silicium-Silikumdioxid-Grenzfläche erzeugt gegenläufige Wellen des Anregungslichts, die eine stehende Welle mit räumlich variierender optischer Intensität bilden. Das Muster der Anregungsintensität, aufgetragen entlang der rechten vertikalen Achse, hat eine räumliche Periodizität von $\lambda/2$. Die emittierte Fluoreszenz unterliegt auch einer Selbstinterferenz der Photonen (hier nicht eingezeichnet), die sich dem Anregungsmuster überlagert.

$\lambda_{ex})(n_w z + n_o z_o)$ bzw. $(4\pi/\lambda_{em})(n_w z + n_o z_o)$. n_w und n_o sind die Brechungsindizes von Wasser (1.33) und Siliciumdioxid (1.46), z ist die Höhe über der Oxidoberfläche und z_o die Dicke der Oxidschicht. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen λ_{ex} und λ_{em} betragen bei Verwendung des Texasrot-Fluorophors 560 und 645 nm. Der Reflexionskoeffizient r_f der Silicium-Silikumdioxid-Grenzfläche beträgt 0.46 bei 645 nm. Diese Näherung hat einen maximalen Fehler von ca. 2 nm über den Entfernungsbereich bei typischen Experimenten an Kontaktstellen mit trägergestützten Membranen (5–75 nm); aufwändigeren Rechnungen berücksichtigen den Ausbreitungswinkel des eingestrahlten und gesammelten Lichts sowie die spektrale Bandbreite.^[115, 130–132]

Beispiele für die FLIC-mikroskopische Aufklärung der Membrantopographie an Kontaktstellen von trägergestützten Membranen sind in den Abbildungen 11 und 12 veranschaulicht. Eine wichtige Eigenschaft der oberen Membran in einer Kontaktstelle mit einer trägergestützten Membran ist die Existenz zweier unterschiedlicher Zustände für die Adhäsion an die untere Membranschicht. Der erste, als Typ 1 bezeichnet, ist durch einen einheitlichen FRET charakterisiert, was auf einen Abstand zwischen den Membranen von einigen Nanometern hindeutet. Im zweiten Zustand (Typ 2) werden große Abstände zwischen den Membranen (ca. 50 nm) durch ein Zusammenwirken von (entropischer) Helfrich-Abstoßung^[139] und gelegentlichen Adhäsionsstellen, die die beiden Membranen zusammenheften, aufrechterhalten. Bei diesen Typ-2-Kontakten lässt sich kein FRET zwischen den Membranen nachweisen, und die FLIC-Daten zeigen weitreichende thermische Schwankungen. Von den beiden Kontakttypen sind Schemata, FLIC-Bilder und Karten der rekonstruierten Oberflächentopographie beispielhaft in Abbildung 11 zusammengefasst. FLIC-Mikroskopie lässt sich einfach in Echtzeit durchführen, was die dynamische Beobachtung topographischer Membranfluktuationen ermöglicht. Der Typ-2-Kontakt in Abbildung 11 durchläuft Fluktuationen mit einer Amplitude mit einem quadratischen Mittelwert von

