

STERN-GERLACH-MEDAILLE

# Haftung für Zellen

Mechanische Kräfte sind für die Zelladhäsion entscheidend

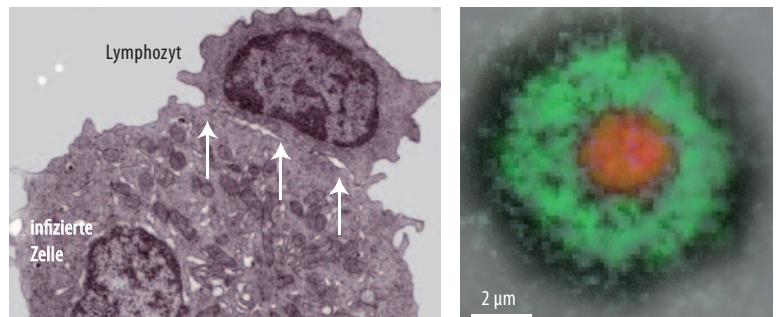
Erich Sackmann

Wenn weiße Blutzellen Viren oder Bakterien bekämpfen, wenn Metastasen entstehen sowie bei vielen anderen biologischen Prozessen spielt die Adhäsion zwischen Zellen eine zentrale Rolle. Das Zusammenspiel unterschiedlicher Kräfte führt dabei zu mikroskopischen Domänen starker Adhäsion. Dieser Prozess erlaubt es, in Sekundenschnelle Haftstellen auf- und wieder abzubauen, und zeigt, wie Zellen die Gesetze der Physik nutzen.

Unter Zelladhäsion versteht man die spezifische Kontaktwechselwirkung zwischen zwei Zellen oder zwischen Zellen und Gewebeoberflächen, wie der Innenwand der Blutgefäße. Zellen können dauerhaft aneinander haften, wie bei der Ausbildung von Organen während der Entwicklung von Lebewesen aus befruchteten Eizellen, oder nur kurzfristig, wie bei der Aktivierung weißer Blutzellen (Lymphozyten) durch körperfremde Zellen bei einer Infektion. Die Selektivität der Zell-Zell-Adhäsion lässt sich mit Zellen aus Embryonen im Frühstadium der Entwicklung sehr eindrucksvoll demonstrieren: Mischt man Zellen der Außenhaut und von inneren Organen homogen, so reorganisieren sich diese nach wenigen Stunden wieder derart, dass die Zellen der Außenhaut eine neue Hülle ausbilden, in deren Innenraum sich organartige Gebilde aus Organzellen formen.

Lange Zeit war unklar, ob die spezifische Erkennung durch den genetischen Apparat gesteuert wird oder durch die Architektur der Zelloberflächen bestimmt ist. Heute wissen wir, dass Proteine in der Zellmembran dafür verantwortlich sind, sog. Zell-Adhäsionsmoleküle (ZAM) oder kurz Rezeptoren [1]. Erstaunlich ist, dass für die enorme Vielfalt der Adhäsionsprozesse, welche die Morphogenese höherer Organismen bestimmen, nur vier Familien von Rezeptoren ausreichen, von denen sich jeweils nur rund 10000 Exemplare auf der Zelloberfläche befinden (vgl. Infokasten „Rezeptoren“). Da alle Rezeptoren die Zellhülle durchdringen und an das intrazelluläre makromolekulare Gerüst, das Zytoskelett, ankoppeln können, eröffnen sich vielfältige Möglichkeiten, um die Adhäsionsstärke schnell an die Umgebungsbedingungen anzupassen.

Die Bindung zwischen zwei Rezeptoren oder einem Rezeptor und einem Makromolekül des Gewebes wird durch zwischenmolekulare Kräfte kurzer Reichweite wie Wasserstoffbrücken oder Salzbrücken bestimmt.



Wenn eine weiße Blutzelle auf einer infizierten Zelle haftet, entstehen Domänen engen Kontakts (Pfeile), die durch adhäsionsfreie Zonen getrennt sind (links, elektronenmikroskopische Aufnahme nach [2]). Die starke Bindung in der Adhäsionszone kommt durch Schloss-

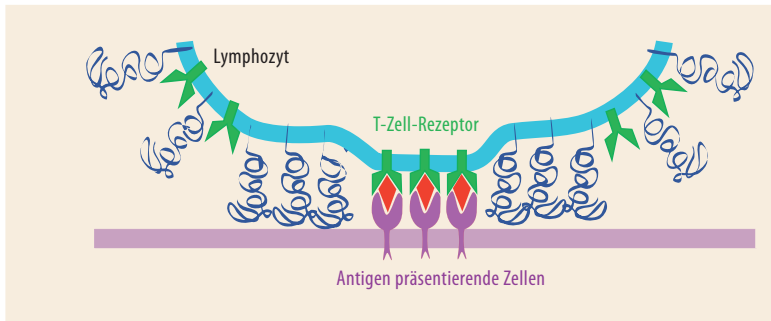
Schlüssel-Kräfte mit speziellen Rezeptoren (rot) zustande, die sich mit einer Mikrofluoreszenzaufnahme sichtbar machen lassen (rechts, T-Lymphozyt mit T-Zell-Rezeptoren auf einer festkörpergestützten Membran, nach [3]).

Ihre Stärke hängt daher entscheidend von der molekularen Architektur der Bindungspartner im Kontaktbereich ab. Die Bindung ist umso stärker, je besser die Form eines Bindungspartners räumlich in die Bindungstaschen des Rezeptors passt. Man spricht daher von Schloss-Schlüssel-Kräften. Die Bindungskräfte zwischen einzelnen Bindungspartnern lassen sich heute mittels Rasterkraftmikroskopie, optischen oder magnetischen Pinzetten messen [4, 5]. Überraschenderweise zeigt sich dabei, dass die Bindungskraft zwischen einem Liganden, z. B. einem Zuckermolekül, und seinem zugeordneten natürlichen Rezeptor nur höchstens um einen Faktor zwei von dem Wert abweicht, mit dem andere Moleküle ähnlicher Struktur binden, die keine Adhäsion bewirken. Offenbar müssen andere

## KOMPAKT

- Mechanische Modellsysteme erlauben es, die Beziehung zwischen der Zelladhäsion und der Physik der Benetzung zu untersuchen.
- Mithilfe mikro-interferometrischer Methoden und magnetischer Pinzetten ist es möglich, den Adhäsionsprozess dynamisch zu verfolgen und die Bindungsstärke lokal zu messen.
- Adhäsionsdomänen entstehen demnach aus dem Zusammenspiel von attraktiven Schloss-Schlüssel-Kräften kurzer Reichweite (ca. 10 nm) mit strukturunabhängigen Grenzflächenkräften mittlerer Reichweite (ca. 100 nm). Dabei spielen aber auch adhäsionsinduzierte elastische Kräfte eine zentrale Rolle.

Prof. Dr. Erich Sackmann, Physikdepartment E22, Technische Universität München, James-Franck-Straße, 85748 Garching – Preisträgerartikel anlässlich der Verleihung der Stern-Gerlach-Medaille 2006 auf der 70. DPG-Jahrestagung in München.



**Abb. 1** Durch laterale Phasentrennung der T-Zell-Rezeptoren (grün) und Puffermoleküle (blau) entstehen Domänen starker Kopplung mit den Antigen

präsentierenden Zellen (lila) auf der Membran bzw. adhäsionsfreie Zonen (vgl. Abbildung auf der vorherigen Seite).

