

Funktionalisierung strukturierter Oberflächen mit E-Cadherin-Ektodomänen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. Nat)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften am

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

vorgelegte

Dissertation

von

Sinem Engin

aus Bremen

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Co-Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2010

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie (Zoologie II) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Zeit vom Januar 2006 bis Mai 2010 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Sinem Engin, Juli 2010

Meine Religiösität besteht in einer
demütigen Bewunderung für den unendlich hohen Geist,
der sich in dem wenigen offenbart, dass wir
- mit unserem schwachen, flüchtigen Verständnis -
von der Wirklichkeit erfassen können.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen und Spezialbegriffe		a-b
1	Einleitung	1
1.1	Die Familie der Cadherine	2
1.1.1	Klassische Typ I Cadherine	3
1.1.2	Die <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Interaktion zwischen Cadherin-Ektodomänen	5
1.1.3	Glykosilierung der Cadherin-Ektodomäne	6
1.1.4	Der Cadherin-Catenin Komplex	6
1.2	Biofunktionalisierte Oberflächen	9
1.2.1	Oberflächenmodifikation mittels selbstorganisierter Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs)	9
1.2.2	Micro-Contact Printing (μ CP) – Eine Methode zur Herstellung von gemustert modifizierten Oberflächen	10
1.2.3	Kovalente Immobilisierung von Proteinen auf SAMs - Das SNAP-tag Kopplungssystem	11
2	Zielsetzung	14
3	Materialien	15
4	Methoden	25
4.1	Molekularbiologische und biochemische Methoden	25
4.1.1	Transformation chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	25
4.1.2	Proteinexpression in <i>E.coli</i> -Bakterien	25
4.1.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	26
4.1.4	Western-Blot-Analyse	28

4.1.5	Proteingehaltsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay	
	30	
4.2	Zellbiologische Methoden	30
4.2.1	Kultivieren und Passagieren humaner und muriner Zelllinien	
	30	
4.2.2	Bestimmung der Zellzahl	31
4.2.3	Einfrieren von Zellen	31
4.2.4	Proteinextraktion durch nichtionisches Detergens (NOP-Lysate)	32
4.2.5	Transfektion eukaryotischer Zellen und Ernten von Zellkulturüberständen	32
4.2.6	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	33
4.2.7	Zelladhäsionsassay	
	34	
4.3	Ni-NTA Affinitätschromatographie	35
4.3.1	Vorbereitung der Probe für Ni-NTA Affinitätschromatographie	37
4.3.2	Reinigen und Bepacken einer Chromatographiesäule	
	38	
4.3.3	Reinigungsprogramm der FPLC-Anlage	
	38	
4.4	Funktionalisierung und Analytik von Oberflächen	40
4.4.1	Herstellung Gold beschichteter Plättchen	40
4.4.2	Herstellung homogener Thiol-SAMs für XPS-, QCM-D und ToF-SIMS-Messungen	40
4.4.3	Herstellung gemusterter Thiol-SAMs mittels Micro-Contact Printing (μ CP)	40
4.4.4	Röntgen-Photoelektron-Spektroskopie (XPS)	41
4.4.5	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	43
4.4.6	Quartz Crystal Microbalance Dissipation (QCM-D)	43
4.4.7	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS)	44

4.4.8	Ellipsometrie	
	45	
4.4.9	Dip-Pen Nanolithographie (DPN) von Phospholipiden	
	46	
	auf Glas	
4.4.10	Kopplung von SNAP-getaggten Proteinen auf DPN-Lipid-Strukturen	47
4.4.11	Beschichtung von Microspheres mit hEcad-Fc	
	47	
4.4.12	Microspheres auf DPN-Oberflächen	48
5	Ergebnisse	49
5.1	Proteinexpression und Proteinreinigung	49
5.1.1	Expression von His-SNAP-GFP in E.coli BL21-AI TM	50
5.1.2	Reinigung von His-SNAP-GFP aus dem Bakterienzelllysat	51
5.1.3	Vergleich der Expression von hsEcad1-2-SNAP und hsEcad1-5-SNAP in HEK293 und COS-7	53
5.1.4	Reinigung von hsEcad1-5-SNAP-His12 aus Zellkulturüberständen	
	54	
5.2	Oberflächenanalytik	57
5.2.1	Nachweis der SAM-Ausbildung mittels XPS	58
5.2.2	Bestimmung der SAM-Schichtdicke mittels Ellipsometrie	61
5.2.3	Bestimmung der SAM-Schichtdicke mittels AFM	61
5.2.4	Nachweis der SAM-Ausbildung mittels ToF-SIMS	63
5.2.5	Bestimmung der Menge an SNAP-getaggttem His-GFP auf BG-Thiol funktionalisierten Oberflächen mittels QCM-D und AFM	65
5.3	Überprüfung der SNAP-BG-Reaktion an Oberflächen	66
5.3.1	Bindung von His-SNAP-GFP an μ CP-Oberflächen	67
5.3.2	Bindung von His-SNAP-GFP an Lipid-DPN-Oberflächen	69
5.4	Bindung von SNAP-His-getaggttem E-Cadherin EC1-5 an BG-funktionalisierten Oberflächen	70

5.4.1	Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 an μ CP- Oberflächen	
	70	
5.4.2	Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 an Lipid-DPN-Oberflächen	72
5.5	Funktionalität des über SNAP-BG bzw. His-Ni ²⁺ -NTA gebundenen hsE-Cadherin EC1-5	75
5.5.1	E-Cadherin-beschichtete Microspheres (Ecad-MS) auf hsEcad1-5-SNAP-His12 gekoppelten Lipid-DPN-Oberflächen	75
5.5.2	Zelladhäsion auf hsEcad1-5-SNAP-His12 beschichteten Oberflächen	78
6	Diskussion	90
6.1	Expression von E-Cadherin Ektodomänen in eukaryotischen Zellen und Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	90
6.2	BG-Thiol enthaltende SAMs lassen sich für die Funktionalisierung mit SNAP-getaggtten Proteinen herstellen	92
6.3	BG-Lipid enthaltende Lipid-Layer können mit SNAP-getaggtten Proteinen funktionalisiert werden	98
6.4	An BG-Thiol-SAM gebundenes E-Cadherin EC1-5 ist funktional	101
7	Zusammenfassung	104
8	Anhang	106
8.1	Schematischer Aufbau des E-Cadherins	106
8.2	Vektorkarte für hsEcad1-2-SNAP in pSEMS1-26m	106
8.3	Vektorkarte für hsEcad1-5-SNAP in pSEMS1-26m	107
8.4	Vektorkarte für hsEcad1-5-SNAP-His12 in pSEMS1-26m	108
8.5	Vektorkarte für His-SNAP-GFP in pBAD-SNAP26B-GFP	109
9	Literaturverzeichnis	110

Danksagung	122
Publikationen	123
Lebenslauf	125

1 Einleitung

Die Entstehung, der Erhalt und die Funktion eines multizellulären dreidimensionalen Gewebes resultieren aus einer komplexen zeitlichen und räumlichen Abstimmung einer Vielzahl einzelner Zellprozesse. Das Verhalten jeder Zelle trägt zum Gesamtzustand eines multizellulären Gewebes bei und wird durch zahlreiche molekulare Signale bestimmt, die in der Umgebung der Zelle vorzufinden sind. Zu diesen Signalen gehören lösliche Faktoren (z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokine), unlösliche Makromoleküle (z. B. Fibronectin, Laminin, Kollagen) und Proteine, die sich auf der Oberfläche benachbarter Zellen befinden (z. B. Cadherine, CAM's). Mittels spezifischer Zelloberflächenrezeptoren wird die Information extrazellulärer Signale in die Zelle übermittelt, wobei intrazelluläre Signalwege aktiviert werden. Die Koordination dieser Signalwege führt schließlich zu der endgültigen Reaktion der

Zelle (z. B. Migration, Differenzierung oder Proliferation) (Abb. 1.1).

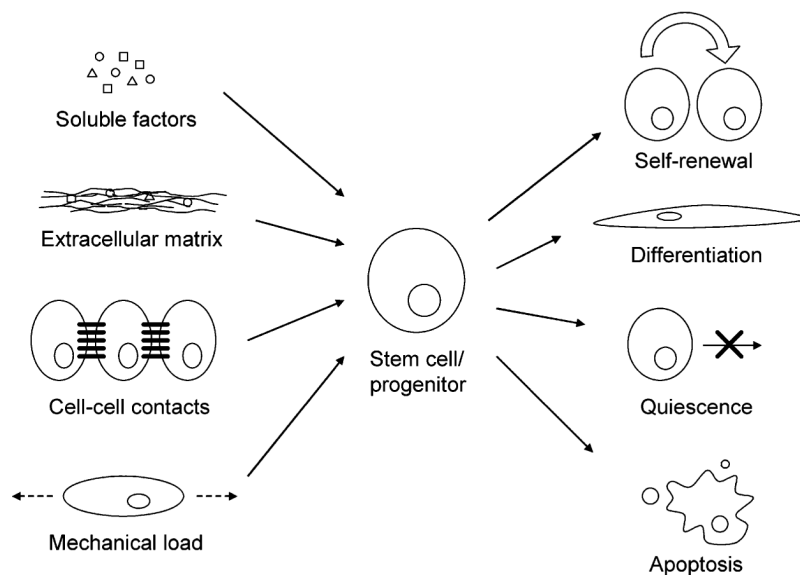


Abb. 1.1: Einfluss verschiedener Signale der extrazellulären Umgebung am Beispiel einer Stammzelle. Lösliche Faktoren, extrazelluläre Matrix (ECM), interzelluläre Kontakte und biophysikalische Kräfte wirken gemeinsam auf eine Stammzelle. Diese Faktoren laufen in intrazellulären Signalwegen zusammen und steuern die Zellteilung, Differenzierung oder den

Zelltod (aus Metallo et al., 2007).

Eine gezielte Kontrolle des Zellverhaltens und der Zellfunktion ist in der regenerativen Medizin und der Gewebezüchtung erwünscht. Durch die Applikation bestimmter Signalmoleküle in der extrazellulären Umgebung soll das Schicksal einer Zelle gezielt

in eine Richtung gelenkt werden. Damit lässt sich das Verhalten von Stammzellen regulieren, um Gewebe unterschiedlichen Typs zu regenerieren, Gewebewachstum zu ermöglichen und die Wundheilung von beschädigtem Gewebe zu gewährleisten (Li & Li, 2006; Metallo et al., 2007). Dies setzt voraus, dass die Kontrollsysteme bzw. -mechanismen in Takt sind und ihre zeitliche und räumliche Koordination nicht gestört ist. Andernfalls besteht die Gefahr eines unkontrollierten Zellwachstums und damit der Tumorentstehung. Wenig ist über den Mechanismus des wechselseitigen Einflusses der verschiedenen extrazellulären Faktoren auf eine Zelle bekannt. Darüber hinaus bedarf es intelligenter dreidimensionaler Gerüste, um Gewebe aus unterschiedlichen Zelltypen zu generieren. Hier sind künstlich geschaffene Materialien mit definierten biologischen und chemischen Eigenschaften von größter Bedeutung. Die gewünschten Materialeigenschaften können über die Struktur und die chemische Kopplung biologischer Moleküle erzielt werden.

Cadherine kommen in Stammzellnischen vor, wo sie für den Erhalt der Stammzeleigenschaften mitverantwortlich sind (Hosokawa et al., 2010). Andererseits tragen Cadherine auch zur zelltypischen Differenzierung bei (Vodyanik et al., 2005; Bosnakovski et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde der am besten untersuchte Vertreter der Familie, E-Cadherin, als Kandidat zur Biofunktionalisierung von artifiziellen Oberflächen ausgewählt.

1.1 Die Familie der Cadherine

Cadherine bilden eine Superfamilie von transmembranen Zelladhäsionsproteinen, die eine kalziumabhängige homophile Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Die Cadherin Superfamilie wird in sechs Unterfamilien unterteilt. Diese sind die klassischen Typ I und Typ II Cadherine, so wie die atypischen Cadherine: Desmocolline, Desmogleine, Protocadherine und die Flamingo-Cadherine. Darüber hinaus gibt es noch eine Reihe von Cadherin verwandten Proteinen, die keiner der Unterfamilien zugeordnet werden können. Die klassischen Cadherine sind Bestandteile spezialisierter Zellkontaktstellen, den sogenannten Adherens Junctions (AJ). In AJs kontrollieren

Cadherine zusammen mit Mitgliedern der Catenin-Familie wie p120-Catenin, β -Catenin und α -Catenin, die Bildung, den Erhalt und die Funktion der AJs. Über die Bindung zytoplasmatischer Proteine wie den Cateninen wechselwirken Cadherine indirekt mit Proteinen der Tight Junctions (TJ) (Abb. 1.2). Eine Reorganisation des AJ-Komplexes führt unweigerlich zu einer Reorganisation der TJs und umgekehrt. An polarisierten Epithelzellen befinden sich die TJs apikal zu den AJs. Bei der Reifung von AJs bildet sich ein Aktinfilamentbündel (Adhäsionsgürtel), das in der apikalen Region unterhalb der TJs an der Zellmembran entlang läuft. Durch die homophile Bindung der Cadherine kommt es zu einer Entmischung von Zellen, die unterschiedliche Cadherine exprimieren (Steinberg & Takeichi, 1994; Duguay et al., 2003). Folglich haben Cadherine eine entscheidende Rolle in vielen biologischen Prozessen während der Embryonalentwicklung und der Gewebemorphogenese (Larue et al., 1994; Radice et al., 1997) so wie in der Tumorgenese (Perl et al., 1998).

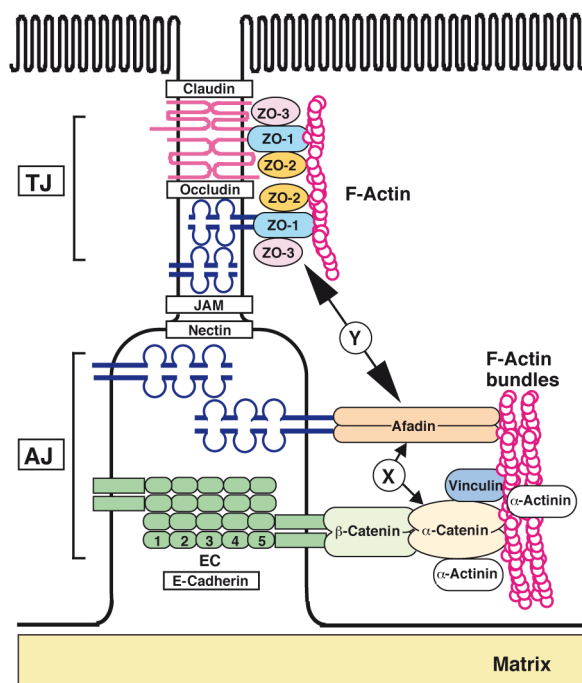


Abb. 1.2: Molekulare Grundlagen der TJs und AJs. TJs bestehen aus Claudin und Occludin. JAM ist ein weiteres TJ-Protein. ZO-1, ZO-2 und ZO-3 assoziieren an die zytoplasmatischen Domänen von Claudin, Occludin und JAM. ZO-1 und ZO-2 verbinden die TJ-Proteine mit F-Actin und bilden ein Dimer mit ZO-3. Afadin und ZO-1 sind über ein Adapterprotein (Y) miteinander verbunden. AJs bestehen aus E-Cadherin, dessen zytoplasmatische Domäne mit β -Catenin bindet, welches wiederum α -Catenin bindet. α -Catenin bindet entweder direkt oder indirekt über Vinculin und α -Actinin am Aktinfilamentbündel. Nectin ist ein weiteres AJ-Protein, das über Afadin an das Aktinfilamentbündel bindet. Afadin ist über ein Adapterprotein (X) mit α -Catenin assoziiert (aus Takai & Nakanishi, 2003).