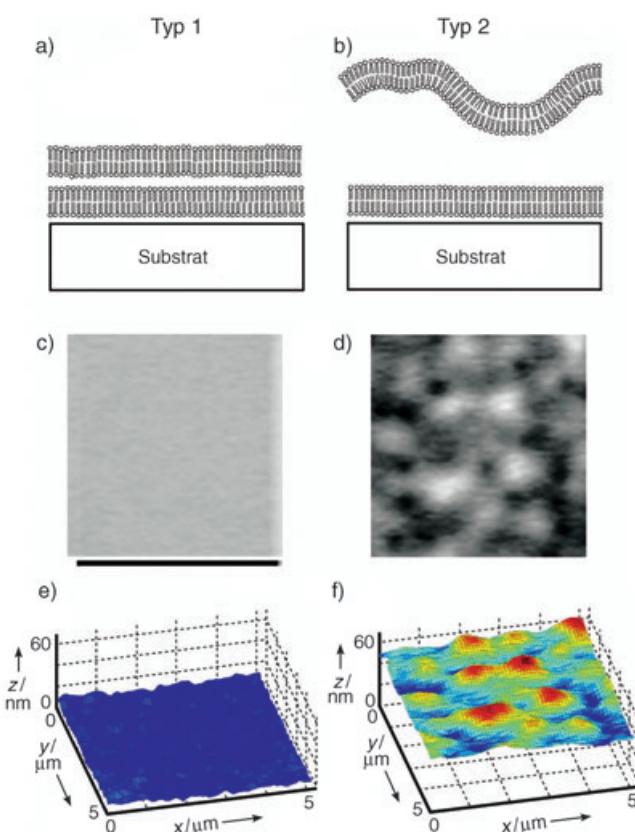


Abbildung 11. Kontaktstellen von Typ 1 (a) und Typ 2 (b). Die zugehörigen FLIC-Abbildungen und topographischen Karten [berechnet nach Gl. (3)] sind in (c), (d), (e) und (f) gezeigt. Die Topographie der Typ-2-Kontakte ist dynamisch und fluktuiert zufällig mit einer charakteristischen Korrelationszeit von ca. 1 s. (Die Abbildung wurde von Y. Kaizuka zur Verfügung gestellt.)

ca. 4 nm, einer lateralen räumlichen Korrelationslänge von ca. 340 nm und einer Korrelationszeit von ca. 1 s. Alle Werte wurden FLIC-mikroskopisch bestimmt.^[114]

Die Kombination von FLIC-Mikroskopie mit konventionellen Fluoreszenzaufnahmen (und FRET) kann sehr detaillierte dreidimensionale Informationen über die Organisation von Proteinen und Lipiden an Membrankontaktstellen liefern. Bilder einer solchen Membrankontaktstelle, in der sich membrangebundene Antikörperproteine aufgrund von Adhäsionswechselwirkungen zwischen den beiden Membranen in Mustern anordnen, sind in Abbildung 12 zu sehen. Eine FLIC-Abbildung von Sondenmolekülen in der oberen Membran ist in Abbildung 12a dargestellt, das direkte Fluoreszenzbild der Antikörper in Abbildung 12b. Eine topographische Karte, berechnet aus den FLIC-Daten von Abbildung 12a, ist in Abbildung 12c abgebildet. Die membrangebundenen Antikörper diffundieren frei auf der Membranoberfläche außerhalb der Kontaktstelle. Innerhalb der Kontaktstelle sind die Antikörper in Mustern eingeschlossen und verlieren viel von ihrer lateralen Mobilität. Die Antikörpermobilität kann durch die Fluoreszenzrückbildung nach Ausbleichen (FRAP), durch Verfolgen von Einzelmolekülen oder FCS bestimmt werden. Aus der topographischen Karte ist für die Hügel und Täler dieser Kontaktstelle eine Höhendifferenz von ca. 12 nm ersichtlich, was in etwa der Größe

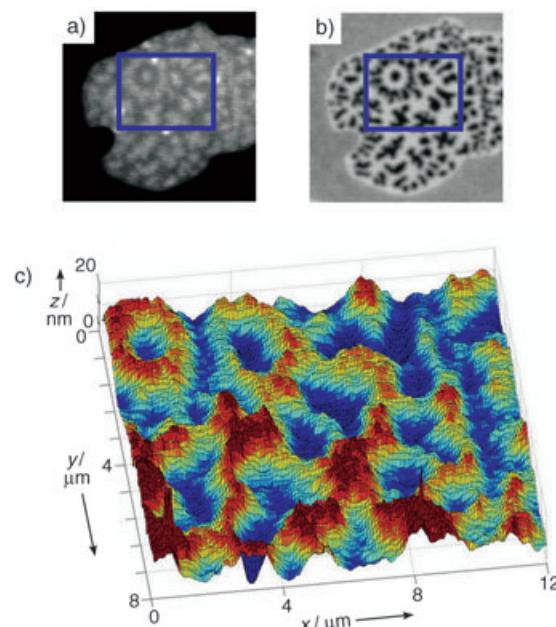


Abbildung 12. Eine Kontaktstelle zwischen trügergestützten Membranen, in der Antikörper an die untere Membran gebunden sind. Eine FLIC-Abbildung der oberen Membran (a) enthüllt topographische Eigenschaften, die die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Antikörper (b) in der Kontaktstelle widerspiegeln. c) Topographische Karte der in (a) und (b) markierten Region der Kontaktstelle. Die Topographie dieser Protein-Membrankontaktstelle ist statisch. (Die Abbildung wurde von R. Parthasarathy zur Verfügung gestellt.)