Faktoren hinzukommen, um die hohe Spezifität der Zell-Zell-Wechselwirkung zu erreichen.<sup>1)</sup>

Vergleichende Experimente mit Zellen und mechanischen Zellmodellen legen nahe, dass der Adhäsionsprozess in zwei Phasen abläuft. Die erste besteht in der Kontaktbildung zwischen zwei Zellen oder einer Zelle und dem Gewebe. Dabei bilden sich in der Regel mikroskopische Haftstellen aus, indem sich die in der Membran beweglichen Rezeptoren und Liganden lateral trennen. In der zweiten Phase werden diese sog. Adhäsionsdomänen stabilisiert, indem die Rezeptoren an das intrazelluläre Gerüst aus Filamenten des Muskelproteins Aktin koppeln. Dieser Schritt wird durch biochemische Signale im Zellinneren eingeleitet und kann bis zur Ausbildung von Spannungsfasern aus Aktinbündeln oder Mikromuskeln führen [1, 6]. Diese Verknüpfung des mechanischen Primärprozesses der Adhäsion mit biochemischen und genetischen Signalsystemen der Zelle bildet die Basis für die Adaption der Adhäsion an die Umgebungsbedingungen. Bei der adhäsionsinduzierten Signalübertragung spielen die Adhäsionsdomänen eine wichtige Rolle als biochemische Schalter.

Das Immunsystem besteht aus ca.  $10^{12}$  weißen Blutzellen (Lymphozyten) und insgesamt  $10^{20}$  Antikörpern. Diese werden von den Lymphozyten synthetisiert und können als membranständige Rezeptoren auf deren Oberfläche lokalisiert sein oder in löslicher Form im Blut schwimmen. Um die Vielzahl möglicher Antigene<sup>2)</sup> zu erkennen, die in unserem Körper im Laufe des Lebens auftreten können, existieren rund  $10^{12}$  Gruppen spezifischer Antikörper. Befällt ein Bakterium oder ein Virus unseren Körper, so wird es von weißen Blutzellen (vor allem sog. dendritische Zellen) eingefangen und im Innern zerlegt. Kleine Bruchstücke von Peptiden werden an die Oberfläche der Zelle transportiert und dort an spezielle Membranrezeptoren (MHC-Komplexe,

1) Man nimmt an, dass diese auf einer Reorganisation des Zytoskeletts durch adhäsionsinduzierte Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden beruhen, über die man aber kaum noch etwas weiß.

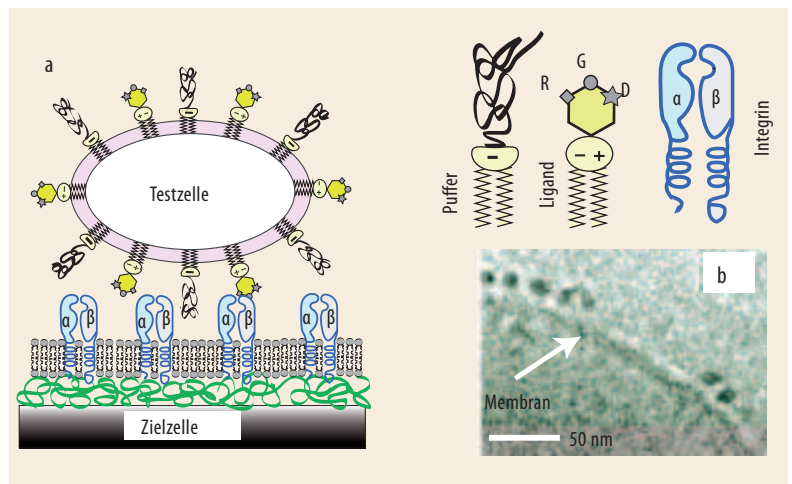
2) Antigene sind kleine Bruchstücke von Proteinen (z. B. Fragmente der Hüllenproteine von Bakterien und Viren) oder andere Fremdstoffe, die das Immunsystem aktivieren.

Major Histocompatibility Complexes) gebunden. Nur so können sie ihre antigene Wirkung entfalten. Diese „Antigen präsentierende Zellen“ werden nun von Lymphozyten erkannt, die an ihrer Oberfläche den für das Antigen spezifischen Antikörper tragen. Dabei handelt es sich um den T-Zell-Rezeptor (vgl. Infokasten).

Ein allgemeines Phänomen eines solchen Adhäsionsprozesses ist die punktförmige Kontaktbildung (Abb. 1). Sie beruht auf der Bildung von ca.  $1 \mu\text{m}$  großen Flecken starker Adhäsion aus Rezeptor-Liganden-Paaren (R-L), die durch Zonen sehr schwacher Adhäsion getrennt sind. Deren Abstand zur Membran wird durch sehr große, zuckerreiche Makromoleküle (Puffermoleküle) bestimmt, welche am Aufbau der polymeren Schutzschicht an Zelloberflächen, der Glykokalix, beteiligt sind. Dabei kann es sich um Rezeptoren der Familie der Glykoproteine handeln (s. Infokasten) oder um Polysaccharide des Gewebes, die über spezielle Rezeptoren an die Zelloberfläche binden.

## Adhäsion in Echtzeit an Zellmodellen

Die physikalischen Grundlagen der Zelladhäsion lassen sich an möglichst realistischen Modellsystemen untersuchen, deren physikalische Eigenschaften mit denjenigen natürlicher Systeme verglichen werden. Solche Modelle können allerdings nur den Primärprozess der Adhäsion imitieren. Als Testzellen dienen Riesenvesikel aus Lipiddoppelschichten, die man mit ca.  $1 \text{ mol}\%$  der an Lipide gekoppelten Liganden dotiert (Abb. 2). Als Zielzellen oder Zielgewebe eignen sich besonders festkörpergestützte Membranen, in die man die für die Liganden spezifischen Rezeptoren einbaut. Zur Herstellung bioanaloger Bedingungen werden die Membranen vom Festkörper durch dünne Polymerfilme, z. B. aus



**Abb. 2** a) In diesem Modell der Zelladhäsion (nach [7]) fungieren Riesenvesikel mit eingebauten Liganden als Testzellen, während festkörpergestützte Membranen mit Rezeptoren der Integrin-Familie als Zielzellen dienen. Als spezifische Liganden dienen beispielsweise Lipide mit zyklischen Kopfgruppen aus Peptiden, welche die Aminosäuresequenz

Arginin-Glycin-Asparagin (RGD) enthalten. Die RGD-Sequenz wird vom Integrin-Rezeptor selektiv erkannt. Das System eignet sich als Modell der Zelladhäsion auf Gewebe, da sich das zyklische Peptid wie das Gewebeprotein Kollagen verhält. b) Aufnahme rekonstituierter Integrine in Lipidmembranen mittels Elektronen-Tomographie (nach [8]).

Zellulose, getrennt, um die laterale Beweglichkeit und natürliche Funktionsfähigkeit der Rezeptoren zu erhalten. Diese Strategie hat den Vorteil, dass sich hochempfindliche Oberflächentechniken nutzen lassen, um den Adhäsionsprozess und die Bildung von Adhäsionsdomänen dynamisch zu beobachten.

Bei der Methode der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) entsteht das Bild durch Interferenz des von der Zelloberfläche und der Substratoberfläche reflektierten Lichts. Eine inverse Fourier-Transformation ermöglicht es, das Oberflächenprofil der adhärennden Schalen in der Nähe der Oberfläche mit ca. 0,3 µm lateraler und 1 nm Höhenauflösung<sup>3)</sup> zu rekonstruieren.