1.1.1 Klassische Typ I Cadherine

Die klassischen Cadherine besitzen eine aminoternale extrazelluläre (EC) Domäne, auch Ektodomäne genannt, eine Transmembrandomäne und eine carboxyterminale zytoplasmatische Domäne. Die Ektodomäne setzt sich aus fünf sich wiederholenden Domänen EC1 bis EC5 zusammen (Abb. 1.3 a). Jede dieser Domänen wird aus ca. 110 Aminosäuren aufgebaut und bildet eine β -Sandwich-Struktur (Shapiro et al., 1995). An den Übergängen zwischen den Domänen können je drei Ca^{2+} -Ionen gebunden werden (Boggon et al., 2002; Courjean et al., 2008). Durch die Bindung von Kalzium wird die Gesamtstruktur und die adhäsive Funktion der Ektodomäne beeinflusst (Pertz et al., 1999, Koch et al., 1999). Sind alle Bindungsstellen mit Ca^{2+} -Ionen besetzt, ist die Ektodomäne unbeweglich und stabförmig, so dass sie über der Zellmembran aufgerichtet ist. Je weniger Kalzium vorhanden ist, desto beweglicher wird die Ektodomäne. Unter diesen Bedingungen erschlafft sie und kann durch Proteasen leichter abgebaut werden (Pokutta et al., 1994; Koch et al. 1999; Pertz et al., 1999). Bei Ca^{2+} -Ionen Konzentrationen über 0,5 mM sind die Cadherin-Ektodomänen aufgerichtet und adhäsiv (Tomschy et al., 1996; Koch et al., 1997). Boggon et al. (2002) zeigten mittels Röntgenstruktur Analysen, dass die Ektodomäne von C-Cadherin zwar gestreckt ist, aber eine gebogene Form aufweist (Abb 1.3 b). Diese Form ist wichtig für die *cis*-Dimerisierung der Ektodomänen an der Oberfläche einer Zelle. Zusätzlich identifizierten sie in der carboxyterminalen EC5 zwei Disulfidbindungen und konnten die Positionen von 12 O- und drei N-Glykosilierungen bestimmen.

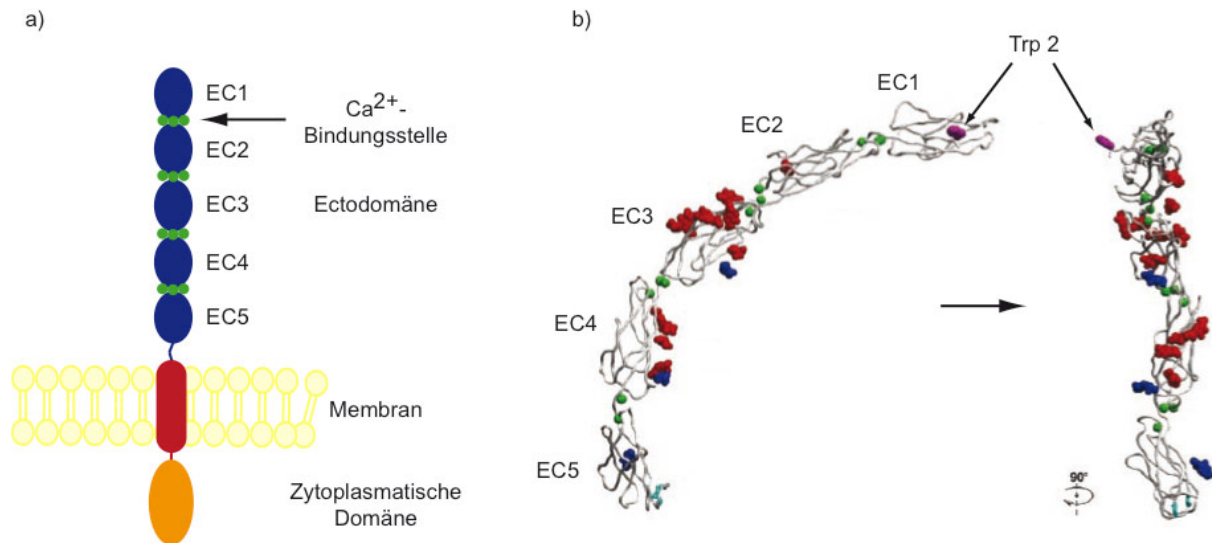


Abb. 1.3: Struktur der extrazellulären Domäne eines Cadherins. (a) Schematische Darstellung eines Cadherins mit der extrazellulären (blau), transmembranen (rot) und zytoplasmatischen (orange) Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist aus fünf Domänen (EC1-EC5) aufgebaut. Zwischen den Domänen befinden sich Bindungsstellen für drei Ca²⁺-Ionen. (b) Röntgenstrukturanalytisch ermittelte Struktur der C-Cadherin Ectodomäne. Violett: Tryptophan2, grün: Ca²⁺-Ionen, rot: O-gebundener Zucker, blau: N-gebundener Zucker, cyan: Disulfidbindung (aus Boggon et al, 2002).

Die zytoplasmatische Domäne verankert die klassischen Cadherine am Aktin-Zytoskelett und dient der Signaltransduktion. β -Catenin bindet an die zytoplasmatische Domäne und kann seinerseits α -Catenin binden, welches die Verknüpfung zum Aktin-Zytoskelett direkt oder indirekt über Aktin-assoziierte Proteine wie ZO-1, Spektrin, Vinculin, Afadin oder α -Aktinin herstellt. Auch regulatorische Proteine wie p120-Catenin bindet an die zytoplasmatische Cadherin-Domäne, verglichen mit β -Catenin näher an der Zellmembran. Dort verhindert es den endozytotischen Abbau des Cadherins z. B. durch Hakai (Thoreson et al., 2000; Fujita et al., 2002).

1.1.2 Die *cis*- und *trans*-Interaktion zwischen Cadherin-Ectodomänen

Das heutige Modell besagt, dass Cadherine derselben Zelloberfläche Homodimere bzw. -multimere durch *cis*-Interaktion bilden. Erst in dieser Form findet eine *trans*-Interaktion mit Cadherinen der gegenüberliegenden Zelloberfläche statt (Shapiro et

al., 1995) (Abb. 1.4). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die *cis*-Interaktion für die adhäsive Funktion der Cadherine notwendig aber nicht ausreichend ist (Ozawa, 2002). Bei der *cis*-Interaktion bindet die EC1 einer Cadherin-Ektodomäne mit der EC2 einer benachbarten Cadherin-Ektodomäne (Boggon et al., 2002). Dabei bilden sich Cadherin-Cluster, die eine Zell-Zell-Adhäsion begünstigen (Briehner et al., 1996; Yap et al., 1998). Bei der *trans*-Interaktion kommen die EC1 zweier Ektodomänen in Kontakt, die an gegenüber liegenden Zellmembranen sitzen. Es kommt zu einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen der Tryptophan²-Seitengruppe (Abb. 1.3 b) und der hydrophoben Tasche, bestehend aus der Histidin-Alanin-Valin (HAV) Sequenzfolge, zweier gegenüberliegender EC1.

Die Adhäsionsfähigkeit der Cadherine wird unter anderem durch proteolytische Prozessierung reguliert. Nach der Transkription besitzen viele Cadherine ein N-terminales Propeptid das eine *trans*-Interaktion verhindert. Man geht davon aus, dass das Propeptid erst nach Integration des Cadherins in die Zellmembran entfernt wird (Ozawa & Kemler, 1990). Erst nach der Abspaltung des Propeptids sind Tryptophan² und die HAV-Sequenz frei für *trans*-Interaktionen.

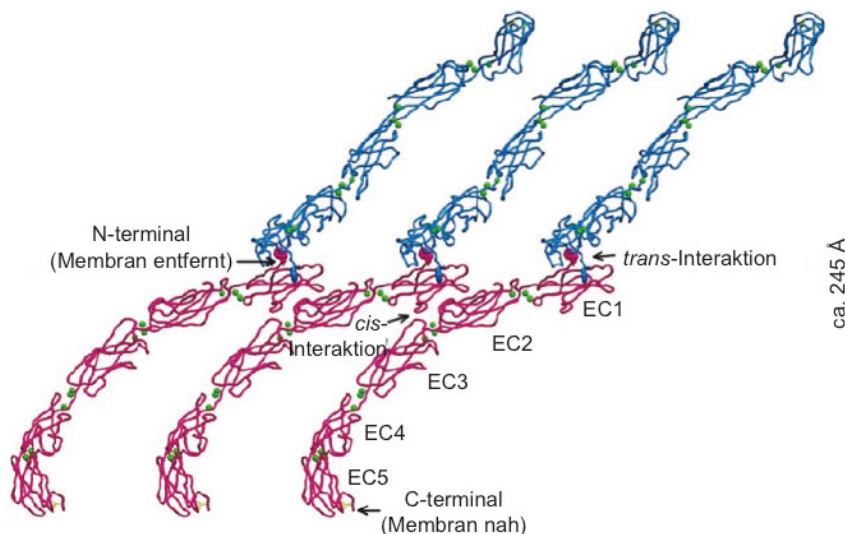


Abb. 1.4: Darstellung der *cis*- und *trans*-Interaktion zwischen C-Cadherin Ektodomänen ermittelt aus Röntgenstrukturanalysen. Die *cis*-Interaktion findet zwischen der EC1 und der EC2 benachbarter Ektodomänen statt. Bei der *trans*-Interaktion, kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Ektodomänen gegenüberliegender Zellmembranen (aus Boggon et al., 2002).

1.1.3 Glykosylierung der Cadherin-Ektodomäne

An der Cadherin-Ektodomäne wird die Adhäsionsstärke durch Glykosilierungen moduliert. Für das humane E-Cadherin sind vier N-glykosilierungs Positionen bekannt, von denen zwei in der EC4 und zwei in der EC5 liegen. Die N-Glykosilierung reguliert unter anderem die E-Cadherin Adhäsionsaktivität. Durch die N-Glykosilierung wird die Verweildauer des E-Cadherins an der Zellmembran erhöht. Desweiteren wird die Zell-Zell-Adhäsion erhöht und die intrazelluläre Signaltransduktion herunterreguliert (Yoshimura et al., 1996; Kitada et al., 2001). Die N-Glykosilierung an Asparagin 633 scheint entscheidend für die E-Cadherin Stabilität zu sein. Ist diese Position nicht glykosiliert, faltet sich das Protein dergestalt, dass es im Endoplasmatischem Reticulum zurück bleibt und degradiert wird (Zhou et al., 2008).

1.1.4 Der Cadherin-Catenin-Komplex

Durch die Assoziation verschiedener Proteine an die zytoplasmatische Cadherin-Domäne können unterschiedliche Funktionen erfüllt werden: (1) Die Stabilität der AJs kann beeinflusst werden. (2) Die Adhäsivität und die Verweildauer der Cadherine an der Zellmembran kann moduliert werden. (3) Es kann zu einer Signaltransduktion kommen, die zur Regulation von Genexpressionen führt.

β -Catenin ist ein Protein das an die C-terminale Region der zytoplasmatischen Domäne der Cadherine bindet. In der Zelle besitzt es eine Doppelfunktion. Neben der Beteiligung in der Zell-Zell-Adhäsion spielt es auch eine Rolle als Effektormolekül im kanonischen Wnt-Signalweg, wo es als transkriptionaler Co-Aktivator im Zellkern fungiert (Clevers, 2006). Die N-terminale Region von β -Catenin kann mit dem Aktin-bindenden α -Catenin assoziieren und somit die Cadherine mit dem Aktinzytoskelett verbinden. Viele Daten belegen, dass es sich hierbei um eine direkte Bindung des Cadherin-Catenin-Komplexes über α -Catenin an das Aktinzytoskelett handelt. Neuere Daten zeigen jedoch, dass α -Catenin nicht gleichzeitig mit Cadherin gebundenem β -Catenin und dem Aktinzytoskelett assoziiert sein kann (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005) (Abb. 1.5). In diesem Model geht man davon aus, dass nur monomeres α -

Catenin an den Cadherin/ β -Catenin-Komplex bindet und die Arp2/3-vermittelte Aktinverzweigung erlaubt. Sobald der Cadherin-Cluster gereift ist, dissoziieren α -Catenin-Monomere vom Cadherin/ β -Catenin-Komplex und bilden Dimere. Als Dimer kann α -Catenin an Aktin binden. Ist es an Aktin gebunden wird die verzweigte Aktinpolymerisation durch Arp2/3 unterbunden. Stattdessen findet eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts statt, mit der die Bildung des Adhäsionsgürtels einsetzt. Wie genau die Verbindung zwischen Cadherin-Catenin-Komplex und dem Aktin-Zytoskelett zustande kommt ist zur Zeit noch unklar. Man nimmt an, dass EPLIN das Verbindungsglied zwischen dem Cadherin-Catenin-Komplex und dem Aktin-Zytoskelett ist (Abe & Takeichi, 2008).

Das p120-Catenin (p120) ist ein Protein, das an die N-terminale Region der zytoplasmatischen Domäne der Cadherine bindet. Es reguliert die Adhäsionsstärke der Cadherine, indem es deren Clusterung fördert (Yap et al., 1998; Thoreson et al., 2000). Darüber hinaus reguliert p120 die Internalisierung bzw. den Einbau von Cadherinmolekülen in die Zellmembran (Ireton et al., 2002; Davis et al., 2003).

IQGAP1 und IQGAP2 gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die die Aktivität kleiner GTPasen reguliert. Sie besitzen eine Affinität zu Rho GTPasen und sind an der basolateralen Membran vorzufinden, wobei IQGAP2 vermehrt im apikalen Bereich lokalisiert ist. Man nimmt an, dass sie die Cadherin-abhängigen Zell-Zell-Kontakte nachgeschaltet von Rac1 und Cdc42 regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass IQGAP1 β -Catenin vom Zell-Adhäsionskomplex verdrängt und dadurch die Zelladhäsion schwächt (Kuroda et al., 1998). IQGAPs beeinflussen die Bildung und die Stabilität der Cadherin-abhängigen Zell-Adhäsion indem sie direkt oder als Effektormoleküle von Rac1 und Cdc42 fungieren.

Des Weiteren können verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), wie EGFR oder FGFR an den Cadherin-Catenin-Komplex binden, wodurch die Zell-Zell-Adhäsion und die RTK-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst wird (Hoschuetzky et al., 1994; Pece & Gutkind, 2000).