eines Antikörpers entspricht. Die Konformation der Membran folgt also der Topographie der Grenzfläche. Dieser Kontakt kann daher dem Typ 1 zugeordnet werden. Im Unterschied zum Typ-2-Kontakt in Abbildung 11 ist die Topographie der Protein-Membrankontaktstelle in Abbildung 12 statisch. FLIC-Messungen eignen sich gut, um solche Unterscheidungen zu treffen. Zusätzlich wurde durch FRET-Messungen bestätigt, dass sich die Täler in der oberen Membran bis auf wenige Nanometer der unteren Membran annähern.^[115] Die Kombination mit FRET kann die absolute Auflösung von FLIC-Messungen steigern, da auf diese Weise Mehrdeutigkeiten, die sich unausweichlich bei bildgebenden Interferenzverfahren ergeben, geklärt werden können.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Oberflächen von Zellmembranen bieten eine ausgesprochen dynamische und empfindliche Umgebung, in der das Zusammenwirken chemischer und mechanischer Kräfte eine breite Palette kollektiver chemischer Antwortprozesse verursacht. Die natürliche Fluidität und Flexibilität der Membranen ermöglichen Reaktionen auf chemische Wechselwirkungen, die man bei anorganischen Materialien normalerweise nicht findet. Hochkooperative Antwortprozesse, die chemische Bindungseignisse mit der Bildung räumlicher Muster verbinden, stellen sich als allgemeine Themen bei Zell-Zell-Wechselwirkungen heraus. Die immunologischen Synapsen, die hier kurz diskutiert wurden, sind zurzeit die am

besten untersuchten Beispiele für solche Phänomene. Wechselwirkungen von Immunzellen sind attraktive Systeme für quantitative Untersuchungen, die zum Verständnis der physikochemischen Abläufe beitragen, die solche Ereignisse vorantreiben und regulieren. Die Charakterisierung immunologischer Synapsen kann außerdem grundlegende Mechanismen enthüllen, die vielen interzellulären Signalprozessen gemeinsam sind – so sind die physikalischen Merkmale der Immunzellkontakte wahrscheinlich bei Kontaktstellen zwischen Membranen generell zu finden. Die Anwendung neuer bildgebender und präparativer Techniken auf rekonstituierte Membransysteme und hybride Synapsen ist ein Beispiel für das vielversprechende Zusammenwirken von physikalischer Chemie und Zellbiologie. Dies mag letztlich ein wenig dabei helfen, zu verstehen, wie aus Molekülen Leben wird.

Ich danke meinen vielen Studenten, Postdoktoranden und Kollegen, die zu diesen Projekten beigetragen haben. Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die National Institutes of Health (NIH), das Department of Energy (DOE), die National Science Foundation (NSF), den Burroughs Wellcome Fund, das Searle Scholars Program, die Beckman Foundation und den Hellman Family Faculty Fund. Die Wasserfarbenzeichnung im Vortitel wurde von Dr. Raghuveer Parthasarathy gestaltet.