Die Modellzelle lässt sich mithilfe der RICM vor und während der Wirkung einer Hebekraft, die über magnetische Pinzetten erzeugt wird, beobachten (Abb. 3). Jede dabei entstehende Kante der Kontaktlinie definiert eine Adhäsionsdomäne. Die Kontur senkrecht zur Kontaktlinie wird an jeder Stelle von zwei geometrischen Größen bestimmt, dem Kontaktwinkel  $\theta_c$  und der Kontaktkrümmung  $R_c$ , aus denen sich die freien Adhäsionsenergien (Entbindungsarbeiten) bestimmen oder Adhäsionskräfte zwischen Rezeptoren und Liganden unter natürlichen Bedingungen messen lassen [10, 11].

Für eine rigorose Beschreibung der Zelladhäsion müsste man die Theorie elastischer Schalen mit der Thermodynamik von Mischungen kombinieren. Eine solche umfassende thermoelastische Theorie existiert nur ansatzweise für den einfachen, biologisch weniger interessanten Fall der homogenen Adhäsion einer Membran mit Rezeptoren, aber ohne Abstandshalter [12, 13]. Glücklicherweise wird die Adhäsion vorwiegend durch

die Vorgänge im Bereich der Adhäsionszone bestimmt, während der freie Teil der Schalen, der oft 80 % der gesamten Oberfläche umfasst, als Reservoir für Rezeptoren und Abstandshalter dient. Dies ist ein Glücksfall, da man mittels RICM die Vorgänge bis zu 1 µm Höhe über der Oberfläche mit hoher Auflösung erfassen kann.

### Adhärennde Wassertropfen und Zellen

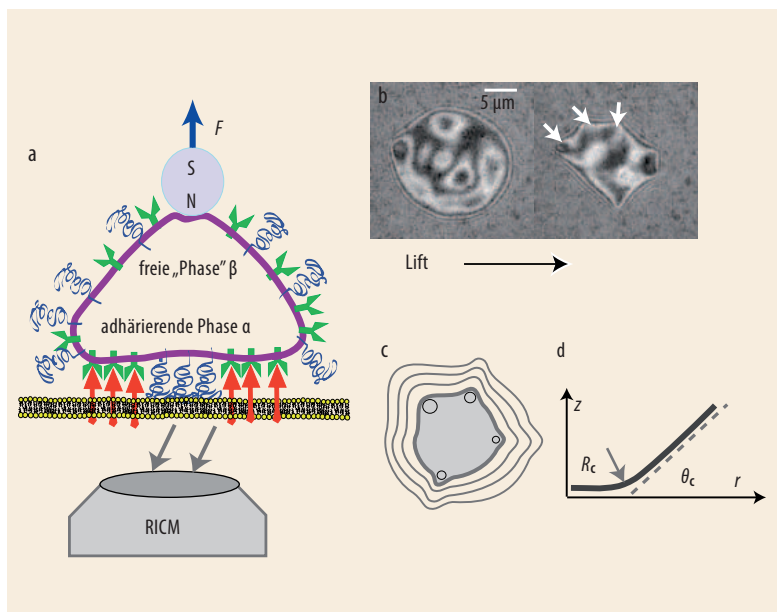
Die Zelladhäsion erinnert stark an die partielle Benetzung einer Oberfläche mit einem Wassertropfen. Diese Analogie hilft uns im Folgenden bei der theoretischen Beschreibung der Vorgänge in der Kontaktzone. Wir beginnen mit den vertrauten Gesetzen der Kapillarität, wie man sie z. B. aus der Physik der Seifenfilme kennt, um dann in einem zweiten Schritt die durch die Biegesteifigkeit der Membran auftretenden neuen Effekte zu behandeln.

Da sich die Moleküle eines adhärennden Wassertropfens in alle Richtungen frei gegeneinander verschieben lassen, entsteht an der Kontaktlinie eine scharfe Kante, und die davon ausgehende Tangente an die freie Oberfläche bildet einen Kontaktwinkel  $\theta_c$  mit der Festkörperoberfläche (Abb. 4a). Diese Kontur wird durch das Gleichgewicht der Grenzflächenspannungen, definiert als Kraft pro Länge der Kontur, bestimmt.

$$\sigma_{12} = \sigma_{13} + \sigma_{23} \cos \theta_c . \quad (1)$$

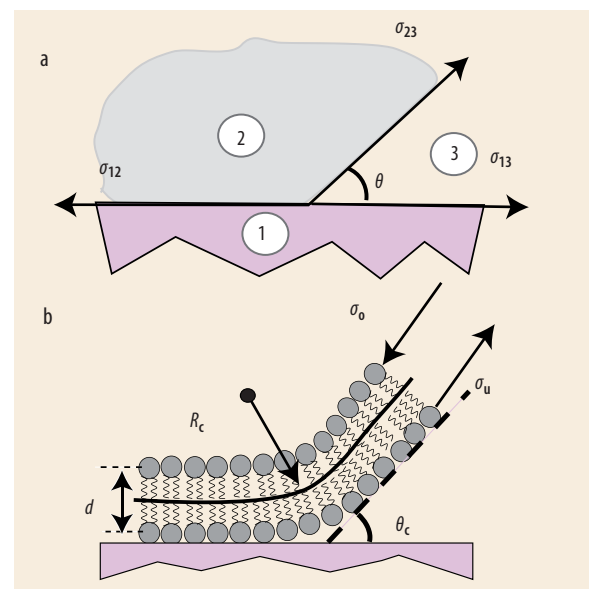
$\sigma_{ij}$  hat auch die Dimension Energie pro Fläche, denn es ist ein Maß für die zu leistende Arbeit pro Einheitsfläche, um die Oberfläche reversibel um das Flächenelement  $dO$  zu vergrößern. Dabei muss Arbeit geleistet

3) Bei Anwendung auf adhärennde Zellen kann der Einfluss der intrazellulären Kompartimente die Interferogramme manchmal verzerren. Unter diesen Umständen kann mit mehr Aufwand eine Fluoreszenzmikroskopische Methode helfen. Dabei entsteht das Bild durch Interferenz des von fluoreszierenden Reportermolekülen direkt ausgesandten Lichts mit der an der Oberfläche reflektierten Teilwelle. Da man die Zellmembran gezielt mit Chromophoren dotieren kann, stören intrazelluläre Oberflächen nicht [9].



**Abb. 3** a) Um Adhäsionsdomänen sichtbar zu machen und Adhäsionskräfte zu messen, zieht man die Modellzelle mit magnetischen Pinzetten nach oben. b) Die kreisförmige Kontaktlinie im Interferogramm einer Modellzelle (links) weist nach Anheben mit einer Kraft von ca. 2 pN Kanten auf (rechts, Pfeile), die

Adhäsionsdomänen anzeigen. c) Die Kontur der Zelle in der Nähe der Oberfläche lässt sich durch inverse Fourier-Transformation rekonstruieren. d) Das Oberflächenprofil senkrecht zur Kontaktlinie ist durch den Kontaktwinkel  $\theta_c$  und die Kontaktkrümmung  $R_c$  bestimmt.