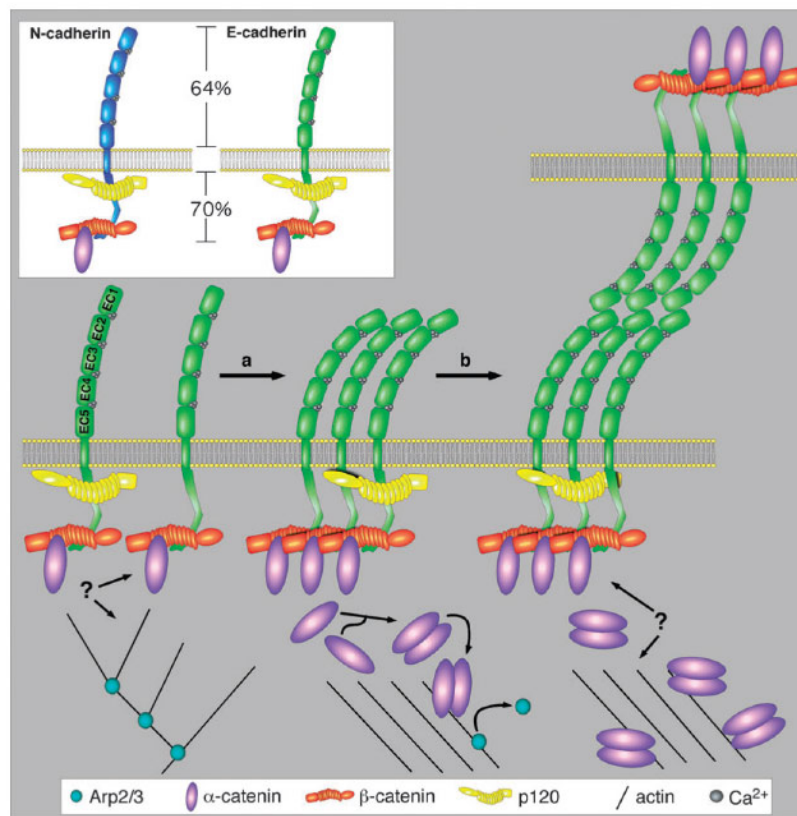


Abb. 1.5: Der Cadherin-Catenin-Komplex und die Entstehung der Cadherin-abhängigen AJs. β -Catenin bindet an die C-terminale, p120-Catenin bindet an die N-terminale Region der zytosomatischen Domäne. α -Catenin bindet als Monomer an β -Catenin. Durch *cis*-Interaktionen der extrazellulären Domänen benachbarter Cadherinmoleküle einer Zelloberfläche bildet sich der Cadherin-Cluster (a). Durch *trans*-Interaktion kommt es zur Zell-Zell-Adhäsion (b). Durch die Cadherin-Clustering wird die α -Catenin-Konzentration erhöht. α -Catenin dissoziiert und bildet Dimere. α -Catenin-Dimere binden an Aktin, verhindern somit die Arp2/3-abhängige verzweigte Aktinpolymerisation und führen zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, bei der der Adhäsionsgürtel entsteht. Der E-Cadherin- und N-Cadherin-Komplex ist oben links eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Sequenzidentität beider Cadherine (aus Stemmler, 2008).

1.2 Biofunktionalisierte Oberflächen

Durch die Funktionalisierung von Oberflächen mit molekularen Einheiten, die in der natürlichen Umgebung einer Zelle vorkommen, kann das Verhalten der Zelle kontrolliert und in die gewünschte Richtung gesteuert werden. So können z. B. Position und Morphologie einer Zelle kontrolliert werden, wenn sie auf modifizierten Oberflächen von gemustertem Fibronektin kultiviert werden (Chen et al., 1998). Ein weiterer Vorteil der Biofunktionalisierung besteht darin, dass der Effekt einzelner extrazellulärer Faktoren auf Zellen bzw. Zellverbände untersucht werden kann. So

können Oberflächen mit ECM-Proteinen (Fibronektin, Laminin, Kollagen) oder dem RGD-Peptid modifiziert werden, um die Zell-Matrix-Adhäsion zu untersuchen (Lehnert et al., 2004; Cavalanti-Adam et al., 2007). Es können auch Zelladhäsionsproteine auf Oberflächen angebracht werden, um die Dynamik und Mechanik der Zell-Zell-Adhäsion auf molekularer Ebene aufzudecken (du Roure et al., 2006).

1.2.1 Oberflächenmodifikation mittels selbstorganisierter Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs)

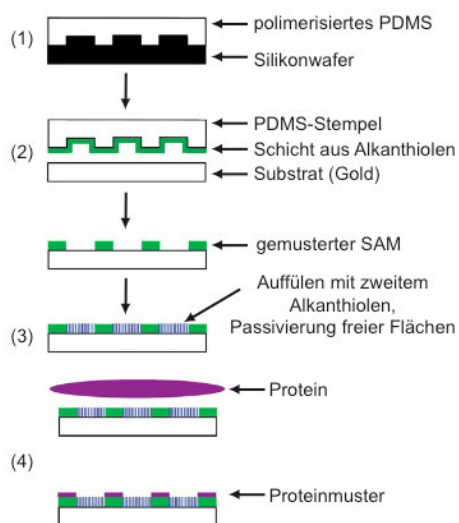
Seit der ersten Beschreibung von Dialkylsulfiden im Jahr 1989 (Nuzzo & Allara, 1989) wurden eine Reihe organischer Schwefelverbindungen für die Herstellung von SAMs eingesetzt. Unter anderem wurden von Whitesides und Kollegen SAMs aus langkettigen Alkanthiolen auf Gold beschrieben (Bain & Whiteside, 1989). Es bildet sich ein SAM aus, indem man das Substrat (Gold) in eine Alkanthiol-Lösung eintaucht. Die Alkanthiol-Moleküle werden spontan auf dem Substrat aus der Lösung chemisorbiert und bilden adsorbierte Alkanthiolate. Die Eigenschaften der SAM-Oberfläche entsprechen der terminalen funktionellen Gruppe der Ausgangs-Alkanthiol-Moleküle. Man nimmt an, dass bei dem Prozess der Chemisorption der Wasserstoff der Thiol-Gruppe abgespalten wird. Was genau mit diesem Wasserstoff passiert, wird kontrovers diskutiert (Love et al., 2005; Woodruff, 2008). Neuere Daten belegen, dass der Wasserstoff tatsächlich abgespalten wird und mit der terminalen Monoschicht interagiert (Kankate et al., 2009). Durch die Bindung des Schwefels an Gold werden die Alkylketten in engen Kontakt zueinander gebracht, so dass eine geordnete Struktur entsteht. Alkanthiole mit $n > 11$ bilden die am dichtesten gepackte Monoschichten. Die Bildung von Thiol-SAMs auf Gold aus Alkanthiol-Lösungen erfolgt innerhalb einer halben Stunde. Diese Fähigkeit, schnell geordnete SAMs zu bilden, ist ein wesentlicher Faktor der den Einsatz von Alkanthiolen in der Softlithographie erlaubt, wie z. B. das Micro-Contact Printing (μ CP) und der Dip-Pen Nanolithographie (DPN) und die den Erfolg dieser Methoden bestimmt.

Für biologische Anwendungen ist es entscheidend, unspezifische Proteinadsorption an Biomaterialien zu unterbinden. Nur dadurch können spezifische Bindungen, die auf den Biomaterialien erwünscht sind, gewährleistet und sichergestellt werden, so wie es z. B. für den Einsatz von Biosensoren der Fall ist (Herrwerth et al., 2003). SAMs aus Alkanthiolen mit einer terminalen Polyethylenglycol (PEG)-Einheit $[\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}; n = 2-7]$ haben die Eigenschaft unspezifische Adsorption von Proteinen zu unterbinden (Prime & Whitesides, 1993; Mrksich et al., 1995). Obwohl Alkanthiole mit PEG-Gruppen als Proteinadsorption unterbindende Einheiten in SAMs eingesetzt werden, ist der Mechanismus der Protein abstoßenden Eigenschaft nicht eindeutig geklärt. Folgende Faktoren scheinen jedoch eine Schlüsselfunktion für die Proteinadsorption unterbindende Eigenschaft eines SAMs zu haben: (1) Innerhalb der Alkylthiol-Kette muss es eine hydrophile chemische Struktur geben (Herrwerth et al., 2003). (2) Die der Oberfläche zugewandten Gruppen im SAM müssen frei beweglich sein und Konformationsfreiheit besitzen (Vanderhah et al., 2004). (3) Die Summe der freien Energie für die Wechselwirkung zwischen Wasser, Protein und der zur Oberfläche zugewandten Gruppen des SAMs muss Null oder positiv sein (Latour, 2006). Unabhängig von der Natur der terminalen Gruppe ist auf SAMs, deren zur Oberfläche zugewandten Einheiten keine Konformationsfreiheit besitzen, immer die Adsorption von Proteinen zu beobachten (Silin et al., 1997; Harder et al., 1998).

1.2.2 Micro-Contact Printing (μCP) – Eine Methode zur Herstellung von gemustert modifizierten Oberflächen

Das μCP ist eine simple, kostengünstige, flexible und vielseitig einsetzbare Methode. Sie wurde erfolgreich zur Modifizierung von Oberflächen mit Polymeren (Feng et al., 2006) und Biomolekülen wie Proteinen und Lipiden (Bernard, et al., 1998; Kim et al., 2006) eingesetzt. In den 90er Jahren kamen Alkanthiole mit der Fähigkeit SAMs zu bilden in der μCP -Technik zum Einsatz (Bain & Whitesides, 1998). Die einzelnen Schritte der μCP -Methode sind in Abb. 1.6 schematisch dargestellt. Es zeigt die

allgemeine Vorgehensweise bei der Herstellung von Oberflächen, die mit SAMs modifiziert sind. Zunächst wird das Elastomer hergestellt, indem über einen mikrostrukturierten Master (gewöhnlich ein Silikonwafer) Poly(dimethoxysiloxan) (PDMS) polymerisiert wird (1). Der PDMS-Stempel wird mit der Alkanthiol-Lösung benetzt und anschließend mit dem Substrat (Gold) in Kontakt gebracht (2). Mit einem



zweiten Alkanthiol werden die nicht behandelten Flächen aufgefüllt, um diese zu passivieren (3). Dann kann ein gewünschtes Protein über die spezifische Wechselwirkung mit dem bestempelten Thiol gemustert an der Oberfläche gebunden werden (4).

Abb. 1.6: Schematische Darstellung der μ CP-Technik. Modifiziert nach Shin, 2007.

1.2.3 Kovalente Immobilisierung von Proteinen auf SAMs – Das SNAP-tag Kopplungssystem

Auf SAM-Oberflächen, deren Eigenschaften durch die Natur der terminalen Gruppe der Ausgangs-Alkanthiole bestimmt werden, können Proteine nicht-kovalent und kovalent immobilisiert werden.

Für die nicht-kovalente Immobilisierung wurden SAMs mit terminalen Nitrilotriessigsäure-Einheiten (NTA) beschrieben (Sigal et al., 1996) und erfolgreich eingesetzt (Gamsjäger et al., 2004; Fick et al., 2010). Die NTA-Gruppe ist ein Komplexbildner und komplexiert Ni^{2+} und das His-tag Motiv, das molekularbiologisch an das Zielprotein angebracht werden kann, selektiv. Mit einer Dissoziationskonstante von $K_D \approx 10 \mu\text{M}$ ist die Affinität zwischen Ni^{2+} /NTA-His-tag jedoch sehr schwach (Dorn et al., 1998). Kürzlich wurden SAMs aus Alkanthiolen mit zwei bis drei NTA-Gruppen

beschrieben (Valiokas et al., 2008). Diese haben eine höhere Affinität zum His-tag und zeigen niedrige Dissoziationskonstanten von $K_D \approx 68$ nM für zwei NTA-Gruppen und $K_D \approx 2$ nM für drei NTA-Gruppen (Lata et al., 2005). Des Weiteren wurden Alkanthiole mit terminalem Biotin zur Immobilisierung von Streptavidin an SAMs eingesetzt (Spinke et al., 1993; Nelson et al., 2001). Die Biotin-Streptavidin-Bindung ist sehr stark und nähert sich mit einer Dissoziationskonstante von $K_D \approx 10^{-6}$ nM der Stärke einer kovalenten Bindung (Laitinen et al., 2006).

Für die kovalente Immobilisierung von Proteinen auf SAMs wurden bisher unterschiedliche Verfahren angewendet. Unter anderem machte man sich die NHS/EDC-Chemie an COOH-terminalen SAMs zunutze (Patel et al., 1997, Delamarche et al., 1998). Maleimid-terminale gemischte Dithiole wurden zur Bindung von Thiol-terminalen Peptiden und Carbohydrat-Liganden eingesetzt (Houseman et al., 2003). Aldehydterminale Thiole wurden zur Bindung von Amino-Gruppen enthaltenden Proteinen, wie Enzyme und Antikörper verwendet (Horton et al., 1997).

Die genannten Methoden zur kovalenten Immobilisierung gewährleisten aber nicht die richtige Orientierung und Konformation der Biomoleküle auf den Oberflächen. Dies ist jedoch entscheidend für den Erhalt der Proteinfunktionalität. Eine Immobilisierung, die an einer spezifischen Stelle des Proteins erfolgt und die das Protein in die richtige Orientierung bringt, ist daher unerlässlich.

Kindermann et al. zeigten, dass für die Seiten-spezifische orientierte Immobilisierung von Proteinen der SNAP-tag eingesetzt werden kann (Kindermann et al., 2003). Der Ursprung des SNAP-tags ist das humane DNA reparierende Enzym O^6 -Alkylguanin-DNA-alkyltransferase (hAGT). Das Enzym katalysiert den Transfer der Alkyl-Gruppe von seinem Substrat O^6 -Alkylguanin-DNA auf einen seiner Cystein-Reste (Abb. 1.7). O^6 -Benzylguanin (BG), das an Position 4 des Benzolrings substituiert ist, kann verwendet werden, um *in vivo* und *in vitro* hAGT-Fusionsproteine N- oder C-terminal mit verschiedenen Markern zu verbinden (Keppler et al., 2003). Eine Mutation des hAGT führte zu einer 20-fachen Erhöhung der Aktivität des Enzyms gegenüber seinem Substrat BG (Juillerat et al., 2003). Das BG kann über einen Linker auf Oberflächen gebunden werden, um hAGT-Fusionsproteine zu immobilisieren. In unterschiedlichen

Experimenten wurde dieses Verfahren erfolgreich eingesetzt (Huber et al., 2004; Kufer et al., 2005).

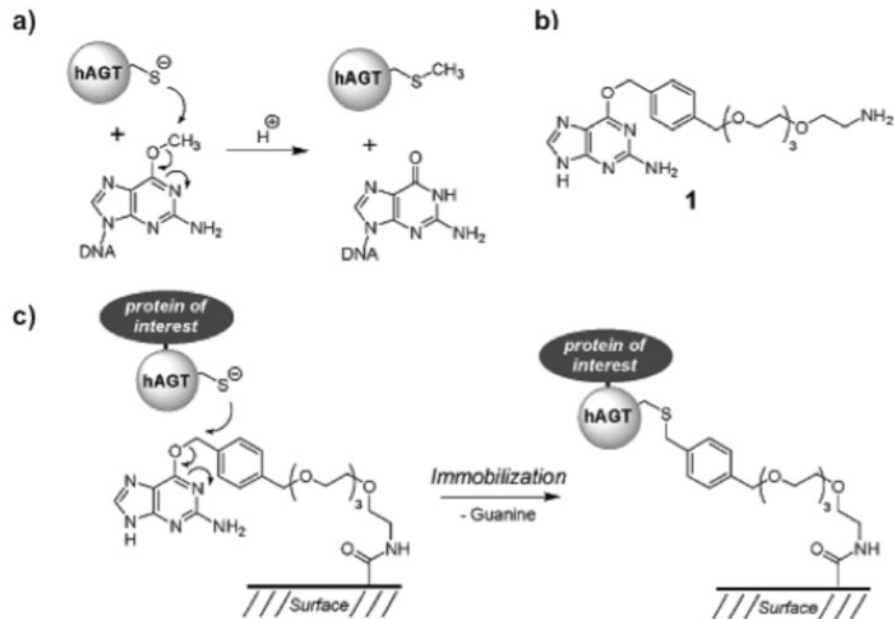


Abb. 1.7: Immobilisierung von hAGT-Fusionsproteinen. (a) hAGT basierende DNA-Demethylierung. (b) Struktur von O⁶-Benzylguanins, das an Position 4 des Benzolrings mit Guanin substituiert ist und drei Ethylenglykol-Einheiten mit NH₂-terminalem Linker besitzt (1). (c) Die kovalente Immobilisierung eines hAGT-Fusionsproteins an einer Oberfläche, die mit der Struktur 1 beschichtet ist.