Eingegangen am 19. Juni 2004,
veränderte Fassung am 15. Oktober 2004
Online veröffentlicht am 21. April 2005
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] D. Bray, M. D. Levin, C. J. Morton-Firth, *Nature* **1998**, 393, 85.
- [2] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754.
- [3] F. G. Giancotti, E. Rouslahti, *Science* **1999**, 285, 1028.
- [4] G. Maheshwari, G. Brown, D. A. Lauffenberger, A. Wells, L. G. Griffith, *J. Cell Sci.* **2000**, 113, 1677.
- [5] J. E. Gestwicki, L. L. Kiessling, *Nature* **2002**, 415, 81.
- [6] M. N. Teruel, T. Meyer, *Cell* **2000**, 103, 181.
- [7] C. R. F. Monks, B. A. Freidberg, H. Kupfer, N. Sciaky, A. Kupfer, *Nature* **1998**, 395, 82.
- [8] A. Grakoui, S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, M. L. Dustin, *Science* **1999**, 285, 221.
- [9] D. M. Davis, I. Chiu, M. Fasset, G. B. Cohen, O. Mandelboim, J. L. Strominger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 15062.
- [10] D. M. Davis, *TRENDS Immunol.* **2002**, 23, 356.
- [11] P. A. van der Merwe, S. J. Davis, *Science* **2002**, 295, 1479.
- [12] M. L. Dustin, D. R. Colman, *Science* **2002**, 298, 785.
- [13] M. M. Davis, M. Krosgaard, J. B. Huppa, C. Sumen, M. A. Purhoo, D. J. Irvine, L. C. Wu, L. Erlich, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 717.
- [14] J. B. Huppa, M. M. Davis, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3, 973.
- [15] D. M. Davis, M. L. Dustin, *TRENDS Immunol.* **2004**, 25, 323.
- [16] P. A. van der Merwe, *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, 14, 293.
- [17] C. Wülfing, I. Tskvitaria-Fuller, N. Burroughs, M. D. Sjaastad, J. Klem, J. D. Schatzle, *Immunol. Rev.* **2002**, 189, 64.
- [18] C. L. Fuller, V. L. Braciale, L. E. Samelson, *Immunol. Rev.* **2003**, 191, 220.
- [19] S. Y. Qi, J. T. Groves, A. K. Chakraborty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 6548.
- [20] T. R. Weikl, J. T. Groves, R. Lipowsky, *Europhys. Lett.* **2002**, 59, 916.
- [21] N. J. Burroughs, C. Wülfing, *Biophys. J.* **2002**, 83, 1784.
- [22] A. K. Chakraborty, *AICHE J.* **2003**, 49, 1614.
- [23] R. Parthasarathy, J. T. Groves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 12798.
- [24] R. Imbihl, G. Ertl, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 697.
- [25] M. Kim, M. Bertram, M. Pollmann, A. von Oertzen, A. S. Mikhailov, H. H. Rotermund, G. Ertl, *Science* **2001**, 292, 1357.
- [26] C. Sachs, M. Hildebrandt, S. Völken, J. Wintterlin, G. Ertl, *Science* **2001**, 293, 1635.
- [27] S. K. Bromley, W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, M. L. Dustin, *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, 19, 375.
- [28] M. L. Dustin, S. K. Bromley, M. M. Davis, C. Zhu, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, 17, 133.