**Abb. 4** a) Bei einem partiell benetzenden Wassertropfen ist der Übergang von der adhärennden zur freien Oberfläche atomar scharf, und die Kontur der freien Oberfläche bildet einen Kontaktwinkel  $\theta_c$  mit der Oberfläche (Querschnitt durch Tropfen senkrecht zur Kontaktlinie).  $\sigma_{ij}$  sind die Grenzflächenspannungen (Kräfte pro Länge) zwischen den Materialien  $i$  und  $j$ . b) Der Übergang von der freien zur adhärennden Membran ist an der Kontaktlinie kontinuierlich und durch die Kontaktkrümmung  $R_c$  sowie den Kontaktwinkel  $\theta_c$  bestimmt.

werden, da die Moleküle im Innern der Flüssigkeit kräftefrei sind, während sie an der Oberfläche einer nach innen gerichteten Kraft unterliegen. Die Energie pro Fläche, die bei der Bildung der Kontaktfläche  $A_c$  gewonnen wird, ist  $W = \sigma_{12} - \sigma_{13} - \sigma_{23}$ , da die Kontakte zwischen den Grenzflächen 2-3 bzw. 1-3 verloren gehen, während der zwischen 1-2 gewonnen wird. Setzt man diesen Ausdruck für  $W$ , die Energiebilanz der Benetzung, in Gl. (1) ein, so folgt mit  $\sigma_{23} \equiv \sigma$  das bekannte Youngsche Gesetz für die Freie Energie  $W$  der Adhäsion oder die Entbindungsarbeit pro Fläche:

$$W = \sigma(1 - \cos \Theta_c). \quad (2)$$

Da  $W$  auch die Dimension N/m eines lateralen Drucks hat, der die Tendenz des Tropfens zum Ausbreiten auf der Oberfläche (Spreiten genannt) bestimmt, nennt man  $W$  auch den Spreaddruck.

Bei der adhärierenden Membran sind die in Wasser unlöslichen Lipidmoleküle auf der Ebene der fluiden Membran fixiert, aber lateral frei beweglich (Abb. 4b). Wegen der parallelen Orientierung der Kohlenwasserstoffketten ist jede Biegung der Membran mit Aufwand an elastischer Energie verbunden. Da eine scharfe Kante extrem viel Energie kosten würde, stellt sich am Übergang zwischen adhärrierender und freier Membran eine endliche Kontaktkrümmung  $R_c$  ein. Es ist wieder wichtig, die Energiebilanz und das Kraftgleichgewicht der Biegedeformation parallel zu betrachten. Da nach dem Hookeschen Gesetz Spannung und Dehnung (hier die Krümmung  $R_c^{-1}$ ) zueinander proportional sind, gilt für die elastische Energiedichte der Kontaktkrümmung  $\Delta g_{\text{elast}} = \kappa/2R_c^2$  mit dem Biegemodul  $\kappa$ .<sup>4)</sup>

Im Kraftbild stellen wir uns vor, die Kontaktkrümmung  $R_c^{-1}$  werde durch ein Paar entgegen gerichteter

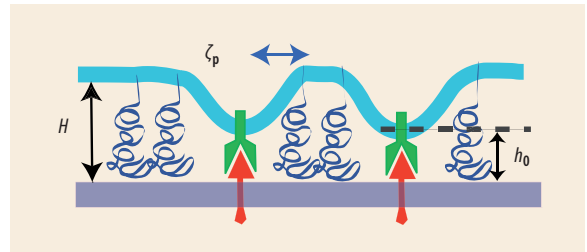


Abb. 5 In der Umgebung der Rezeptor-Liganden-Paare treten aufgrund der unterschiedlichen Gleichgewichtsabstände der R-L-Bindung ( $h_0$ ) und der Abstandhalter ( $H$ ) lokale Deformationen mit einer Reichweite  $\zeta_p$  von ca. 50 nm auf.

Oberflächenspannungen gleicher Stärke erzeugt, welches die äußeren Monoschicht dehnt und die innere staucht (Abb. 4b). Das Spannungspaar erzeugt ein Biegemoment  $M \approx (\sigma_o - \sigma_u)d$ , das nach dem Hookeschen Gesetz ( $M = \kappa/R_c$ ) eine lokale Krümmung  $R_c^{-1} = M/\kappa$  induziert.

Betrachten wir nun die Gleichgewichtsbedingungen für die Membranen. Die Bedingungen (1) und (2) gelten auch für die Oberflächen der Vesikel oder Zellen, wobei das Medium 3 (Abb. 4a) in diesem Fall Wasser ist. Man kann nach Gl. (2) den Parameter  $\sigma$  der Young-Gleichung auch als laterale Spannung der elastischen Schale verstehen, welche durch den Gewinn an Adhäsionsenergie erzeugt und dem Spannungspaar überlagert wird. Da die Membranen fluide sind, ist  $\sigma$  isotrop und auf der gesamten Oberfläche gleich.

Eine weitere wichtige Beziehung für die Entbindungsarbeit  $W$  ergibt sich, wenn man die Randbedingung beachtet, dass die Membran links von der Kontaktlinie parallel zur Oberfläche liegt. Dazu muss die Oberfläche eine Reaktionskraft auf die Membran ausüben, die dem Drehmoment  $M$  des Spannungspaares

## REZEPTOREN

Die große Vielfalt der Adhäsionsprozesse wird durch vier Familien von Rezeptoren bewerkstelligt, die aus verschiedenen Spezies leicht unterschiedlicher Struktur bestehen.

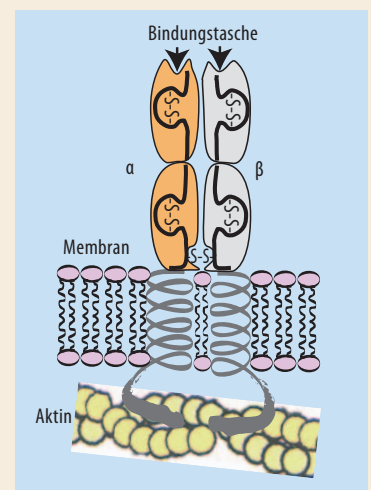
- Die Familie der **Cadherine**, die ca. 20 Spezies umfasst, vermittelt die Kopplung zwischen Epithelzellen, welche die Haut der Organe bilden, oder zwischen Endothelzellen, welche die Wand der Blutgefäße auskleiden. Es handelt sich um selbsterkennende (homophile) Rezeptoren, deren aus der Oberfläche ragenden Kopfgruppen wie ein Reißverschluss ineinander greifen.

- Die „Superfamilie“ der **Immunoglobuline** mit ca. 100 Spezies spielt eine wichtige Rolle für Kontakte zwischen Zellen des Immunsystems. Diese als Einzelmolekül oder als Dimere (Abb.) auftretenden Rezeptoren sind meist heterophil, d. h. sie binden spezifisch an andere Rezeptoren wie Integrine oder andere Rezeptoren der Superfamilie. Ihr Name rührt daher, dass die

Kopfgruppen aus zwei bis sieben Proteindomänen bestehen, die man auch in Antikörpern der Immunglobulin-Familie findet.

- Die Familie der **Selektine** sorgt für die schwache Haftung weißer Blutzellen auf der Innenwand der Blutgefäße. Die Zellen rollen daher, getrieben durch den Blutstrom, langsam an der Innenwand der Blutgefäße entlang. Sie haben so Zeit, Infektionsherde im Gewebe zu entdecken. Selektine erkennen spezifisch kurze Sequenzen von Zuckermolekülen (Oligosaccharide), die insbesondere an extrazellulären Peptidketten membranständiger Proteine (Glykoproteine) gekoppelt sind. Die Glykoproteine können als Rezeptoren oder als Puffermoleküle fungieren.

- Eine Sonderrolle spielt die Familie der **Integrine**, die vor allem für die Haftung der Zellen auf Gewebe (wie z. B. Kollagen) sorgen. Diese Heterodimere aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteinketten treten in zahlreichen Kombinationen  $\alpha$ ,  $\beta$  auf.



Struktur des T-Zell-Rezeptors, ein Dimer mit zwei extrazellulären Domänen der Immunglobulin-Familie. Das Dimer wird durch eine Schwefelbrücke (-S-S-) zusammengehalten.