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, strukturierte Oberflächen funktionalisiert mit E-Cadherin Ektodomänen für Zell-Assays herzustellen. Für die Kopplung der E-Cadherin Ektodomäne an Oberflächen sollte die SNAP-tag Kopplungsmethode gewählt werden. Diese Methode erlaubt die kovalente Bindung der E-Cadherin Ektodomäne und ermöglicht die für die Cadherinfunktionalität entscheidende C-terminal-spezifische und damit orientierte Immobilisierung. Zunächst sollte die E-Cadherin Ektodomäne als SNAP-tag-Fusionsprotein in eukaryotischen Zellen produziert und aufgereinigt werden. Um die SNAP-getaggte E-Cadherin Ektodomäne an Oberflächen zu immobilisieren sollten gemischte SAMs aus einem proteinadsorptionsresistentem Alkanthiol und einem BG-terminalem Alkandithiol hergestellt werden. Um die erfolgreiche Herstellung zu belegen, sollten diese SAMs mittels verschiedener analytischer Methoden wie XPS, Ellipsometrie, ToF-SIMS und AFM charakterisiert werden. Durch μ CP sollten BG-terminale Alkandithiol enthaltende SAMs gemustert auf Oberflächen aufgebracht werden. Die SNAP-tag-BG-Kopplung sollte zunächst mit einem bakteriell produzierten Protein (His-SNAP-GFP) getestet werden. Nach erfolgreicher Etablierung der Kopplungsmethode sollten anschliessend Oberflächen mit E-Cadherin Ektodomänen funktionalisiert werden. Ihre Funktionalität sollte in Zelladhäsionsteste untersucht werden. Dafür sollten mit E-Cadherin transfizierte Zelllinien und als Vergleich die entsprechenden Ausgangszelllinien eingesetzt werden. Durch Immunfluoreszenzfärbung sollte zusätzlich die spezifische Interaktion dieser Zellen mit E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen belegt werden.

3 Materialien

Antikörper

- α - β -Catenin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- α -His-tag (Qiagen GmbH, Hilden)
- α -GFP (Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
- α -E-Cadherin (H-108) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)
- α -E-Cadherin (Sec21) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)
- α -SNAP-tag (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
- α -Uvomorulin, Klon: DECMA-1 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- AP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)
- AP-konjugiertes Ziege-anti-Ratte IgG (Dianova, Hamburg)
- CyTM2-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)
- CyTM2-konjugiertes Ziege-anti-Ratte IgG (Dianova, Hamburg)
- CyTM3-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)
- CyTM3-konjugiertes Ziege-anti-Ratte IgG (Dianova, Hamburg)
- GP84 aus Kaninchenserum (R. Kemler, MPI, Freiburg)
- Ziege-anti-Mensch IgG, Fc γ (Dianova, Hamburg)

Bakterienstamm

E. coli BL21-AITM (Invitrogen, Darmstadt)

Genotyp: *F ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm araB::T7RNAP-tetA*

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders vermerkt, sind alle verwendeten Chemikalien von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe),

oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

- BG-Pull down Beads (Covalys Biosciences AG, Witterswil, Schweiz)
- Complete EDTA-free (Protease Inhibitor Cocktail Tabletten) (Roche Diagnostics, München)
- Membranfilter GH Polypro (Pall GmbH, Dreieich)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein (Molekulargewichtsstandard) (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- Profinity™ IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Protran BA 83, Nitrocellulosemembran (Whatman GmbH, Dassel)
- Rekombinantes humanes E-Cadherin Fc Chimäre (hEcad-Fc) (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- RC 58 Membranfilter (Regenerierte Cellulose) (Whatman GmbH, Dassel)
- Rhodamin markiertes Lipid: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamin rhodamin B sulfonyl) (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA)
- Sulfat Latex Microspheres, 8% w/v, Ø 3 µm (Invitrogen, Darmstadt)
- Vivaspin15 Zentrifugalfiltereinheiten (Sartorius, Göttingen)

Geräte

- Blotgerät:
Trans-Blot SD Semi-Drytransfer Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
mit Stromanschlußgerät PowerPac 200 (Bio-Rad)
- Chromatographie-Säulen:
Chromatographie-Säule Serie ECOplus (TAC15/125PE0-AB-1) (KronLab
Chromatographie Technology, Dinslaken)
- Dip-Pen-Nanolithographie(DPN)-Gerät (Nscriptor, NanoInk Inc., USA) ausgestattet
mit DPN-Schreiber (Nscriptor, NanoInk Inc., USA), eindimensionalen Spitzen-
Arrays (D Typ; A26) und Inkwells (Typ W4 und IWL-0021-01) (NanoInk Inc., USA)
- Elektrophoresekammer:
Mini Trans Blot (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Ellipsometer:
SE 400 Einwellenlängen-Ellipsometer, Wellenlänge 632,8 nm, µ-Spot: 50 µm Ø

(Sentech Instruments GmbH, Berlin)

- Feinwaage:
TE124S (Sartorius, Göttingen)
- FPLC-Anlage:
BioLogic HR Chromatography System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
ausgestattet mit BioLogic Workstation, Fraction Collector Model 2128 und
BioLogic HR System Software
- Inkubatoren:
 - Zellkulturinkubator Steri-Cycle CO₂ Incubator (Thermo Forma, Dreieich)
 - Binder (Binder GmbH, Tuttlingen)
- Mikroskope:
 - Durchlichtmikroskop Olympus CK2 (Olympus Europa GmbH, Hamburg)
 - Fluoreszenzmikroskop DMIRE2 (Leica Mikroskop, Bensheim) ausgestattet mit
Digitalkamera C4742-95-12 ERG (Hamamatsu, Herrsching), Software:
Openlab 4.0.3 und 5.5.0 (Openlab, Heidelberg)
 - Rasterkraftmikroskop NanowizardTM II (JPK Instruments, Berlin) ausgestattet
mit V-geformte Blattfeder (MSCT-AUWH, Veeco Instruments, Santa Barbara, CA,
USA), Auswertung der AFM-Messungen mit JPK Image Processing Software
 - Spinning Disk Mikroskop Observer. Z1 (Carl Zeiss AG, Jena) ausgestattet mit
Spinning Disc-Einheit Yokogawa (Electric Corporation, Tokyo, Japan)
Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss AG, Jena)
Software AxioVision (Carl Zeiss AG, Jena)
- Photometer:
UV/Visible Spectrophotometer, Ultraspec 2100pro (Amersham Bioscience,
Freiburg)
- QCM-D:
QCM-D System D300 mit micro-axialer Flusszelle QAFC302 und Sensorkristalle
(Q-Sense, Västra Frölunda, Schweden)
- Schüttler:
 - Kippschüttler Rocky (Fröbel Labortechnik, Lindau)
 - Orbital Shaker (Thermo Forma, Dreieich)

- Sputteranlage:
Leybold-Heraeus Z 400 (Leybold-Heraeus GmbH, Hürth)
- Sterilbank:
Microflow advanced safety cabinet class 2 (Nunc, Langenselbold)
- Thermoblock:
Grant Boekel BBA (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- TOF-SIMS:
TOF-SIMS⁵ (ION-TOF GmbH, Münster)
- Ultraschallbad:
Sonorex (Bandlin, Mörfelden-Walldorf)
- Wasserbäder:
 - Memmert (Schwabach)
 - WB12 (Medingen GmbH, Dresden)
- XPS:
 - K-Alpha XPS-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., East Grinstead, UK)
Auswertungssoftware: Advantage bzw. Unifit for Windows
 - Theta Probe Spektrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., East Grinstead, UK)
- Zentrifugen:
 - Heraeus Multifuge 3S-R (Kendro, Langenselbold)
 - Heraeus Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold)
 - Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg)
 - Universal 32R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
 - Ultrazentrifuge Discovery M120SE (Sorval Centrifuges, Dreieich)

Kits

- BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid) (Thermo Fisher Scientific Inc., Bonn)
- ECL PlusTM Western Blotting Detection System (Amersham GmbH, Freiburg)

Plasmide

Alle Vektorkarten der in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide und ein schematischer Aufbau der entsprechenden Proteine können dem Anhang entnommen werden.

- His-SNAP-GFP in pBAD für die Expression in Bakterien von Covalys, Schweiz, Witterswil
- hE-Cadherin1-2-SNAP in pSEMS1-26m für die Expression in Eukaryoten von J. Kashef, Karlsruhe
- hE-Cadherin1-5-SNAP in SEMS1-26m für die Expression in Eukaryoten von D. Fichtner, Karlsruhe
- hE-Cadherin1-5-SNAP-His12 in pSEMS1-26m für die Expression in Eukaryoten von D. Fichtner, Karlsruhe

Puffer und Lösungen

- Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer:
100 mM Tris/HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl
- Alzianblau Beschichtungslösung:
1% (w/v) Alzianblau, 1% (v/v) Essigsäure
- Ampicillin-Stammlösung (1000x):
100 mg Ampicillin pro ml Aqua bidest., Lagerung bei -20°C
- Blotpuffer:
25 mM Tris/Base, 1,5% Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
- Blockierungslösung für Blots:
5% Milchpulver in TBS-T
- Blockierungslösung für Immunfärbung:
1% BSA in 1x PBS
- Borat-Puffer:

0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, pH 8

- Coomassie Brilliant Blue (CBB)-Färbelösung:
4 g CBB R250, 100 ml Essigsäure, 450 ml Methanol auf 1l Wasser
- CBB-Entfärbelösung:
45 % Methanol, 10 % Essigsäure
- DAPI-Kernfärbelösung:
Stammlösung: 1 mg/ml in DMF, Gebrauchslösung: Stammlösung 1:1000 in 1x

PBS

- Elektrophoresepuffer (Laemmli, SDS-Laufpuffer):
25 mM Tris/Base, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
- Elutionspuffer:
500 mM Imidazol in HBS, pH 7,5
- HBS-Puffer:
10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5
- LB-Medium:
10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l Wasser, pH 7,5
- LB-Medium mit Antibiotika:
1 ml Antibiotikallösung pro Liter LB-Medium
- Lysis-Puffer:
10 mM Imidazol in HBS, pH 7,5, + Proteaseinhibitor
- Mowiol-Gebrauchslösung:
6 g Glycerin, 2,4 g Mowiol 4-88, 12 ml 0,2 M Tris-HCL (pH 8,5), 25 mg DABCO pro ml Lösung
- NBT/BCIP-Färbelösung:
1,75 $\mu\text{l/ml}$ NBT und 3,5 $\mu\text{l/ml}$ BCIP (Roche) in AP-Puffer
- NOP-Puffer (für Cadherine):
150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM MgCl_2 , 0,75 mM CaCl_2 , 2% NP40
- SDS-Ladepuffer:
50 mM Tris (pH 6,8), 100 mM β -Mercaptoethanol, 10% Glycin, 1% SDS, 0,1% Bromphenolblau
- PBS-Puffer:

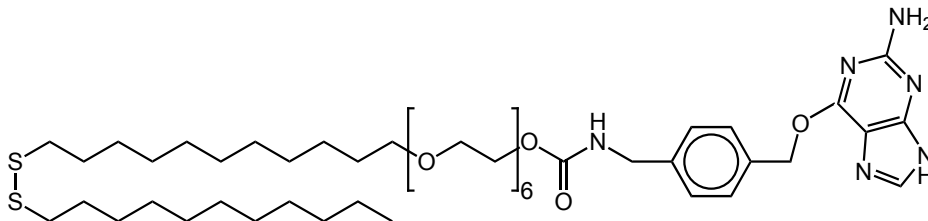
136 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4

- Permeabilisierungslösung:
0,1% Triton® X-100 in 1x PBS
- PFA-Fixierlösung:
4% Paraformaldehyd in 1x PBS
- Startpuffer:
10 mM Imidazol in HBS, pH 7,5
- TBS-Puffer:
50 mM Tris/HCl (pH 7,3), 50 mM NaCl

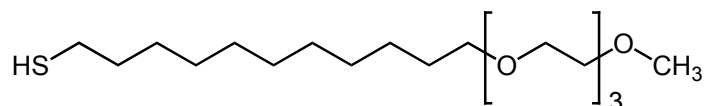
- TBS-T:
50 mM Tris/HCl (pH 7,3), 50 mM NaCl, 0,05% Tween 20

Thiole und Lipide

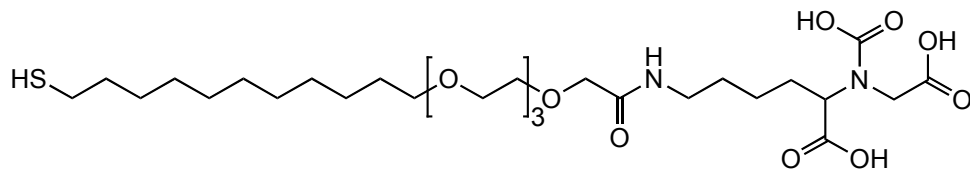
- Benzylguanin (BG)-Thiol ($\text{C}_{49}\text{H}_{84}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}_2$) (Covalys Biosciences AG, Witterswil, Schweiz)



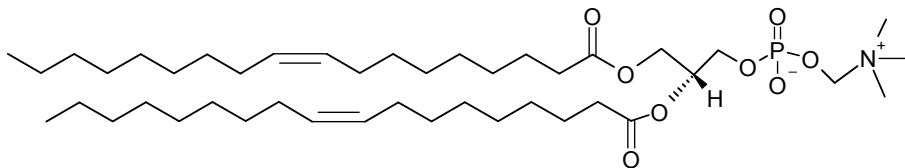
- Methoxy-terminales (MeO)-EG₃-Thiol ($\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{S}$) (Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Material Forschung, Dr. K. Rischka, Bremen)



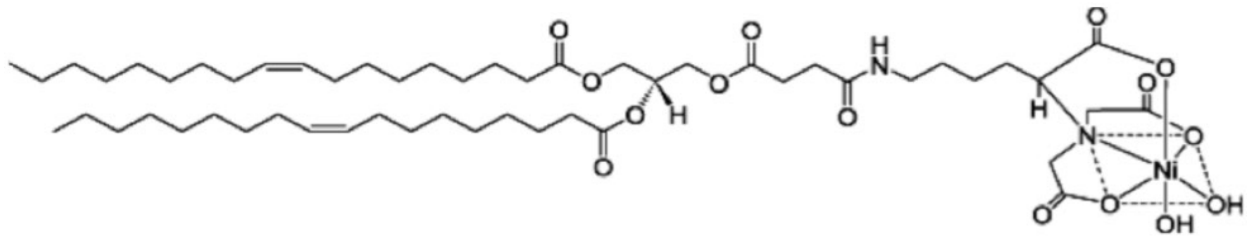
- NTA-Thiol ($C_{27}H_{50}O_{11}N_2S$) (ProChimia, Sopot, Polen)



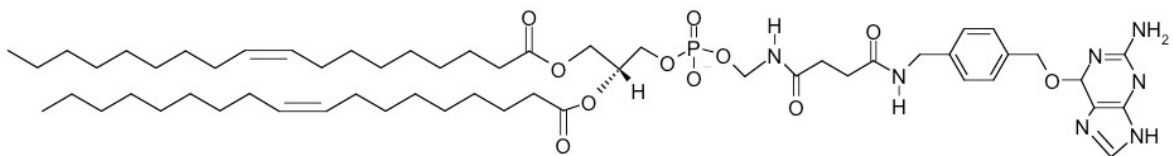
- DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, 18:1(Δ^9 -Cis) PC ($C_{44}H_{84}NO_8P$) (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA)



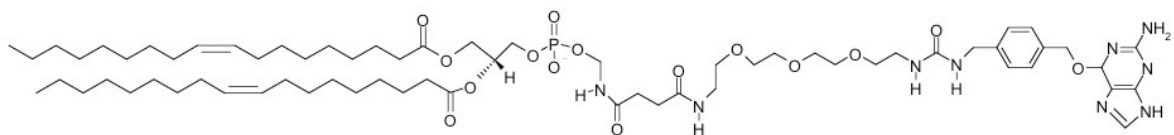
- DOGS-NTA-Ni, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3- $\{[N(5\text{-amino-1-carboxypentyl})\text{iminodiessigs\u00e4ure}]succinyl\}$ (Nickelsalz) (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA)



- BG-DOPE ($C_{57}H_{93}N_7O_{11}P$) (Dr. A. Welle, Karlsruhe)



- BG-PEG-DOPE ($C_{65}H_{111}N_9O_{15}P$) (Dr. A. Welle, Karlsruhe)



Zelllinien, Zellkulturverbrauchsmaterialien und Medien

Für die Expression von Proteinen wurden HEK293 (human embryonic kidney)-, COS-7- und CHO (chinese hamster ovarian)-Zellen eingesetzt. Für Zelladhensionsversuche auf Oberflächen wurden L-Zellen, stabil transfiziert mit murinem E-Cadherin (L-1-1-Uvo-Zellen) (Ozawa & Kemler, 1990) und mit E-CadherinEGFP (EcadEGFP-L-Zellen),

untransfizierte L-Zellen, mit E-CadherinEGFP transfizierte HeLa-Zellen (EcadEGFP-HeLa-Zellen), untransfizierte HeLa-Zellen und HEK 293-Zellen verwendet.