- [29] M. F. Krummel, M. M. Davis, *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, 14, 66.
- [30] F. E. McCann, K. Suhling, L. M. Carlin, K. Eleme, S. B. Taner, K. Yanagi, B. Vanherberghen, P. M. W. French, D. M. Davis, *Immunol. Rev.* **2002**, 189, 179.
- [31] Y. M. Vyas, H. Maniar, B. Dupont, *Immunol. Rev.* **2002**, 189, 161.
- [32] M. F. Krummel, M. D. Sjaastad, C. Wülfing, M. Davis, *Science* **2000**, 289, 1349.
- [33] K.-H. Lee, A. D. Holdorf, M. Dustin, A. Chan, P. M. Allen, A. S. Shaw, *Science* **2002**, 295, 1539.
- [34] S. Stoll, J. Delon, T. M. Brotz, R. N. Germain, *Science* **2002**, 296, 1873.
- [35] Y. M. Vyas, K. M. Mehta, M. Morgan, H. Maniar, L. Butros, S. Jung, J. K. Burkhardt, B. Dupont, *J. Immunol.* **2001**, 167, 4358.
- [36] S.-Y. Tseng, M. L. Dustin, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14, 575.
- [37] G. Werlen, E. Palmer, *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, 14, 299.
- [38] T. N. Sims, M. L. Dustin, *Immunol. Rev.* **2002**, 186, 101.
- [39] C. W. Arendt, B. Albrecht, T. J. Soos, D. R. Littman, *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, 14, 323.
- [40] C. Wülfing, M. M. Davis, *Science* **1998**, 282, 2266.
- [41] M. L. Dustin, J. A. Cooper, *Nat. Immunol.* **2000**, 1, 23.
- [42] V. Das, B. Nal, A. Roumier, V. Meas-Yedid, C. Zimmer, J.-C. Olivo-Marin, P. Roux, P. Ferrier, A. Dautry-Varsat, A. Alcover, *Immunol. Rev.* **2002**, 189, 123.
- [43] A. Viola, S. Schroeder, Y. Sakakibara, A. Lanzavecchia, *Science* **1999**, 283, 680.
- [44] M. L. Dustin, *J. Clin. Invest.* **2002**, 109, 155.
- [45] M. Dykstra, A. Cherukuri, H. W. Sohn, S. J. Tzeng, S. K. Pierce, *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, 21, 457.
- [46] P. Pizzo, E. Giurisato, A. Bigsten, M. Tassi, R. Tavano, A. Shaw, A. Viola, *Immunol. Lett.* **2004**, 91, 3.
- [47] L. I. Richie, P. J. R. Ebert, L. C. Wu, M. F. Krummel, J. J. T. Owen, M. M. Davis, *Immunity* **2002**, 16, 595.
- [48] E. Hailman, W. R. Burack, A. S. Shaw, M. L. Dustin, P. M. Allen, *Immunity* **2002**, 16, 839.
- [49] S.-J. E. Lee, Y. Hori, A. K. Chakraborty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 4383.
- [50] J. T. Groves, M. L. Dustin, *J. Immunol. Methods* **2003**, 278, 19.
- [51] E. Donnadieu, P. Revy, A. Trautmann, *Immunology* **2001**, 103, 417.
- [52] F. E. McCann, B. Vanherberghen, K. Eleme, L. M. Carlin, R. J. Newsam, D. Goulding, D. M. Davis, *J. Immunol.* **2003**, 170, 2862.
- [53] K.-H. Lee, A. R. Dinner, C. Tu, G. Campi, S. Raychaudhuri, R. Varma, T. N. Sims, W. R. Burack, H. Wu, J. Wang, O. Kanagawa, M. Markiewicz, P. M. Allen, M. L. Dustin, A. K. Chakraborty, A. S. Shaw, *Science* **2003**, 302, 1218.
- [54] J. C. Stinchcombe, G. Bossi, S. Booth, G. M. Griffiths, *Immunity* **2001**, 15, 751.