4) Der Biegemodul dünner Platten hat die Einheit Energie. Aufgrund ihrer hohen Flexibilität gibt man den Wert für Membranen in Einheiten von  $k_B T$  an. Plasmamembranen (Dicke  $h = 3$  nm) haben einen Wert  $\kappa$  von ca.  $50 k_B T$ , Zellmembranen mit Aktin-Cortex von ca.  $1000 k_B T$  [10] und 3 nm dicke Goldfilme von ca.  $10^5 k_B T$ .

das Gleichgewicht hält, da sonst die Membran von der Oberfläche abrollen würde. Eine etwas komplizierte Energiebetrachtung<sup>5)</sup> liefert

$$W = \kappa/2R_c^2, \tag{3}$$

d. h.  $W$  stimmt mit der oben eingeführten elastischen Energiedichte der Kontaktkrümmung überein. Mit den Randbedingungen (2) und (3) haben wir ein wichtiges Werkzeug zur quantitativen Charakterisierung der Adhäsion zur Hand. Da man die geometrischen Parameter  $\Theta_c$  und  $R_c$  mittels RICM bestimmen kann (vgl. Abb. 5) und  $\kappa$  oft aus separaten Messungen kennt, lassen sich die wichtigen mechanischen Parameter  $\sigma$  und  $W$  bestimmen. Man kann die Biegesteifigkeit  $\kappa$  aber auch im selben Experiment messen, indem man Störungen der Kontur durch kleine hydrodynamische Scherkräfte [10] oder Liftkräfte analysiert [11].<sup>6)</sup>

### Die Zelladhäsion als Phasenumwandlung

Die bisherige Betrachtung der Analogie zwischen adhärierenden Wassertropfen und Membranen hat gezeigt, wie man wichtige physikalische Parameter messen kann. Wir haben aber immer noch nicht gelernt, weshalb bei Membranen Adhäsionsdomänen entstehen und bei Flüssigkeiten nicht. Dazu müssen wir uns überlegen, welche neue Physik dadurch ins Spiel kommt, dass die Membranen noch durch die aus der Oberfläche ragenden Kopfgruppen der Rezeptoren und Abstandshalter um einige 10 nm voneinander getrennt sind. Der entscheidende Punkt ist dabei, dass der durch die Rezeptor-Liganden-Bindung bestimmte Abstand zwischen den Membranen (mit  $h \approx 10$  nm) wesentlich kleiner ist als der durch die Abstandshalter bestimmte Wert (typisch  $H \approx 50$  nm) (vgl. Abb. 1 und Abb. 5). Um eine R-L-Bindung zu bilden, müssen die Membran lokal verbogen und die Abstandshalter etwas gestaucht werden. Diese Deformationen lassen sich mithilfe der folgenden Energiebilanz quantifizieren (vgl. Abb. 5):

$$\Delta G_{\text{adh}} = \frac{1}{2} \kappa \iint_{A_c} \Delta h(x, y)^2 dO + w c_{\text{RL}} A_c + \frac{1}{2} \iint_{A_c} V''(h-h_0)^2 dO. \tag{4}$$

Der erste Term berücksichtigt die Deformationsenergie der Membran durch die Verbiegung in der Umgebung der R-L-Paare. Er ist äquivalent zu dem oben erwähnten Hookeschen Gesetz, denn der Laplace-Operator ergibt die mittlere Krümmung der Membran:  $\Delta h = \partial^2 h / \partial x^2 + \partial^2 h / \partial y^2 = R_1^{-1} + R_2^{-1}$ . Der zweite Term steht für den Gewinn an Bindungsenergie durch die spezifischen Kräfte, wobei jedes R-L-Paar einen festen Beitrag  $w$  von ca.  $10 k_B T$  beisteuert.  $c_{\text{RL}}$  bezeichnet die Konzentration der R-L-Paare und  $A_c$  die Kontaktfläche. Das rechte Integral berücksichtigt die unspezifische Wechselwirkung zwischen den Membranen. Dabei nimmt man an, dass diese durch ein harmonisches Potential  $V$  angenähert werden kann [15], dessen Krümmung oder Kraftkonstante durch  $V'' = d^2 V / dx^2$  gegeben ist.

Um nun den Zustand minimaler Energie zu berechnen, müsste man die Euler-Lagrange-Gleichung des Energiefunktionals lösen [16]. Für unsere semiquantitative Betrachtung der Physik der Adhäsion genügt der Hinweis, dass durch Gl. (4) die sehr wichtige charakteristische Länge  $\zeta_p = \sqrt[4]{\kappa/V''}$  eingeführt wird, wie eine einfach Dimensionsbetrachtung der Integranden zeigt.  $\zeta_p$  ist ein Maß für die laterale Ausdehnung einer lokalen Deformation, z. B. des Bereichs, über den sich der Übergang mit der Kontaktkrümmung erstreckt oder die Reichweite der lokalen Deformation in Abb. 5. Er wird uns nun helfen, den Beitrag der lokalen Deformation der Membran zu  $\Delta G_{\text{ela}}$  abzuschätzen. Dazu müssen wir uns das Potential  $V(h)$  genauer ansehen, zu dem mehrere zwischenmolekulare Kräfte beitragen [11]. Die Experimente zeigen aber, dass nur zwei Beiträge wichtig sind: die sterische Abstoßung durch die Abstandshalter und der entropische Undulationsdruck.

Da die Kopfgruppen der Abstandshalter der Zellen sehr flexibel sind oder aus Makromolekülen bestehen wie in den Modellsystemen, verhalten sie sich in der Adhäsionszone wie Polymere, die zwischen zwei Platten im Abstand  $h$  eingeklemmt sind. Die Platten werden abgestoßen, falls  $h$  kleiner ist als der Gyrationradius  $R_g$  der Kopfgruppen. Die Abstoßung lässt sich durch das Dolan-Edwards-Potential beschreiben [11].

$$V_{\text{DE}}(h) \approx k_B T c_A (R_g/h)^2 \exp\{-3/2 (h/R_g)^2\},$$

wobei  $c_A$  die Flächendichte der Abstandshalter ist.

Den zweiten wichtigen Beitrag zu  $V(h)$  liefert die thermische Anregung von Biegefluktuationen der Lipidmembranen und der Hüllen vieler Zellen wie Erythrozyten und Makrophagen [17]. Diese werden statistisch angeregt, und lokale Auslenkungen der Membranen  $u(r)$  mit mittleren Amplituden von ca. 100 nm erstrecken sich lateral über die Persistenzlänge  $\zeta_p$

5) s. dazu [12] und [14], §13, Aufgabe §13.6 und [13]

6) Beim Auftreten scharfer Ausstülpungen der Kontaktlinie unter der Wirkung von Liftkräften (Abb. 3) wird die Situation wesentlich komplexer. Je nach Beweglichkeit der Rezeptoren kann Entbindung der R-L-Paare auftreten, oder die Domänen können wachsen. Dies eröffnet aber auch die Möglichkeit zur direkten Messung der R-L-Bindungskräfte unter bioanalogen Bedingungen [11c], was mit den Methoden der Kraftmessung an Einzelmolekülen [4, 5] nicht möglich ist.