- DMEM Komplettmedium:
10% FCS, 1% Pen/Strep in DMEM
- Dulbecco´s Modified Eagle Medium, DMEM (PAA Laboratories, Cölbe)
- Fötales Kälberserum (FCS) (Gibco® Invitrogen, Darmstadt)
- Geniticindisulfat (G418®), steril, Stammlösung:
1g G418® auf 1 ml
- 25 cm² Gewebekulturflaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- 75 cm² Gewebekulturschalen (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA Laboratories, Cölbe)
- TC-Platten, 6-well, steril (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- TransPass™ COS-7/293 Transfektionsreagenz (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
- Trypsin-EDTA (1x) (PAA Laboratories, Cölbe)
- Vereinzellungslösung:
2% Hühnerserum, 2 mM EDTA in PBS

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

4.1.1 Transformation chemisch-kompetenter *E.coli*-Bakterien

Unter Transformation versteht man die Veränderung des Genotyps einer Bakterienzelle durch die Aufnahme fremder, nackter DNA aus der Umgebung. Es werden 5 ng pBAD-SNAP26B-GFP Plasmidvektor auf 5 µl BL21-AITM Bakterienzellen eingesetzt. Für die Transformation wird ein Volumen von 100 µl Bakterien angesetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 90 Sekunden Hitzeschock im 42°C-warmem Wasserbad erfolgt die Zugabe von 400 µl LB-Medium. Danach werden die Zellen bei 37°C und 225 rpm für eine Stunde geschüttelt und anschließend auf einer LB_{Amp}-Platte ausplattiert. Diese wird bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.1.2 Proteinexpression in *E.coli*-Bakterien

Jeweils 10 ml LB_{Amp}-Medium werden mit Klonen, die über Nacht auf LB_{Amp}-Platten gewachsen sind, angeimpft, indem man ein Klon mit einer 200 µl-Pipettenspitze pickt und diese in das Medium abwirft. Die Bakterien werden über Nacht bei 37°C unter Schütteln hochgezogen.

500 ml LB_{Amp}-Medium wird mit 10 ml über Nacht Kultur angeimpft. Die Zellen werden so lange auf dem Schüttler bei 37°C wachsen gelassen, bis sie die Dichte von einem OD600-Wert von 0,7-0,8 erreicht haben. Durch Zugabe von 0,2% L-Arabinose wird die Expression von His-SNAP-GFP induziert und für vier Stunden unter permanentem Schütteln bei 37°C fortgesetzt. Zur Kontrolle der Proteinexpression in Abhängigkeit der Zeit wird nach jeder Stunde 500 µl für die SDS-PAGE entnommen. Die Zellen werden bei 4°C und 8000 xg für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und kann bis zur weiteren Behandlung bei -80°C gelagert werden.

Die Zellen werden mit Lysis-Puffer resuspendiert (10 ml Lysis-Puffer auf 1,5 g Zellpellet) und mit Ultraschall behandelt. Hierfür werden die resuspendierten Zellen auf Eis 5x hintereinander 2,5 Minuten mit 30% Ultraschall behandelt, wobei zwischen jeder Ultra-schallbehandlung eine Ruhephase von 2,5 Minuten liegt. Zur Trennung der Zellbruch-stücke vom Proteinrohextrakt wird das Lysat bei 4°C und 28000 rpm für 30 Minuten in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthält das gewünschte Protein welches zur Reinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie zur Verfügung steht (siehe 4.3.1).

4.1.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-PAGE ist eine Methode, mit deren Hilfe man Proteine je nach ihrer Größe auftrennen kann. Die Zugabe von SDS denaturiert zum einen die Proteine, so dass sie nur noch als monomere Proteinuntereinheiten vorliegen. Zum anderen werden die Proteine mit einer negativ geladenen Hülle umgeben. Daher wandern sie im elektrischen Feld zur Kathode. Die negative Ladung verhält sich proportional zum dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts des Proteins, wodurch man einen linearen Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit der Polypeptidketten und dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts erhält. Dadurch lässt sich die Masse von Proteinen bestimmen. Dithiothioit (DTT) bzw. Mercaptoethanol führt zum Bruch der Disulfidbrücken. Bei der SDS-PAGE wird ein Polyacrylamidgel verwendet. Dieses besitzt nach der Zugabe von N,N-Methylen-bisacrylamid eine dreidimensionale Vernetzung. Die Größe der dabei entstehenden Poren hängt vom Mengenverhältnis zwischen Polyacrylamid und Bis-acrylamid ab. Als Katalysator und Stabilisator der Radikale wird TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylen-diamin), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt.

Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Proteine wandern zunächst durch das Sammelgel, das eine größere Polyacrylamid-Porenweite als das Trenngel besitzt. Im Sammelgel-Puffer befinden sich Chlorid-

Ionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist als die der Proteine. Dagegen wandern die im Elektrophorese-Puffer vorhandenen Glycinmoleküle langsamer. Die Proteine reihen sich entsprechend ihrer Geschwindigkeit im elektrischen Feld zwischen den Glycinmolekülen mit einer niedrigen und den Chlorid-Ionen mit einer hohen Mobilität ein. Somit werden die Proteine in einer scharfen Protein-Bande aufkonzentriert. Das Trenngel besitzt, neben der geringeren Polyacrylamid-Porenweite, einen höheren pH-Wert und eine höhere Salzkonzentration. An der Grenze zum Trenngel werden die Glycinmoleküle ionisiert und wandern an den dicht gepackten Proteinen vorbei. Im Trenngel erfolgt die Aufteilung der Proteine nach ihrer molekularen Größe. Als Molekulargewichtsstandard dienen Proteine mit einer definierten Größe.

Für ein 8%iges Trenngel werden 2,3 ml Aqua bidest., 1,3 ml 30% (w/v) Acryl-Bisacrylamid Mix, 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 und 50 µl 10% (w/v) SDS benötigt. Durch Zugabe von 3 µl TEMED und 50 µl 10% (w/v) APS wird die Polymerisation gestartet. Das noch flüssige Trenngel wird zu ca. 3/4 zwischen zwei in eine Glasapparatur eingespannte Glasplatten gegossen und mit Aqua bidest. überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation wird das Aqua bidest. entfernt und das Sammelgel nach folgender Vorschrift angesetzt: 2,1 ml Aqua bidest., 500 µl 29,22% (w/v) Acrylamid, 0,79% (w/v) Bisacrylamid, 380 µl 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 30 µl 10% (w/v) SDS, 3 µl TEMED und 30 µl 10% (w/v) APS. Dieses frisch angesetzte Sammelgel wird auf das polymerisierte Trenngel gegeben. Zur Ausbildung von Ladetaschen wird ein Kamm in das noch nicht polymerisierte Sammelgel gesteckt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wird der Kamm entfernt. Die Glasplatte wird in die Elektrophoresekammer gespannt, die mit dem Puffer gefüllt wird. Anschließend lädt man das Gel mit dem Molekulargewichtsstandard und den Proteinproben, die zuvor mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C inkubiert wurden. Zunächst wird eine Spannung von 80 V angelegt. Haben die Proteine das Trenngel erreicht, kann die Spannung auf 120 V erhöht werden. Die Auftrennung der Proteine ist vollständig abgelaufen, sobald die Bromphenolblau-Front aus dem Trenngel ausgetreten ist. Das Polyacrylamidgel wird vorsichtig aus den Glasplatten befreit und

kann sofort für eine Coomassie-Färbung benutzt oder einer Western-Blot-Analyse unterzogen werden.

Die Proteine im Gel können durch zwei Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Die Coomassie-Färbung ermöglicht die Visualisierung von Proteinen ab einer Menge von 50-100 ng pro Bande. Ist die Menge des Proteins weniger, kann man diese mit der Silberfärbung nachweisen. Diese ist wesentlich sensitiver und ermöglicht die Färbung von bereits 0,1-1 ng pro Bande. Für die Coomassiefärbung wird das Trenngel für 15 Minuten in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Danach wäscht man es kurz in Aqua bidest. und inkubiert es 3x zehn Minuten in Coomassie-Entfärbelösung. Je nach Hintergrund-intensität kann das Entfärben verlängert werden. Für die Silberfärbung wird mit einer Lösung aus 40% Ethanol und 7% Essigsäure mindestens 3 Stunden fixiert. Dann wird das Gel 3x 10 Minuten mit 10% Ethanol und 3x 10 Minuten mit Aqua bidest. gewaschen, um anschließend für 30 bis 60 Minuten in einer 0,1%igen Silbernitratlösung gefärbt zu werden. Das Gel wird anschließend kurz in Aqua bidest. gespült und in der Entwickler-lösung (2-3% Na_2CO_3 /0,02% Formaldehyd) 10-30 Minuten entwickelt. Die Entwicklung wird mit einer 1%igen Essigsäure-Lösung gestoppt. Zur weiteren Aufbewahrung kann das Gel mithilfe des „Gel Drying Film“ der Firma Promega getrocknet werden.

4.1.4 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist eine sehr sensitive Technik, mit deren Hilfe ein spezifisches Protein im picomolaren Bereich detektiert werden kann. Unter Western-Blot-Analyse versteht man den Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF). Auf dem Gel sind die Proteine noch relativ beweglich, so dass sie schnell ausgewaschen werden können. Die Membran ist hydrophob und besitzt eine gleichmäßige Porenstruktur. Die Proteine sind auf der Membran bewegungsunfähig und so leichter für Antikörper zugänglich. Der Transfer erfolgt mittels der „semi-dry electrophoretic“-Methode. Für den Sandwich-

Aufbau werden sechs 3 mm dicke Filterpapiere, eine Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel benötigt. Die Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran werden kurz mit Blot-Puffer angefeuchtet. Anschließend werden alle Bestandteile luftblasenfrei übereinandergelegt (siehe Abb. 4.1). Der Proteintransfer erfolgt für zwei Stunden bei einer Spannung von 20 V.

Nach dem Proteintransfer wird die Membran aus dem Western-Blot-Sandwich herausgenommen und zur Blockierung freier, unspezifischer Antikörperbindestellen für eine Stunde mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T auf einem Kippschüttler inkubiert. Hierauf erfolgt die erste Antikörperbindung über Nacht bei 4°C (in der vorliegenden Arbeit: α -Ecad (H-108), 1:1000; α -SNAP-tag, 1:1000; α -His-tag, 1:500; DECMA-1, 1:1000). Anschließend wird die Membran fünfmal fünf Minuten in TBS-T gewaschen. Dann wird die Membran mit dem sekundären Antikörper (AP gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen, 1:2000; Ziege-anti-Ratte, 1:2000 bzw. POD gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen, 1:20000; Ziege-anti-Ratte, 1:20000) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert und abschließend fünfmal fünf Minuten in TBS-T gewaschen.

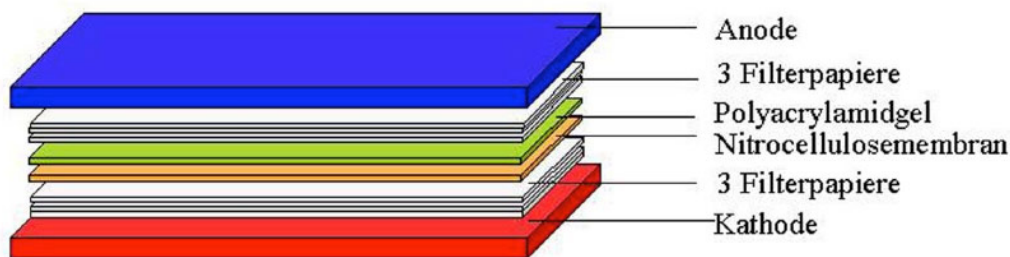


Abb. 4.1: Aufbau des Western-Blot-Sandwichs

Für die Detektion des Proteins kann wahlweise die Methode mit Alkalischer Phosphatase (AP) oder mit der Peroxidase (POD) angewendet werden.

Bei der Detektion durch die AP entsteht aus einer Mischung aus NBT/BCIP, ein Indigo-Farbstoff der an den protein-gebundenen Stellen der Membran ausfällt. Hierbei ist BCIP das AP-Substrat und ergibt als Oxidationsprodukt einen tiefblauen Indigo-Farbstoff. NBT dient als Signalverstärker, da es als Oxidationsmittel reduziert ebenfalls einen tiefblauen Indigo-Farbstoff ergibt. Die Membran wird hierfür kurz in AP-

Puffer geschwenkt, mit NBT/BCIP-Färbelösung benetzt und im Dunkeln aufbewahrt bis die Proteinbanden sichtbar sind. Die Reaktion wird durch Benetzen der Membran mit Aqua bidest. gestoppt.

Bei der Peroxidase-Methode wird das Protein mittels Chemilumineszenz detektiert. Die Peroxidase, die am sekundären Antikörper gebunden ist, katalysiert eine Reaktion die zum Chemilumineszenzfarbstoff führt. Dazu werden zwei Lösungen aus dem „ECL Plus™ WesternBlotting Detection System-Kit“ im Verhältnis 1:40 gemischt und auf der Membran gleichmäßig verteilt. Nach einer einminütigen Inkubationszeit kann die auf der Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol beruhende Chemilumineszenz mit einer CCD-Kamera der DIANA II visualisiert werden.