- [55] D. McDonald, L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, T. J. Hope, *Science* **2003**, *300*, 1295.
- [56] D. Derse, G. Heidecker, *Science* **2003**, *299*, 1670.
- [57] T. Igakura, J. C. Stinchcombe, P. K. C. Goon, G. P. Taylor, J. N. Weber, G. M. Griffiths, Y. Tanaka, M. Osame, C. R. M. Bangham, *Science* **2003**, *299*, 1713.
- [58] J.-N. Tournier, A. Q. Hellmann, *TRENDS Immunol.* **2003**, *24*, 114.
- [59] P. Aucouturier, R. I. Carp, C. Carnaud, T. Wisniewski, *Clin. Immunol.* **2000**, *96*, 79.
- [60] G. S. Huh, L. M. Boulanger, H. Du, P. A. Riquelme, T. M. Brotz, C. J. Shatz, *Science* **2000**, *290*, 2155.
- [61] A. A. Khan, C. Bose, L. S. Yam, M. J. Soloski, F. Rupp, *Science* **2001**, *292*, 1681.
- [62] G. Bezakova, M. A. Ruegg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 295.
- [63] R. Tordjman, Y. Lepelletier, V. Lemarchandel, M. Cambot, P. Gaulard, O. Hermine, P.-H. Roméo, *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 477.
- [64] C. Wülfing, F. Rupp, *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 418.
- [65] W. C. Moss, D. J. Irvine, M. M. Davis, M. F. Krummel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15024.
- [66] C. Wülfing, A. Bauch, G. R. Crabtree, M. M. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10150.
- [67] S. Valensin, S. R. Paccani, C. Olivieri, D. Mercati, S. Pacini, L. Patrussi, T. Hirst, P. Lupetti, C. T. Baldari, *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 435.
- [68] J. R. Kuhn, M. Poenie, *Immunity* **2002**, *16*, 111.
- [69] R. D. Huby, A. Weiss, S. C. Ley, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12024.
- [70] I. Tskvitaria-Fuller, A. L. Rozelle, H. L. Yin, C. Wülfing, *J. Immunol.* **2003**, *171*, 2287.
- [71] S. Faure, L. I. Salazar-Fontana, M. Semichon, V. L. J. Tybulewicz, G. Bismuth, A. Trautmann, R. N. Germain, J. Delon, *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 272.
- [72] A. Gautreau, D. Louvard, M. Arpin, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 104.
- [73] J. Delon, K. Kaibuchi, R. N. Germain, *Immunity* **2001**, *15*, 691.
- [74] A. S. Shaw, M. L. Dustin, *Immunity* **1997**, *6*, 361.
- [75] M. K. Wild, A. Cambiaggi, M. H. Brown, E. A. Davies, H. Ohno, T. Saito, P. A. van der Merwe, *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 31.
- [76] S.-J. E. Lee, Y. Hori, J. T. Groves, M. L. Dustin, A. K. Chakraborty, *TRENDS Immunol.* **2002**, *23*, 492.
- [77] S.-J. E. Lee, Y. Hori, J. T. Groves, M. L. Dustin, A. K. Chakraborty, *TRENDS Immunol.* **2002**, *23*, 500.
- [78] R. Simson, E. Wallraff, J. Faix, J. Niewohner, G. Gerisch, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 514.
- [79] J. T. Groves, S. G. Boxer, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 935.
- [80] K. Simmons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569.
- [81] G. Vereb, J. Szöllösi, J. Matkó, P. Nagy, T. Farkas, L. Vígh, L. Mátyus, T. A. Waldmann, S. Damjanovich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8053.
- [82] A. Viola, A. Lanzavecchia, *APMIS* **1999**, *107*, 615.
- [83] M. Dykstra, A. Cherukuri, S. K. Pierce, *J. Leukocyte Biol.* **2001**, *70*, 699.
- [84] S. L. Veatch, S. L. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 268101.
- [85] H. M. McConnell, M. Vrljic, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 469.
- [86] E. D. Sheets, D. Holowka, B. Baird, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 95.
- [87] E. Sackmann, *Science* **1996**, *271*, 43.
- [88] E. Sackmann, M. Tanaka, *TIBTECH* **2000**, *18*, 58.
- [89] J. T. Groves, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2002**, *5*, 606.
- [90] J. Salafsky, J. T. Groves, S. G. Boxer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14773.
- [91] T. M. Bayerl, M. Bloom, *Biophys. J.* **1990**, *58*, 357.
- [92] S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. McDermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1991**, *59*, 289.
- [93] B. W. Koenig, S. Krueger, W. J. Orts, C. F. Majkrzak, N. F. Berk, J. V. Silverton, K. Gawrisch, *Langmuir* **1996**, *12*, 1343.
- [94] J. T. Groves, C. Wülfing, S. G. Boxer, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2716.
- [95] J. T. Groves, N. Ulman, S. G. Boxer, *Science* **1997**, *275*, 651.