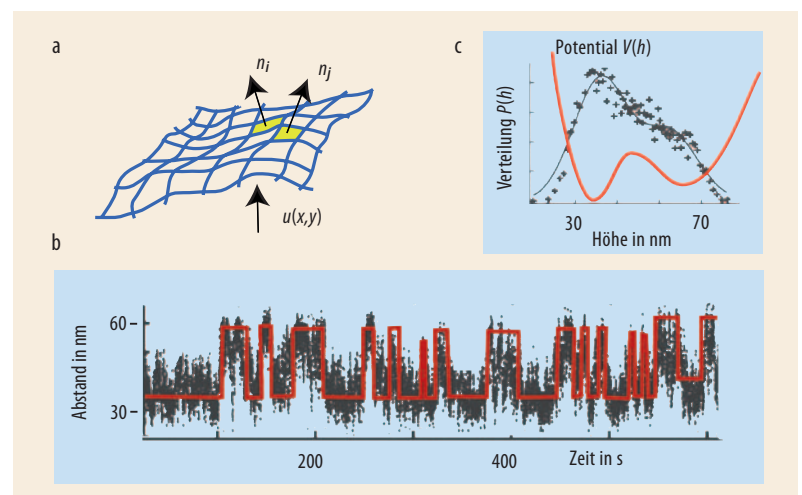
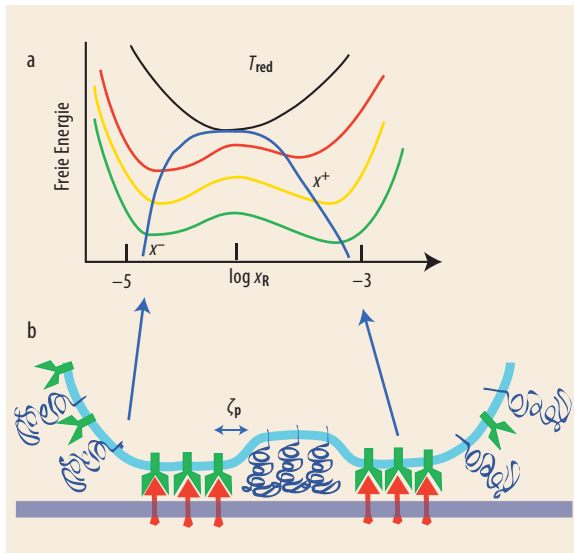


Abb. 6 a) Die thermische Anregung von Biegefluktuationen (Brownsche Bewegung) führt zu einer dynamischen Wechselwirkung von Membranen mit Oberflächen. Die Rauigkeit lässt sich durch die Orientierung der lokalen Normalen charakterisieren. Diese sind über die Persistenzlänge  $\zeta_p$  korreliert. b) Die lokalen Fluktuationen des Abstands der Membrane an einem festen Punkt weisen sprunghafte Übergänge zwischen einem oberflächennahen (ca. 30 nm) und -fernen (ca. 60 nm) Zustand auf (rote Linie), die ein Wechselwirkungspotential mit Doppelminimum definieren (c) [7, 18].



**Abb. 7** a) Die Freie Energie der Adhäsion weist als Funktion der Rezeptorkonzentration  $x_R$  für effektive Temperaturen  $T_{red}$  unterhalb eines kritischen Wertes  $T_{red,c}$  (schwarz) zwei Minima auf. b) Dies führt zu einer Trennung der Rezeptoren (grün) in eine ungebundene Phase niedriger Konzentration  $x^-$  bzw. eine gebundene Phase hoher Konzentration  $x^+$ .

und zerfallen mit Relaxationszeiten von  $\leq 0,1$  s. Einem eleganten Bild Helfrichs [15] folgend, kann man die statistisch fluktuierenden Schalen als Anordnung von Kissen der Dimension  $\zeta_p \times \zeta_p$  ansehen, die unabhängige Brownsche Bewegungen in der Normalenrichtung ausführen (Abb. 6a). Deren Stöße mit der Oberfläche (im Abstand  $h$ ) üben eine Abstoßungskraft pro Fläche der Größenordnung  $p_{disj} \sim k_B T/h \zeta_p^2$  aus.<sup>7)</sup> Bei einem Abstand  $h \leq 10$  nm ist dieser Druck etwa so groß wie die van-der-Waals-Kraft und bestimmt den Abstand zwischen Membranen.

Die Brownsche Bewegung der Membran spielt eine sehr wichtige Rolle für die Bildung von Adhäsionsdomänen, wenn die R-L-Bindung durch die Abstandshalter abgeschirmt wird. Durch die Stöße gegen die Wand werden die Puffermoleküle kurzzeitig aus der Kontaktzone verdrängt. In Gegenwart von Rezeptoren treiben die Stöße die Bildung von Keimen aus Rezeptor-Liganden-Paaren im Kontaktbereich, die dann zu Domänen ausreifen können, wie wir unten sehen werden.

Betrachten wir nun die Folgen des oben beschriebenen Wechselspiels von langreichweitiger Abstoßung und kurzreichweitiger Attraktion (Abb. 5). Zunächst schweben die Zellen über der Oberfläche mit einem

Abstand in der Kontaktzone von ca. 100 nm (z. B. bestimmt durch die Balance von Gravitation und Undulationsdruck [11c, 15]). Durch die thermischen Fluktuationen der Membranen bilden sich statistisch R-L-Paare aus. Zwei zufällig entstandene Paare im Abstand  $d \approx \zeta_p$  ziehen sich gegenseitig an und aggregieren, da dadurch die elastische Deformationsenergie reduziert wird. Der durch die Zusammenlagerung zweier R-L-Paare erzielte Energiegewinn ist offenbar

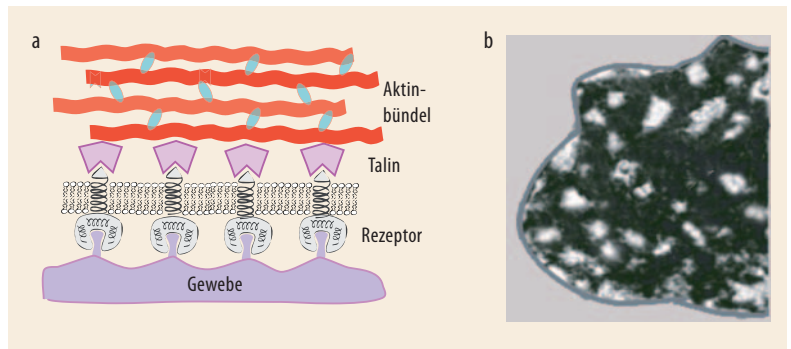
$$U_{ela} = cV''(H - h_0)^2 \zeta_p^2, \quad (5)$$

wobei  $c$  ein geometrischer Faktor ist, für den die genaue Theorie den Wert  $c = 8$  liefert [16]. Wenn wir nun das gesamte Ensemble von R-L-Paaren betrachten, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei davon treffen, gleich dem Quadrat der Rezeptor-Molenbrüche  $x_R$ . Der Gewinn an innerer Energie durch die Aggregation wird dann  $\Delta G_{cla} \approx z U_{ela} x_R^2$  mit der Koordinationszahl des Gitters  $z$ .