4.1.5 Proteingehaltsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay

Zur Quantifizierung des Proteingehalts von Lösungen wurde der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-assay) durchgeführt. Hierbei werden Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Umgebung durch Peptidbindungen zu Cu^+ -Ionen reduziert. Die Menge an gebildeten Cu^+ -Ionen ist dabei direkt proportional zur Proteinmenge. Als Nachweisreagenz dient Bicinchonin-säure. Sie bildet mit Cu^+ -Ionen stabile Komplexverbindungen mit einem Absorptions-maximum bei 562 nm. Bicinchoninsäurelösung wird mit 4% (w/v) CuSO_4 in einem Verhältnis 50:1 gemischt. Zur Konzentrationsbestimmung werden 25 μl Proteinprobe mit 1 ml des Gemisches versetzt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes auf Raumtemperatur wird die Absorption gemessen. Eine Kalibrierungsreihe mit BSA als Standard dient zur Berechnung der Proteinkonzentration der untersuchten Probe.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivieren und Passagieren humaner und muriner Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien werden bei 37°C und 7% CO₂ in DMEM Komplettmedium kultiviert. Für transfizierte Zelllinien wird entsprechend DMEM Komplettmedium mit 2 mg/ml (Endkonzentration) G418® verwendet. Konfluente Zellen werden 3x mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in geeigneter Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen mit Komplettmedium ausgesät. L-1-1-Uvo-Zellen und EcadEGFP-L-Zellen werden nicht mit Trypsin/EDTA behandelt. Um die zellmembranständigen E-Cadherin-Moleküle nicht ab-zuspalten, werden diese Zellen mit Vereinzellungslösung behandelt.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Trypsinierte Zellen werden in Komplettmedium aufgenommen und 5 Minuten bei 900 rpm und 25°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in Komplettmedium resuspendiert. Jeweils 10 µl der Suspension werden in den Kapillarspalt auf einer Seite der Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop werden alle Zellen in den vier sich darstellenden Großquadranten, mit einem Volumen von 0,1 mm³ pro Großquadrat, gezählt. Zur Auswertung wird der Mittelwert aus den Zellzahlen der Großquadranten gebildet. Der Mittelwert multipliziert mit 10⁴ ergibt die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspensionslösung.

4.2.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen werden diese zunächst 3x mit PBS gewaschen, trypsinisiert und 5 Minuten bei 25°C und 900 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Komplettmedium resuspendiert. Dann wird schrittweise 1 ml Einfriermedium hinzupipettiert (5x 200 µl alle 10 Minuten). Dabei stehen die Zellen auf Eis. Die Zellen werden in Kryoröhrchen überführt. Nach einer Lagerungszeit von 14-21 Tagen bei -80°C werden die Zellen zur Permanentlagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

4.2.4 Proteinextraktion durch nichtionisches Detergens (NOP-Lysate)

Zur Analyse von Zellproteinen mittels SDS-PAGE werden Zellen mit NOP-Puffer aufgeschlossen und die Proteine solubilisiert. Hierfür werden Zellen einer Gewebekulturflasche 3x mit PBS gewaschen, anschließend mit 1,5 ml PBS vom Boden der Flasche mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und für 5 Minuten bei 4000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird entsorgt und das Pellet in 300 µl NOP-Puffer resuspendiert. Mittels einer Kanüle (\varnothing 0,4 mm) wird die Suspension durch mehrmaliges Auf- und Abziehen homogenisiert und für eine Stunde bei 4°C auf dem Invertierer inkubiert. Das Lysat wird 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand enthält cytoplasmatische und membrangebundene Proteine. Hiervon werden für SDS-PAGE Analysen jeweils 60 µl Probe entnommen.

4.2.5 Transfektion eukaryotischer Zellen und Ernten von Zellkulturüberständen

Wie bei der Transformation von Bakterien handelt es sich bei der Transfektion um die Veränderung des Genotyps einer eukaryotischen Zelle durch die Aufnahme fremder DNA aus der Umgebung. Man unterscheidet zwischen dem zeitweiligen Einbringen der Fremd-DNA in die Zelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau ins Genom (stabile Transfektion). Im Gegensatz zu Bakterien werden bei eukaryotischen Zellen jedoch sogenannte Vehikel benötigt, um fremde DNA in die Zelle hinein zu transportieren. Als nützliche Vehikel haben sich Vesikel etabliert, die aus kationischen Lipiden oder Polymeren aufgebaut sind. In dieser Arbeit wurde ein kationisches Polymer (TranPassTM HEK293/COS-7) eingesetzt, welches zur Bildung des DNA-

Polymer-Komplexes zunächst mit dem gewünschten Plasmid (in der vorliegenden Arbeit: hEcad1-5-SNAPHis12 in pSEMS1-26m für Expression und Sekretion in den Zellkultur-überstand) 30 Minuten bei RT in Medium ohne FCS inkubiert und anschließend auf die Zellen in den Gewebekulturflaschen gegeben wird. Im Moment der Transfektion hatten die Zellen eine Konfluenz von etwa 20-40%. Nach zweitägiger Inkubation des Komplexes mit den Zellen wird der Zellkulturüberstand abgenommen und mit frischem Komplettmedium ersetzt, dem 2 mg/ml G418® (Endkonzentration) hinzugefügt wird. Bilden die Zellen keine Kolonien, so sind sie transient transfiziert. Der Zellkulturüberstand wird solange alle zwei Tage geerntet und durch frisches Medium mit G418® ersetzt, bis die Zellen absterben. Handelt es sich jedoch um eine stabile Transfektion bilden sich nach zwei Tagen Zellkolonien. Hier wird das Medium nicht geerntet. Alle zwei Tage wird das Medium erneuert bis die Kolonien konfluent sind. Danach kann auch hier der Zellkulturüberstand geerntet werden.

Für eine Transfektion wird parallel für vier mittlere Kulturflaschen (75 cm², 250 ml-Flaschen) à 20 ml Medium oder zwei große Kulturflaschen (175 cm², 550 ml-Flaschen) à 40 ml Medium das Transfektionsgemisch angesetzt.

4.2.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Mit einem spezifischen primären Antikörper werden nachzuweisende Proteine markiert und mittels eines an einem Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes visualisiert. Im Fluoreszenzmikroskop kann anschliessend die subzelluläre Lokalisation des markierten Proteins ermittelt werden.

Sterile Deckgläser werden in Gewebekulturschalen für 30 Minuten mit Alzianblau-Lösung beschichtet, dann 3x mit PBS gewaschen. Die Zellen werden auf die Deckgläser ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

Für die Färbung der Zellen werden Deckgläser bzw. Goldplättchen in eine feuchte Kammer gelegt und 3x mit PBS gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wird 10 Minuten

mit 4% PFA-Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Soll der primäre Antikörper ein intrazelluläres Protein erkennen, werden die Zellen 8 Minuten mit 0,1% iger Triton® X-100-Lösung inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Nach 3x Waschen mit PBS gibt man den primären Antikörper auf die Au-Plättchen bzw. Deckgläser und lässt ihn wahlweise 1 Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C ein-wirken. Für die vorliegende Arbeit werden folgende Verdünnungen der primären Antikörper eingesetzt: α -Ecad (H-108) 1:500, α -SNAP 1:500, DECMA-1 1:500, α - β -Catenin 1:1000. Alle Primäantikörper-Lösungen enthalten 2,5% BSA. Nach 3x Waschen mit PBS gibt man den sekundären Antikörper auf die Proben, der wie folgt verdünnt ist: GantiR cy3 1:200, GantiRat cy3 1:200, GantiR cy2 1:100, GantiRat cy2 1:100. Auch hier sind die Antikörper-Lösungen mit 2,5% BSA versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei 37°C werden die Proben 3x mit PBS gewaschen. Zur Anfärbung des Aktin-Cyto-skeletts werden die Zellen bei RT für 20-25 Minuten mit Orange Green® Phalloidin 488 in einer 1:100-Verdünnung behandelt. Für die Färbung der Zellkerne werden die Proben 3x mit PBS gewaschen, 5 Minuten mit einer 1:1000 verdünnten DAPI-Lösung bei RT inkubiert und nochmals 3x mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Proben in Mowiol auf Objektträgern eingedeckelt und zum Trocknen über Nacht bei RT im Dunkeln gelagert.

4.2.7 Zelladhäsionsassay

Konfluente Zellen werden von den Gewebekulturschalen gelöst. Bei L-1-1-Uvo-Zellen und EcadEGFP-L-Zellen wird hierfür Vereinzellungslösung, bei allen anderen Zelllinien Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Die Zellen werden anschließend in Medium aufge-nommen, welches mit 200 mg/ml STI versetzt ist. Dieses gewährleistet die Inhibierung des Trypsins und stoppt somit die Spaltung von Zelloberflächenproteinen, wie z. B. E-Cadherin. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 900 rpm und 25°C wird der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in Medium ohne FCS, mit 200 mg/ml STI resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Um Serum-Fibronektin vermittelte Zellwechselwirkungen mit

den Oberflächen zu unterbinden muss das für diesen Adhäsionsassay eingesetzte Medium FCS-frei sein.

Die mit Cadherin funktionalisierten Goldplättchen (siehe 4.4.3) werden mit Medium ohne FCS, mit 200 mg/ml STI äquibriert, um die Kalzium-abhängige Aufrichtung der Cadherin-Ektodomänen zu gewährleisten. Die Goldplättchen werden in Gewebekultur-schalen gelegt, mit einer Zellzahl von 100000-120000 pro Milliliter Medium bedeckt und zwei Stunden bei 37°C unter 7% CO₂ inkubiert. Zum Auswerten der Proben am Fluoreszenzmikroskop wird anschließend eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe 4.2.6).

4.3 Ni-NTA Affinitätschromatographie

Die Chromatographie stellt eine nahezu universell einsetzbare Methode zur Isolierung eines Analyten (z. B. ein Protein) dar. Grundsätzlich wird bei jeder Art von Chromatographie das Verhalten eines Analyten von mehreren gleichzeitig ablaufenden, aber unterschiedlich wirkenden Prozessen bestimmt. Dazu gehören zum einen spezifisch chromatographische Abläufe (Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch, Affinität, molekularer Austausch, etc.), welche durch charakteristische Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären bzw. der mobilen Phase hervorgerufen werden. Dem-gegenüber stehen Prozesse, welche gewissermaßen als Gegenspieler der Auftrennungen agieren und für ein unerwünschtes Verhalten der Analyten während der Chromatographie sorgen (unvollständige Abtrennung, verbreiterte oder doppelgipflige Maxima im Chromatogramm, etc.). Für eine optimale chromatographische Auftrennung müssen sie unterbunden oder zumindest minimiert werden.

Die verschiedenen Chromatographiearten unterscheiden sich nicht nur in der Art und Weise, wie sie eine heterogene Proteinlösung auftrennen, sondern auch in ihrer Ausbeute und ihrem Reinigungsfaktor. Häufig muss man verschiedene Verfahren kombinieren, um das gewünschte Protein in der für weitere Experimente benötigte Reinform zu erhalten.

In der Flüssigkeitschromatographie spielt die Affinitätschromatographie eine herausragende Rolle, da sie durch die spezifische Adhäsion des Proteins an die stationäre Phase (Matrix) sowohl eine große Ausbeute als auch einen hohen Reinigungsfaktor ermöglicht – weitgehend unabhängig von den physikalischen Eigenschaften der mobilen Phase. Dazu wird ein spezifischer Ligand des gesuchten Proteins, der eine reaktive Gruppe besitzt, über einen Abstandhalter (Spacer) an eine Matrix (Dextran, Agarose, Polyacrylamid, Polystyrol, etc.) gekoppelt. Solange dieser Prozess die Bindungseigenschaften des Liganden nicht verändert, bindet die derivatisierte Matrix selektiv das gesuchte Protein. Nach der Bindung werden unspezifisch gebundene Moleküle herausgewaschen und anschließend das gesuchte Protein mit dem gleichen oder einem anderen Liganden des Proteins durch kompetitive Verdrängung spezifisch eluiert.

Bei der Metallchelate-Affinitätschromatographie (MAC) verwendet man einen Liganden ohne biospezifische Grundlage. Metallionen wie Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} und Fe^{3+} werden über Imidodiessigsäure, Nitrilotriessigsäure (NTA) oder Tris(hydroxymethyl)aminomethan an Agarose immobilisiert und binden Analyten unter Bildung eines Metallchelate-Komplexes (siehe Abb. 4.2). Dabei reagieren vorzugsweise Imidazol-, Thiol-, oder Inol-Gruppen der basischen Aminosäuren Histidin, Cystein oder Tryptophan mit den Metallionen. Die Elution erfolgt ebenfalls über kompetitive Verdrängung. Obwohl bei dieser Methode die Selektivität geringer ist als bei anderen Verfahren der Affinitätschromatographie, findet sie in der Biologie in Gestalt des Histidin-Tags (His-Tag) umfangreiche Anwendung.

Zur Reinigung His-getaggtter Proteine wird in der vorliegenden Arbeit Ni-NTA Agarose als stationäre Phase eingesetzt. Diese besteht aus Ni-NTA-Komplexen, die über Alkylketten an Agarose-Kügelchen gebunden sind. Diese können mit den Histidin-Seitengruppen des zu reinigenden His-getaggtten Proteins in Wechselwirkung treten. Daraus resultiert der NTA-Ni-His-tag-Protein-Komplex, wodurch das Protein an der stationären Phase haften bleibt. Nach Bindung des Proteins wird zum Waschen unspezifisch gebundener Moleküle mit Startpuffer gespült und anschließend mit

Elutionspuffer ein Imidazol-Gradient über die stationäre Phase laufen gelassen. Hierbei wird das His-getaggte Protein durch kompetitive Verdrängung durch das Imidazol von der stationären Phase verdrängt und eluiert.

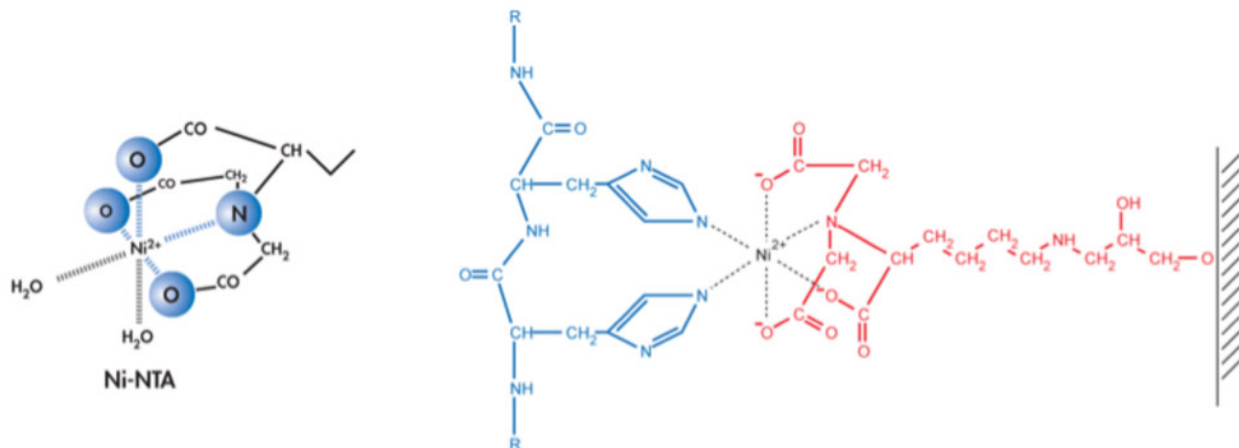


Abb. 4.2: Wechselwirkung zwischen Ni^{2+} -Ion und NTA führt zur Bildung des Ni-NTA-Komplexes (links). Wechselwirkung zwischen benachbarten Seitengruppen eines His-tags mit Ni-NTA-Komplex (rechts). (Entnommen aus: *The QIAexpressionist™. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. Fünfte Ausgabe, Juni 2003, Qiagen.)

4.3.1 Vorbereitung der Proben für Ni-NTA Affinitätschromatographie

Der nach der Zentrifugation des Bakterienlysats erhaltene Proteinrohextrakt wird über einen Membranfilter mit Porendurchmesser von 0,2 mm filtriert. Der Rohextrakt kann nun zur Reinigung an die FPLC-Anlage angeschlossen werden.