- [96] J. T. Groves, N. Ulman, P. S. Cremer, S. G. Boxer, *Langmuir* **1998**, *14*, 3347.
- [97] A. van Oudenaarden, S. G. Boxer, *Science* **1999**, *285*, 1046.
- [98] L. A. Kung, L. Kam, J. S. Hovis, S. G. Boxer, *Langmuir* **2000**, *16*, 6773.
- [99] L. Kung, J. T. Groves, N. Ulman, S. G. Boxer, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 731.
- [100] J. S. Hovis, S. G. Boxer, *Langmuir* **2001**, *17*, 3400.
- [101] J. T. Groves, S. G. Boxer, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 149.
- [102] B. Jackson, J. T. Groves, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13878.
- [103] T. Buranda, J. Huang, G. V. Ramarao, L. K. Ista, R. S. Larson, T. L. Ward, L. A. Sklar, G. P. Lopez, *Langmuir* **2003**, *19*, 1654.
- [104] A. R. Sapuri, M. M. Baksh, J. T. Groves, *Langmuir* **2003**, *19*, 1606.
- [105] J. Rädler, E. Sackmann, *J. Phys. II* **1993**, *3*, 727.
- [106] A. Albersdörfer, T. Feder, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 245.
- [107] A. Kloboucek, A. Behrisch, J. Faix, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2311.
- [108] R. Bruinsma, A. Behrisch, E. Sackmann, *Phys. Rev. E* **2000**, *61*, 4253.
- [109] E. Sackmann, R. Bruinsma, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 262.
- [110] T. Charitat, E. Bellet-Amalric, G. Fragneto, F. Graner, *Eur. Phys. J. B* **1999**, *8*, 583.
- [111] G. Fragneto, T. Charitat, F. Graner, K. Mecke, L. Perino-Gallice, E. Bellet-Amalric, *Europhys. Lett.* **2001**, *53*, 100.
- [112] A. P. Wong, J. T. Groves, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12414.
- [113] A. P. Wong, J. T. Groves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14147.
- [114] Y. Kaizuka, J. T. Groves, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 905.
- [115] R. Parthasarathy, B. L. Jackson, T. J. Lowrey, A. P. Wong, J. T. Groves, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 649.
- [116] M. M. Baksh, M. Jaros, J. T. Groves, *Nature* **2004**, *427*, 139.
- [117] T. M. Bayerl, *Nature* **2004**, *427*, 105.
- [118] D. J. Irvine, M. A. Purbhoo, M. Krosgaard, M. M. Davis, *Nature* **2002**, *419*, 845.
- [119] D. Magde, E. Elson, W. W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705.
- [120] P. Schwille, J. Korlach, W. W. Webb, *Cytometry* **1999**, *36*, 176.
- [121] J. Korlach, P. Schwille, W. W. Webb, G. W. Feigenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8461.
- [122] S. T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb, *Biochemistry* **2002**, *41*.
- [123] N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia, B. Poolman, P. Schwille, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 28109.
- [124] K. Bacia, P. Schwille, *Methods* **2003**, *29*, 74.
- [125] E. Haustein, P. Schwille, *Methods* **2003**, *29*, 153.
- [126] J. O. Rädler, T. J. Feder, H. H. Strey, E. Sackmann, *Phys. Rev. E* **1995**, *51*, 4526.
- [127] R. Hirn, T. M. Bayerl, J. O. Rädler, E. Sackmann, *Faraday Discuss.* **1998**, *111*, 17.
- [128] Z. Guttenberg, A. R. Bausch, B. Hu, R. Bruinsma, L. Moroder, E. Sackmann, *Langmuir* **2000**, *16*, 8984.
- [129] S. Marx, J. Schilling, E. Sackmann, R. Bruinsma, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 138102.
- [130] A. Lambacher, P. Fromherz, *Appl. Phys. A* **1996**, *63*, 207.
- [131] A. Lambacher, P. Fromherz, *J. Opt. Soc. Am. B* **2002**, *19*, 1435.
- [132] R. Parthasarathy, J. T. Groves, *Cell Biochem. Biophys.* **2004**, *41*, 391.
- [133] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Aufl., Kluwer/Plenum, New York, 1999.

- [134] D. Huster, P. Müller, K. Arnold, A. Herrmann, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 822.
- [135] R. A. Provencal, J. D. Ruiz, A. N. Parikh, A. P. Shreve, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 423A.
- [136] T. McIntosh, S. A. Simon, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10477.
- [137] E. A. Merritt, S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L'Hoir, J. A. Martial, W. G. J. Hol, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 166.
- [138] M. Born, E. Wolf, *Principles of Optics*, Cambridge University Press, Cambridge, **1999**.
- [139] R. Lipowsky, E. Sackmann in *Handbook of Biological Physics*, Bd. 1, Elsevier, New York, **1995**.
- [140] W. H. Binder, V. Barragan, F. M. Menger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5802