Wenn nun der Gewinn an Energie durch Aggregation der R-L-Paare größer ist als der Verlust an Mischungsentropie ( $\Delta S = k_B T \ln x_R$ ), werden sich spontan Adhäsionsdomänen bilden. Diese entstehen also, wenn man die Temperatur unter einen Schwellenwert  $T_c$  erniedrigt oder bei festem Wert von  $T$  die Konzentration der Rezeptoren erhöht. Die Situation ist völlig analog zur Phasentrennung in binären Metall-Legierungen (z. B. bei Bildung einer Mischungslücke), die unterhalb einer kritischen Temperatur auftritt, falls die Wechselwirkung zwischen gleichen Partnern größer ist als die zwischen ungleichen. In Analogie zur Theorie der Entmischung können wir die Situation durch die Temperaturabhängigkeit der Freien Energie der Adhäsion darstellen, wobei wir die reduzierte Temperatur  $T_{red} = k_B T/z U_{ela}$  als freien Kontrollparameter einführen (Abb. 7). Für  $T_{red} < T_{red,c}$  hat die Freie Energie ein Doppelminimum. Die Kontaktzone zerfällt spontan in eine Phase mit hoher Dichte (Molenbruch  $x^+$ ) an R-L-Paaren und eine mit niedriger Dichte  $x^-$ . Diese entsprechen den Zuständen starker bzw. schwacher Adhäsion. Da die Zustände durch Aktivierungsberge getrennt sind, handelt es sich um eine Umwandlung erster Ordnung. Eine ausführliche Rechnung liefert  $T_{red,c} \approx 4/11$  [11a]. Die mit dem Modellsystem der Abb. 3 gewonnenen Daten ( $V'' \sim 10^8$  J/m<sup>4</sup>,  $(H - h_0) \sim 30$  nm,  $\zeta_p \sim 50$  nm) zeigen, dass bei 37 °C gilt  $T_{red} \approx 1/3$ , d. h. wir befinden uns unter physiologischen Bedingungen unterhalb des kritischen Punktes.

<sup>7)</sup> In Analogie zur Erzeugung des idealen Gasdrucks nimmt man an, dass bei jedem Stoß der Membran mit der Wand die Energie  $\frac{1}{2} k_B T$  übertragen wird, die sich im Volumen  $h \zeta_p^2$  verteilt.

**Abb. 8** a) Die Adhäsionsdomänen lassen sich stabilisieren, indem die intrazellulären Segmente der aggregierten Rezeptoren an Bündel der Filamente des Muskelproteins Aktin koppeln, die als Spannungsfasern dienen. Ein universeller Kopplungsfaktor ist Talin, das Aktin an intrazelluläre Domänen der Rezeptoren koppelt. b) Der Rezeptor-Cluster von adhären den Zellen wird durch Fluoreszenzmarkierung des Talins sichtbar.



Die zellbiologisch wichtigste Konsequenz des Benetzungsübergangs ist jedoch, dass die Bildung von Adhäsionsdomänen schon bei sehr kleinen Rezeptordichten von  $x_R \geq 10^{-4}$  einsetzen kann. Die Zellen benötigen also nur wenige 10000 Spezies der kostbaren Rezeptoren, um starke Adhäsionsdomänen auszubilden. Experimente zeigen, dass die Adhäsionsdomänen Kräfte von einigen nano-Newton aushalten, wie sie bei Zellbewegungen auftreten [11]. Die Domänenstruktur ist ein metastabiler Zustand. Große Domänen wachsen im Laufe der Zeit langsam auf Kosten der kleinen, in Analogie zum Verhalten von Mischungen, wo man den Prozess Ostwald-Reifung nennt. So wie Metallurgen bestimmte Mikrostrukturen durch Einfrieren eines metastabilen Zustands einstellen, können Zellen die Größe und Verteilung der Domänen durch Kopplung an das Aktinnetzwerk kontrollieren (Abb. 8).

### Die Abstandshalter verhindern den Kollaps

Man könnte nun rein intuitiv denken, dass die Adhäsionsstärke  $W$  vorwiegend durch die Bindungsenergie der R-L-Paare, also durch den Term  $w_{c_{RL}} A_c$  in Gl. (4) bestimmt wird. Messungen der freien Energiedichte  $W$  unter Ausnutzung der Randbedingungen von Gl. (1–3) zeigen jedoch, dass diese mit typischerweise  $10^{-6} \text{ J/m}^2$  um Größenordnungen kleiner ist als die Energiedichte  $w$ , die ca.  $10^{-3} \text{ J/m}^2$  beträgt. Der Grund ist, dass die Adhäsionszone im thermodynamischen Gleichgewicht mit der freien Membran steht. Die aus den Domänen verdrängten Repeller wirken mit einem lateralen osmotischen Druck  $\pi_R$  auf diese zurück, sodass  $W \approx w - \pi_R$  wird [11]. Dieses Ergebnis war von G. Bell für homogene Adhäsion theoretisch vorhergesagt worden [19].

Die Reduktion der Adhäsionsstärke durch die Abstandshalter ist für die mechanische Stabilität weicher adhärerender Zellen (wie Erythrozyten) oder Vesikel extrem wichtig, denn ohne diese würden diese weichen Schalen kollabieren. Der zweite stabilisierende Kontrollfaktor ist die Membranelastizität. Sie bestimmt die Adhäsionsstärke über die Randbedingungen. Wie oben erwähnt, nutzen Zellen diesen Weg zur Regulation der Adhäsionsstärke  $W$  in der zweiten Phase des Adhäsionsprozesses durch Kopplung der intrazellulären Segmente der Rezeptoren an das Zytoskelett. Dies zeigen Experimente mit Zellen der Amöbe *Dictyostelium Discoideum*. Die Biegesteifigkeit  $\kappa$  der Hülle normaler Zellen beträgt ca.  $1000 k_B T$ . Entkoppelt man die Plasmamembran vom Aktinnetzwerk durch Entfernung des Aktin-Membran-Vernetzers Talin (Abb. 8) über eine Mutation, so wird die Biegesteifigkeit um einen Faktor 20 kleiner. Die Folge ist die Reduktion der Adhäsionsstärke um fast eine Größenordnung [10].

### Wie Zellen die Adhäsion dynamisch steuern

Bei der Evolution höherer Organismen musste die Natur Wege zur schnellen Kontrolle des Adhäsionszustandes finden. Betrachten wir das Beispiel der kriechenden Bewegung von Zellen auf Gewebeoberflächen, durch zyklisches Ausstülpen von Pseudofüßchen (Pseudopodien) an der Vorderfront und Retraktion der Hinterseite. Dazu müssen in Sekundenschnelle Haftstellen am vorderen Ende der Zelle gebildet und am hinteren abgebaut werden. Die Adhäsionsstärke muss andererseits groß genug sein, um bei der Vorwärtsbewegung Kräfte von einigen nano-Newton auf die Unterlage zu übertragen. Dies wäre ohne die Strategie der Domänenbildung und die dadurch bedingte Möglichkeit, mit wenigen der kostbaren Rezeptoren auszukommen, gar nicht möglich. Der Zelle steht damit außerdem eine ganze Reihe von Kontrollmechanismen zur Verfügung (Abb. 9). Die Zahl der Rezeptoren oder Abstandshalter an der Zelloberfläche kann in Sekundenschnelle durch Internalisierung (Endozytose) oder Export (Exozytose) variiert werden. Die Dichte der Abstandshalter wird häufig auch durch spezifische Enzyme, sog. Proteasen, reguliert, welche die Kopfgruppen abschneiden [20].