Geerntete Überstände transfizierter Zellen werden 15 Minuten bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert und über Membranen mit einem Porendurchmesser von 0,2 mm filtriert. Die Überstände können bis zur Weiterbehandlung mit Proteaseinhibitor versetzt bei 4°C gelagert werden. Zum Einengen werden Vivaspin15-Zentrifugalfilter mit einem MWCO-Wert von 30 000 Da eingesetzt. Nach Dialysieren mit HBS-Puffer entnimmt man die Proteinkonzentrate aus den Reservoirs der Filter vorsichtig mit einer Pipette. Konzentrate aus sechs bis zehn Filtereinheiten werden gepoolt, über eine Membran mit Porendurchmesser 0,2 mm filtriert und zur Reinigung an die FPLC-Anlage angeschlossen.

4.3.2 Reinigen und Bepacken einer Chromatographiesäule

Für jedes Zielprotein (His-SNAP-GFP, hEcad1-5-SNAP-His12) wird eine Chromatographiesäule mit frischem Säulenmaterial (Ni-NTA Beads) bepackt. Eine Säule wird ausschließlich für die Reinigung eines spezifischen Zielproteins verwendet, womit eine Kontamination der gereinigten Proteinfractionen mit anderen His-SNAP-getaggten Proteinen verhindert wird, die eventuell noch am Säulenmaterial gebunden ist.

Vor der Inbetriebnahme der Säule wird diese gereinigt. Hierfür wird sie zerlegt. Der Säulen-Glaskörper und Konterschraube und -mutter werden über Nacht in einer 1 M NaOH-Lösung eingeweicht. Stempel mit Dichtungsring und Fritte dürfen nicht mit der NaOH-Lösung behandelt werden. Nach gründlichem Spülen mit Aqua bidest. wird die Säule wieder zusammengebaut, wobei nur ein Stempel mit der Konterschraube eingesetzt wird. Mit der noch nicht geschlossenen Seite nach oben wird der Säulen-Glaskörper an einem Stativ befestigt und mit Ni-NTA-Beads gefüllt. Diese liegen als 20%ige Ethanol-Suspension vor. 2-3 ml dieser Suspension werden in die Säule gegeben und mit dem dreifachen Säulenvolumen an filtriertem HBS gespült. Dabei dürfen die Ni-NTA-Beads nicht trocken laufen. Anschließend wird der zweite Stempel aufgesetzt und luftblasenfrei in den Glaskörper hineingedreht. Die bepackte Säule wird an die FPLC-Anlage angeschlossen, während diese mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml pro Minute läuft.

4.3.3 Reinigungsprogramm der FPLC-Anlage

Zum Reinigen der in dieser Arbeit eingesetzten Proteine wird ein linearer Gradient verwendet, der bei 30 ml Puffervolumen und einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml pro Minute mit 10 mM Imidazol startet und mit 500 mM Imidazol endet. In Tabelle 1 ist das Reinigungsprogramm aufgeführt.

	Volumen	Beschreibung			
1	0,0	Sammeln 1,00 ml-Fractionen während des gesamten Laufs			
2	0,0	Ventil umstellen	Proben Injektion	Position: Probe laden	
3	0,0	Ventil umstellen	Pre-Säule	Position: Position 3 NTA/Ni Säule	
4	0,0	Ventil umstellen	Post-Säule	Position: Position 3 NTA/Ni Säule	
5	0,0	Beladung der Säule mit Probe	Laden: A2-Rohextrakt Direkte Injektion	Gradienten Pumpe A	Volumen: 15,5 ml Fluss: 0,5 ml/min
6	15,5	Isokratischer Fluss	A1-HBS/10 mM Imidazol B-HBS/500 mM Imidazol	100% 0%	Volumen: 15 ml Fluss: 0,5 ml/min
7	30,5	Linearer Gradient	A1-HBS/10 mM Imidazol B-HBS/500 mM Imidazol	100% → 0% 0% → 100%	Volumen: 30,0 ml Fluss: 0,5 ml/min
8	60,5	Isokratischer Fluss	A1-HBS/10 mM Imidazol B-HBS/500 mM Imidazol	0% 100%	Volumen: 15 ml Fluss: 0,5 ml/min
9	75,5	Isokratischer Fluss	A1-HBS/10 mM Imidazol B-HBS/500 mM Imidazol	100% 0%	Volumen: 15 ml Fluss: 0,5 ml/min
10	90,5	UV Lampe	Aus		
	90,5	Ende des Protokolls			

Tabelle 1: Programm für die Reinigung der His-getaggten Proteine aus Bakterienlysaten und Zellkultur-überständen.

Die Flussgeschwindigkeit beträgt 0,5 ml pro Minute. Zunächst wird das Rohextrakt über Schlauch A2 aufgesogen und auf das Säulenmaterial geladen. Unspezifisch gebundenes Material wird durch Spülung mit 15 ml Startpuffer (HBS/10 mM Imidazol) vom Säulenmaterial entfernt. Durch Starten des linearen Gradienten wird das über die

NTA-Ni-His-Komplex spezifisch gebundene Protein vom Säulenmaterial eluiert. Hierbei nimmt der Anteil an Elutionspuffer (HBS/500 mM Imidazol) bei einem Volumen von 30 ml zu bis es 100% erreicht. Die Elutionsfraktionen werden in auf dem Fraktionssammler stehenden Eppis aufgefangen. Ein an der Anlage angeschlossenes UV-Messgerät ermittelt die Absorbtionen aller Elutionsfraktionen. Während des gesamten Laufs werden diese Werte im sogenannten Chromatogramm aufgezeichnet. Nach Ende des Gradienten wird das Säulenmaterial mit Elutionspuffer gespült und anschließend in Startpuffer umgepuffert. Elutionsfraktionen bei denen die UV-Absorption erhöht ist, führen zu einem Peak im Chromatogramm. Diese Fraktionen enthalten das Zielprotein. Zur Analyse dieser Proben mittels SDS-PAGE und Western-Blot werden jeweils 60 µl entnommen, mit Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht.

4.4 Funktionalisierung und Analytik von Oberflächen

4.4.1 Herstellung Gold beschichteter Plättchen

Deckgläser (Ø 12 mm) werden für 20 Minuten in einer Mischung aus Ammoniak, Wasserstoffperoxid und Aqua dest. in einem Verhältnis von 1:1:5 (NH₃ aq: H₂O₂: H₂O) aufgeköcht, 5x mit Aqua dest. gründlich gespült und für weitere 20 Minuten in frischer NH₃ aq: H₂O₂: H₂O-Mischung geköcht. Abschließend wird 10x mit Aqua dest. gespült und alle Deckgläser unter Stickstoff getrocknet. Der mit den Deckgläsern bestückte Probenhalter wird in die Sputteranlage gelegt. In einem drei magnetron Sputtersystem werden bei einem Druck von 2×10^{-3} mbar Ar (6,0) und 100 W DC Sputterenergie zunächst 20 nm Chromschicht als Haftvermittler, dann 100 nm Goldschicht auf die Deckgläser aufgetragen.

4.4.2 Herstellung homogener Thiol-SAMs für XPS-, QCM-D- und ToF-SIMS-Messungen

100 μM Thiol in Isopropanol (Endkonzentration) werden in Wägeschalen vorgelegt. Frisch hergestellte Gold-Plättchen (siehe 4.4.1) werden kurz mit Isopropanol gespült und in die Thiollösung enthaltenden Wägeschalen mit der Gold-beschichteten Seite nach oben gelegt, der Deckel der Wägeschale fest verschlossen und über zwei Tage bei RT inkubiert. Für QCM-D-Messungen werden QCM-Sensorkristalle auf die oben beschriebene Art behandelt.

4.4.3 Herstellung gemusterter Thiol-SAMs mittels Micro-Contact Printing (μCP)

Das Stempeln von Thiolen auf Goldoberflächen wird nach Lehnert et al. (2004) vorgenommen. Hierfür wird eine 100 μM Thiol-Mischung in Isopropanol auf einem PDMS-Stempel 5 Minuten inkubiert. Die Thiollösung besteht aus BG-Thiol und Me-EG₃-Thiol (1:100) oder aus 3 mol% NTA-Thiol in Me-EG₃-thiol. Nach der Inkubation wird überschüssige Thiollösung mit Stickstoff trocken gepustet, der Stempel auf ein Gold-Plättchen leicht angedrückt und für 2 Minuten inkubiert. Das Gold-Plättchen wird vorsichtig vom Stempel getrennt, zum Auffüllen freier Goldflächen mit 100 μl einer 100 μM Me-EG₃-Thiol-Lösung beschichtet und 30-45 Minuten bei RT inkubiert. Nach Spülen des Plättchens mit Isopropanol wird es unter Stickstoff-Strom getrocknet und ist bereit für die Inkubation mit SNAP- bzw. His-getaggten Proteinen. Bestempelte Oberflächen werden zusätzlich mittels ToF-SIMS (siehe 4.4.7) untersucht.

Für die Kopplung der getaggten Proteine auf den jeweiligen bestempelten Oberflächen werden diese zunächst 3x mit HBS gewaschen, dann mit 3-5 μM Proteinlösung (in HBS) für 2 Stunden bei RT auf einem Kippschüttler inkubiert. Hierfür eingesetzte Protein-lösungen werden kurz vor Einsatz mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie aus Bakterienkulturen oder aus Überständen eukaryotischer Zellen gereinigt. Die Protein-gekoppelten SAMs sind nun bereit für AFM-Messungen (siehe 4.4.5) und für Zelladhäsionsassays (siehe 4.2.7).

4.4.4 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)

Die Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie erlaubt als oberflächenanalytische Methode den Nachweis aller chemischen Elemente (außer Wasserstoff) ab einer Konzentration von ungefähr 1%, zugleich aber auch Aussagen über die chemische Umgebung, Bindung und Oxidationsstufe der untersuchten Elemente. Die Probe wird mit einem monochromatischem Röntgenstrahl ausreichender Energie bestrahlt. Dabei tritt Photoionisation ein, bei der Elektronen aus inneren Orbitalen herausgeschleudert werden. Diese Elektronen besitzen eine bestimmte kinetische Energie (E_{kin}), die der Differenz zwischen der Energie der auslösenden Strahlung ($h\nu$) und der Bindungsenergie (E_B) nach Gl. 1 entspricht.

$$E_{kin} = h\nu - E_B \quad (1).$$

Die Bindungsenergien der Elektronen sind elementcharakteristisch. Daher lässt sich der Elementnachweis immer eindeutig führen.

XPS-Messungen homogener Thiol-SAMs am K-Alpha wurden am Institut für Materialforschung III (IMF III) im Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt. Zur Anregung wurde mikrofokussierte, monochromatisierte $AlK\alpha$ -Röntgenstrahlung (30-400 μm Anregungsfleckdurchmesser) benutzt. Alle Spektren wurden auf die $Au\ 4f_{7/2} = 84,0\ \text{eV}$ Photoelektronenlinie referenziert. Die Energieskala wurde über die bekannten Photoelektronenlinien von metallischem Gold, Silber und Kupfer kalibriert. Die Energieauflösung bei einer Durchlassenergie von 20 eV ist 1.0 eV Halbwertsbreite der $Ag\ 3d_{5/2}$ Line. Die experimentelle Unsicherheit beträgt $\pm 0.2\ \text{eV}$.

Um Schädigungen der SAMs während der Messung zu vermeiden wurden hochaufgelöste Elementfelder jeweils an 36 unbelasteten Probenpositionen mit kurzer Strahlungsexposition gemessen und die Daten anschließend für ein ausreichendes Signal/Rauschverhältnis zu jeweils einem Spektrum zusammengefasst.

Für die Schichtdickenbestimmung an SAMs sowie für zerstörungsfreie Tiefenprofile im Bereich der XPS- Informationstiefe wurden parallel winkelaufgelöste XPS-Spektren mit der Theta Probe von Dr. R. White im ThermoFisher Scientific Applikationslabor in analoger Vorgehensweise aufgenommen. Die Schichtdickenbestimmung basiert auf einer modifizierten Lambert-Beer-Gleichung (Parry et al. 2006), für die Rekonstruktion der Tiefenprofile nutzt Avantage die Maximum-Entropie-Methode (Smith and Livesey, 1992).

XPS-Messungen wurden nur an homogenen, nicht bestempelten SAMs (siehe 4.4.2), durchgeführt.

4.4.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Zum Nachweis der gestempelten Thiol-SAMs und der Kopplung des His-SNAP-GFPs auf den BG-Thiol bestempelten Flächen wird die Rasterkraftmikroskopie angewendet. Alle AFM-Messungen wurden im Zentrum für funktionelle Nanostrukturen (CFN) ausgeführt.

Mit dieser Methode wird die Oberfläche einer Probe mit einer Blattfeder, dem sogenannten Cantilever, mechanisch abgetastet. Dabei verändert sich die Position der Blattfeder. Diese Positionsänderungen werden mit optischen Sensoren gemessen, punktweise aufgezeichnet und ergeben ein Abbild der Oberflächenstruktur. Mit Hilfe eines Programms können anschließend Höhenunterschiede der Probenoberflächenstrukturen ermittelt (Bestimmung der SAM-Schichtdicke) und die Dichte von der auf der Oberfläche gebundenen Substanzen bestimmt werden (Bestimmung der Dichte von His-SNAP-GFP auf SAMs mit unterschiedlichen BG-Thiol Anteilen).

AFM Höhenbilder (height image) und Regelsignalbilder (deflection image) werden im Kontakt-Modus in Luft mit einer Linienrasterrate von 1-2 Hz aufgenommen.

4.4.6 Quartz Crystal Microbalance Dissipation (QCM-D)

Die Quantifizierung der Proteinadsorption auf Thiol-SAMs erfolgt mittels QCM-D mit Messung der Resonanzfrequenz. Alle Messungen wurden am Institut für biologische Grenzflächen (IBG) im Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt.

In dieser Methode wird eine dünne, kristalline Quarzscheibe mit zwei Elektroden (Sensorkristall) verwendet. Bei resonanter Anregung mit einer Wechselspannung oszilliert diese Scheibe mit einer Frequenz, die von der gesamten oszillierende Masse abhängt. Bei Aufbringen eines dünnen Films, erhöht sich die Masse des Sensors und somit auch die oszillierende Masse, was zur Abnahme der Resonanzfrequenz führt. Diese Abhängigkeit wird durch die Sauerbrey-Gleichung (Gl. 2) beschrieben.

$$\Delta m = - (C \cdot \Delta f) / n \quad (2).$$

Mit $C = 17,7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ für einen 5 MHz Quarzkristall

$n = 1, 3, 5, \dots, 13$ ist die Obertonzahl

Δf = Änderung der Resonanzfrequenz

Δm = Massenänderung.

SAMs werden wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben auf QCM-D Sensorkristallen hergestellt. Der Kristall wird in die Flusszelle eingebaut. Unter Verwendung von HBS werden die Basislinien für die Frequenz (f) und die Frequenzabnahme (D) für 5, 15, 25 und 35 MHz aufgenommen. Anschließend wird eine $0,5 \mu\text{M}$ His-SNAP-GFP-Lösung in die Flusszelle gespült. Nach zwei Stunden stabilisiert sich die Oszillationsfrequenz und die Flusszelle kann nochmals mit HBS gespült werden, um Δf und ΔD zu erhalten.

4.4.7 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS)

Bei der Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie wird die zu analysierende Probe mit ultra-kurzen Primärionenpulsen beschossen, was zur Bildung von atomaren und molekularen Sekundärionen führt, die aus der obersten Schicht der Probe herausgeschleudert werden. Die Sekundärionen haben je nach ihrer Masse unterschiedliche Flugzeiten zum Detektor, die gemessen werden. Aus den gemessenen Flugzeiten können die zugehörigen Massen der Sekundärionen bestimmt werden. Mit dieser Spektrometriemethode kann man Oberflächenspektroskopie (Nachweis von Oberflächenmolekülen), Oberflächenabbildung (Abbildung lateraler Strukturen im μm -Bereich) und Tiefenprofilanalyse (Information über Elementtiefenverteilung in lateral lokalisierten Probenbereichen) durchführen.