Auch von außen kann die Adhäsion sehr wirkungsvoll reguliert werden. Ein Beispiel ist die Kappung der R-L-Bindungen durch Antagonisten der Liganden, welche die Rezeptoren blockieren [13]. Ein anderer Trick besteht in der Manipulation der Gewebeoberfläche. Diesen Trick wenden z. B. Krebszellen bei der Metastasenbildung an. Um vom Blutstrom in das Gewebe zu kommen, müssen sie Lücken in der geschlossenen Schicht aus Zellen (Endothelzellen) schaffen, welche die Innenwand der Adern auskleiden. Sie senden dazu

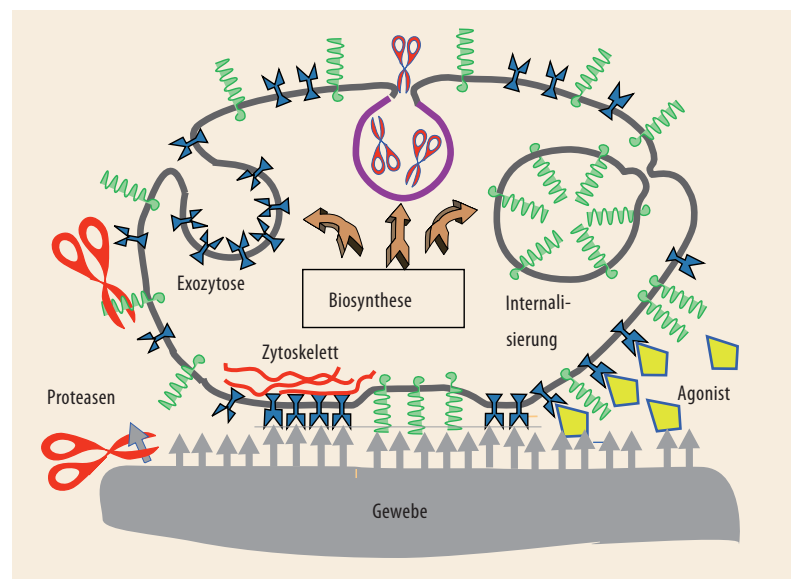


Abb. 9 Die Zelladhäsion lässt sich durch Variation der Dichte der Rezeptoren und Puffermoleküle auf der Zelloberfläche kontrollieren. Möglich sind die Erhöhung der Rezeptorkonzentration durch Exozytose, die Reduktion der Abstoßung

durch Internalisierung der Puffermoleküle, die Entbindung durch Agonisten der Liganden (nach [13]) und die Entbindung durch Abspaltung der Liganden des Gewebes.

Proteasen aus, welche die Bindungsstellen für die Zellrezeptoren der Endothelzellen auf der Oberfläche der Aderwand abbauen (Abb. 9, links) und so Lücken in der schützenden Zellschicht schaffen.

## Ausblick

Das Studium der Zelladhäsion zeigt eindrucksvoll, wie Zellen die Gesetze der Physik „nutzen“, um ihre Materialeigenschaften an die Umgebungsbedingungen anzupassen. Es zeigt aber umgekehrt auch, dass man komplexe biologische Systeme auf der Basis der Physik verstehen kann. Dabei spielt der Aufbau von möglichst realistischen Modellen eine wichtige Rolle. Das konzertierte Studium von Modellen und natürlichen Systemen kann uns aber vielleicht auch helfen, neue Wege zur Herstellung smarterer technischer Materialien zu finden, die ihr Verhalten an die Umgebungsbedingungen anpassen.

Um weiter in die Geheimnisse der Physik der Zelladhäsion einzudringen, führt kein Weg am parallelen Studium von realistischeren Modellen, natürlichen und mutierten Zellen vorbei. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung ist der Aufbau mechanischer Zellmodelle durch Rekonstitution von Aktin-Netzwerken in Vesikel. Bisherige Versuche zeigen, dass dies machbar ist [21]. Die zweite Aufgabe besteht in der Weiterentwicklung der Elastizitätstheorie biologischer Schalen, die schnell zur nichtlinearen Schalentheorie von Föppl und Kapitza führt [14]. Dies ist nicht nur notwendig, um die sekundären Prozesse zu verstehen, sondern auch Voraussetzung zur genauen Messung von Adhäsionsenergien von Zellen und deren Modifikation durch Mutationen oder Krankheiten.

## Danksagung

Dieser Artikel ist meinem langjährigen Kollegen, Diskussionspartner und Begründer der Elastizitätstheorie biologischer Membranen Wolfgang Helfrich gewidmet.

\*

Allen Personen zu danken, die mich zur Biophysik führten oder zu meinen wissenschaftlichen Arbeiten beitrugen, würde eine Seite füllen. Ich möchte nur den zu früh verstorbenen Freund Hermann Träuble erwähnen, mit dem ich die ersten Schritte in die Membranforschung machte, und mich bei den zahlreichen jungen Kollegen, Doktoranden und Diplomanden bedanken, mit denen zusammenzuarbeiten mir ungeheurer Freude machte und von denen ich mindestens ebensoviel lernte wie sie von mir.

## Literatur

- [1] T. Pollard und W. Earnshaw, Cell Biology, Saunders and Elsevier, Philadelphia (2002)
- [2] D. Zagury et al., Eur. J. Immunol. **5**, 818 (1975)
- [3] M. L. Dustin et al., Trends Immunol. **22**, 192 (2001)
- [4] M. Rief und H. Grubmüller, Phys. Blätter, Februar 2001, S. 55
- [5] E.-L. Florin et al., Science **264**, 415 (1994)
- [6] E. Sackmann, Physik Journal, Februar 2004, S. 35
- [7] S. Goennenwein et al., Biophys. J. **85**, 646 (2003); M. Tanaka und E. Sackmann, Nature **437**, 656 (2006)
- [8] B. Hu et al., Biochemistry **39**, 12284 (2000)
- [9] P. Fromherz, Phys. Blätter, Februar 2001, S. 43
- [10] R. Simson et al., Biophys. J. **74**, 514 (1998)
- [11] a) E. Sackmann und R. Bruinsma, ChemPhysChem **3** 262, 2002; b) R. Bruinsma, A. Behrlich und E. Sackmann, Phys. Rev. E **61**, 4253 (2000); c) Z. Guttenberg et al., Langmuir **16**, 8984 (2000)
- [12] U. Seifert und R. Lipowsky, Phys. Rev. A **42**, 4768 (1990)
- [13] a) A. Smith und U. Seifert, Phys. Rev. E **71**, 061902 (2005); b) A. Smith et al., Biophys. J. **90**, 1 (2006)
- [14] L. D. Landau und E. M. Lifschitz, Lehrbuch der Theoretischen Physik, Bd. VII, Elastizitätstheorie, Akademie-Verlag, Berlin (1998)
- [15] W. Helfrich, Z. Naturf. **33A**, 305 (1978)
- [16] R. Bruinsma, M. Goulian und P. Pincus, Biophys. J. **67**, 746 (1994)
- [17] A. Zidovska und E. Sackmann, Phys. Rev. Lett. **96**, 048103 (2006)
- [18] S. Marx et al., Phys. Rev. Lett. **88**, 138102 (2002)
- [19] G. I. Bell, M. Dembo und P. Bongrand, Biophys. J. **45**, 1051 (1984)
- [20] C. Shelley, N. Da Silva und J. Teodoridis, British J. of Hematology **115**, 159 (2001)
- [21] L. Limozin, A. Roth und E. Sackmann, Phys. Rev. Lett. **89**, 168103 (2002)

## DER AUTOR

**Erich Sackmann** (links, bei der Preisverleihung mit DPG-Präsident Knut Urban) hat in Stuttgart und München Physik studiert und in Stuttgart promoviert. Nach Postdoc-Aufenthalten bei den Bell Labs sowie am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen wurde er 1974 auf einen Lehrstuhl in Ulm berufen. 1980 folgte er dem Ruf auf einen Lehrstuhl für Biophysik an der TU München, der er bis zu seiner Emeritierung 2003 treu blieb. Aus dem Studium „alter Meister“ wie Young und von Helmholtz heraus entwickelte Sackmann die Vision, die Selbstorganisation und Funktion lebender Materie auf der Basis physikalischer Prinzipien zu verstehen. Dazu hat er u.a. eine Reihe von neuen Messtechniken entwickelt.



F. M. Schmidt