Alle ToF-SIMS-Messungen wurden in Münster bei der ION-TOF GmbH durchgeführt. Oberflächenspektrometrie und Oberflächenabbildungen werden an gestempelten sowie an homogenen, nicht gestempelten SAMs durchgeführt. Bei den gestempelten Proben werden zwei Ansätze hergestellt. In Ansatz 1 wird eine Mischung aus 100 μM BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol im Verhältnis von 1:100 auf die Oberfläche gestempelt, anschließend mit 100 μM Me-EG₃-Thiol aufgefüllt. In Ansatz 2 wird mit 100 μM Me-EG₃-Thiol gestempelt und mit der Mischung aus BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol (1:100) aufgefüllt. Homogene, nicht bestempelte SAMs werden aus BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol-Mischungen der Zusammensetzung 1:100 und 1:3 hergestellt.

Analysebedingungen für die Oberflächenspektrometrie:

- Ion/Energie: Bi_1^+ , 25 keV
- Analysemodus: bunched, hohe Massenauflösung
- Analysstrom: 0,4 pA
- Analysefläche: $100 \times 100 \mu\text{m}^2$

- Messzeit: 80-100 s
- Polarität: positiv/negativ

Analysebedingungen für die Oberflächenabbildung:

- Ion/Energie: Bi_1^+ , 25 keV
- Analysemodus: burst alignment, hohe Lateralauflösung
- Analysstrom: 0,2 pA (Bi_1^+)
- Analysefläche: $242 \times 242 \mu\text{m}^2$
- Polarität: negativ *

*:Es wurde eine Abbildung in der negativen Sekundärionenpolarität erstellt, da in dieser Polarität von beiden aufgetragenen Substanzen Fragmente bzw. Anlagerungen an Au nachweisbar sind.

4.4.8 Ellipsometrie

Bei der Ellipsometrie wird die Änderung der Polarisation von Licht bei der Reflexion an der Oberfläche einer Probe gemessen. Linear polarisiertes Licht trifft auf die Probe und wird am Probenmaterial als elliptisch polarisiertes Licht reflektiert. Die Polarisations-änderung hängt vom Probenmaterial ab, so dass bei diesem optischen Messverfahren zerstörungsfrei optische Konstanten (Brechungsindex, Absorptionskoeffizient) und Schichtdicken von Dünnschichtsystemen ermittelt werden können. Der Bereich untersuchbarer Schichten reicht von $> 1 \text{ nm}$ bis ca. $100 \mu\text{m}$. Die Methode erlaubt eine Dickenauflösung von $0,1 \text{ nm}$. Diese Genauigkeit ist abhängig von den zur Verfügung stehenden Wellenlängen.

Alle ellipsometrischen Messungen wurden am Institut für Materialforschung III (IMF III) im Karlsruher Institut für Technologie an einem Einwellenlängen Ellipsometer der Wellenlänge $632,8 \text{ nm}$ unter Verwendung eines Zwei-Schichten-Modells (SAM/Au) durchgeführt.

4.4.9 Dip-Pen-Nanolithographie (DPN) von Phospholipiden auf Glas

Die DPN ist eine Methode zur Herstellung von Nanostrukturen auf Oberflächen und wurde 1999 erstmals beschrieben (Piner et al., 1999). Es handelt sich hierbei um eine lithographische Direktschreibtechnik, bei der eine AFM-Spitze chemische Reagenzien direkt an nanoskopische Bereiche auf einem Zielsubstrat abgibt. In ersten Studien wurde DPN genutzt, um Muster aus selbstorganisierten Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs) aus Alkanthiolen auf Goldoberflächen mit hoher Auflösung aufzubringen (Piner et al., 1999; Hong et al., 1999). 2007 zeigten Lenhert und Kollegen, dass mit DPN auch Phospholipide auf Glasoberflächen aufzubringen sind (Lenhert et al., 2007).

Die DPN von Phospholipiden auf Glas zur Kopplung von SNAP-getaggtten Proteinen wurde in Kooperation mit dem Institut für Nanotechnologie (INT) am Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt. Details der experimentellen Durchführung können Sekula et al., 2008 entnommen werden und sind im folgenden kurz beschrieben. Die Inkwells des DPN-Gerätes werden mit 1 μ l, 10 mM Phospholipid-Lösung in Chloroform befüllt. Alle Phospholipidmischungen enthalten 1 mol% Rhodamin markiertes Lipid. Um das Chloroform verdampfen zu lassen, werden die Lösungen für eine Stunde stehen gelassen. Dann werden die AFM-Spitzen in die mit Phospholipid befüllten Inkwells für 30 Minuten eingetaucht. Zur Herstellung der Lipidmultilayer werden die Phospholipid benetzten AFM-Spitzen mit Plasma behandelten Deckgläsern in Kontakt gebracht. Die Plasmabehandlung mit Sauerstoff (20 sccm, 100 mTorr, 30 s) macht die Glasoberflächen hydrophil und ermöglicht eine bessere Abscheidung der Lipide von der AFM-Spitze auf das Substrat. Die Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide können Abschnitt 3, Thiole und Lipide entnommen werden.

4.4.10 Kopplung von SNAP-getaggten Proteinen auf DPN-Lipid-Strukturen

Mit einer Silikonbarriere werden die mit den Lipiden funktionalisierten Flächen des Deckglases voneinander abgetrennt. Um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren werden die DPN-Lipid-Strukturen zunächst mit 1% BSA in PBS für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Oberfläche 3x mit HBS gewaschen und mit 2 μ M des SNAP-getaggten Proteins (His-SNAP-GFP oder hEcad1-5-SNAP-His12) beschichtet. Nach zweistündiger Inkubationszeit bei RT wird die Oberfläche abschließend 3x mit HBS gewaschen, bevor sie in Microsphere- oder Zellassays (siehe 4.4.11 und 4.2.7) eingesetzt wird.

4.4.11 Beschichtung von Microspheres mit hEcad-Fc

100 μ l Sulfat Latex Microspheres werden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und in 200 μ M 0,1 M Borat-Puffer suspendiert. Die Microspheres werden abzentrifugiert und über Nacht mit 100 μ g G α H IgG-Fc bei RT auf einem Invertierer inkubiert. Die Microspheres werden abzentrifugiert, 3x mit PBS gewaschen und mit 1 ml 1% BSA in 1x PBS versetzt. Nach 1-2 stündiger Inkubation bei RT werden 100 μ l dieser Suspension entnommen und 1-2 Stunden bei RT mit 5 μ g hEcad-Fc auf einem Invertierer inkubiert. Nach 2x Waschen mit PBS/1%BSA werden die Microspheres in 100 μ l PBS/1%BSA resuspendiert und sind bereit für SDS-PAGE-Analyse, Immunfluoreszenzfärbung und Assays auf DPN-Oberflächen.

4.4.12 Microspheres auf DPN-Oberflächen

Nach der Kopplung des SNAP-getaggten Proteins auf den DPN-Lipid Oberflächen (siehe 4.4.10) werden diese 3x mit HBS und 3x mit DMEM ohne FCS gewaschen. 200 μ l DMEM ohne FCS wird auf die Oberflächen pipettiert und mit 5-10 μ l hEcad-Fc

beschichteten Microspheres versetzt. Anschließend wird unter leichtem, horizontalem Rotieren bei 37°C für 1-2 Stunden inkubiert und am Mikroskop ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Proteineexpression und Proteinreinigung

Um die Umsetzbarkeit der SNAP-tag-Kopplung an BG-funktionalisierten Oberflächen nachzuweisen, wurde zunächst ein Testprotein benötigt, dessen Identifizierung nach der Kopplung auf Oberflächen ohne Aufwand durchgeführt werden konnte. Hierfür fiel die Wahl auf ein SNAP-getaggetes GFP, welches zusätzlich mit einem His-tag versehen ist. Dieses Protein hat den Vorteil, dass es durch Affinitätschromatographie über den His-tag leicht gereinigt werden kann. Zudem ermöglicht die Eigenfluoreszenz den direkten Nachweis des Proteins nach Kopplung an Oberflächen im Fluoreszenzmikroskop. Das His-SNAP-GFP ist in dem Vektor pBAD-SNAP26B-GFP (Vektorkarte im Anhang), der eine Expression in *E.coli* BL21AITM erlaubt.

Zur Funktionalisierung der Oberflächen mit E-Cadherin mittels der SNAP-tag-Kopplung wurde humanes Ecad1-5-SNAP-His12 in eukaryotischen Zellen exprimiert. Die Synthese von E-Cadherin unterliegt einer aufwendigen Prozessierung, die nur in eukaryotischen Zellen erfolgt. Hierzu gehört die Glykosilierung der extrazellulären Domäne (EC), die eine wichtige Rolle bei der biologischen Funktion von Cadherinen spielt (Liwosz et al., 2006; Zhao et al., 2008; Osumi et al., 2009; Guo et al., 2009). Ferner wird zunächst ein unreifes E-Cadherin mit einem Propeptid hergestellt, das erst an der Zellmembran durch eine bisher nicht charakterisierte Furin-ähnliche Protease abgespalten wird (Ozawa & Kemler, 1990). Hinzu kommt, dass in Bakterien Cadherine in „inclusion bodies“ eingeschlossen werden, aus denen sie nur unter starken denaturierenden Bedingungen isoliert werden können. Damit ist eine starke Verunreinigung mit bakteriellen Proteinen verbunden. Die Aufreinigung der Cadherin-Ektodomäne aus Zellkulturüberständen wurde daher als die vielversprechendere Methode ausgewählt. Der schematische Aufbau der E-Cadherin Ektodomäne mit Signal- und Propeptid und den Glykosilierungsstellen kann dem Anhang entnommen werden.

5.1.1 Expression von His-SNAP-GFP in *E.coli* BL21-AITM

Der Vektor pBAD-SNAP26B-GFP besitzt ein Ara-Promotor System und muss in dem Bakterienstamm BL21-AITM translatiert werden. Die Translation kann mit L-Arabinose induziert werden. In IPTG induzierbaren Bakterienstämmen wie BL21 (DE3) funktioniert die Expression nicht.

Die Induktion von His-SNAP-GFP in diesem Bakterienstamm konnte auf einem Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel und im Western-Blot mit einem Antikörper gegen GFP nachgewiesen werden (Abb. 5.1). Die Expression des Fusionsproteins wurde mit 0,2% L-Arabinose (Endkonzentration) vier Stunden lang bei 30°C induziert. Nach zwei Stunden Expression erschien im Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel (Abb. 5.1 a) in der Höhe von 50 kDa eine Bande (markiert mit einem Sternchen). Im Western-Blot mit α -GFP (Abb 5.1 b) war diese Bande bereits beim Zeitpunkt der Proteininduktion (0h) sichtbar. Ab 2h Induktion war diese Bande mit deutlich stärkerer Intensität zu detektieren. Nach drei und vier Stunden Induktion waren die Bandenintensitäten in der Höhe von 50 kDa sowohl in der Coomassie-Färbung als auch im Western-Blot mit α -GFP unverändert.

Die Expression des als Testproteins einzusetzenden His-SNAP-GFPs konnte in dem *E.coli* Bakterienstamm BL21-AITM induziert werden.

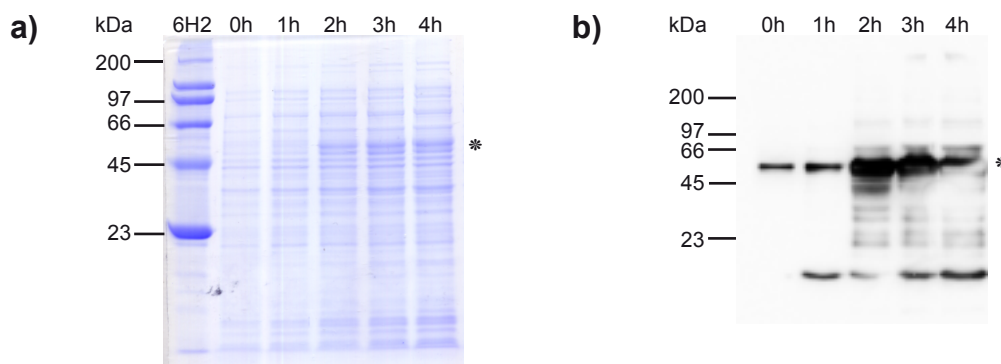


Abb. 5.1: His-SNAP-GFP wird in BL21-AITM-Zellen nach Induktion mit L-Arabinose exprimiert. (a) Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel und (b) Western-Blot-Analyse mit α -GFP nach elektrophoretischer Auftrennung von Proben, die nach der Induktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus der Bakterienkultur entnommen wurden. Ein Sternchen markiert die Höhe der His-SNAP-GFP spezifischen Bande. Größenstandard: SDS-6H2. Detektion der Proteine im Western-Blot erfolgte mittels der Peroxidase-Methode.

5.1.2 Reinigung von His-SNAP-GFP aus dem Bakterienzellysat

Nach der Induktion des His-SNAP-GFPs in BL21-AITM-Zellen wurde die Zellsuspension mittels Ultra-Schallbehandlung aufgeschlossen. Der nach Abzentrifugation erhaltene Überstand ist der sogenannte Rohextrakt. Dieser enthält die Mischung der gesamten Proteine, die in den Bakterienzellen vorhanden war, unter anderem auch das rekombinant exprimierte His-SNAP-GFP. Um dieses vom Zellysat zu trennen wurde die Affinitätschromatographie angewendet (siehe Kapitel 4.3). Mittels der Wechselwirkung zwischen dem am Säulenmaterial gebundenem Ni²⁺-NTA-Komplexen und dem His-tag des Zielproteins wird dieses aus dem Zellysat abgefangen und anschließend durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol eluiert.

Abb. 5.2 zeigt das Chromatogramm einer Reinigung und die Analyse verschiedener Fraktionen mittels SDS-PAGE. Nach Lyse der mit L-Arabinose induzierten Bakterien wurde der Rohextrakt (RE) auf eine Ni²⁺-NTA-Säule aufgeladen und das gebundene His-SNAP-GFP mit einem Imidazolgradienten eluiert. Der im Chromatogramm dieser Aufreinigung erscheinende Peak in der UV-Adsorption (Fraktionen 56-64) korreliert mit der im Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel sichtbaren Banden um 50 kDa, die dem His-SNAP-GFP entspricht. In den Fraktionen 11 und 32, die dem Waschen der beladenen Säule entspricht, konnten die Banden zusätzlicher Proteine detektiert werden. Die Intensität der 50 kDa-Bande war in diesen beiden Fraktionen deutlich schwächer als im RE. Dies liess darauf zurück schließen, dass neben den ungetaggtten bakteriellen Kontaminationen auch das Zielprotein beim Waschvorgang vom Säulenmaterial teilweise gelöst wird (siehe schwache Bande in Höhe von 50 kDa, Abb 5.2).

Mit ansteigendem Imidazol-Gradienten wurde schließlich das His-SNAP-GFP von der Säule eluiert und konnte in den Fraktionen 56 bis 64 (markiert mit einem Sternchen) im Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt werden. Diese Fraktionen enthielten nur noch geringfügige Mengen an zusätzlichen Proteinen. Die Konzentrationen der Proteine der einzelnen EF und des RE wurden mittels BCA-Assay bestimmt.

Das bakteriell exprimierte His-SNAP-GFP konnte erfolgreich aus dem Bakterien-Lysat mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie getrennt werden.

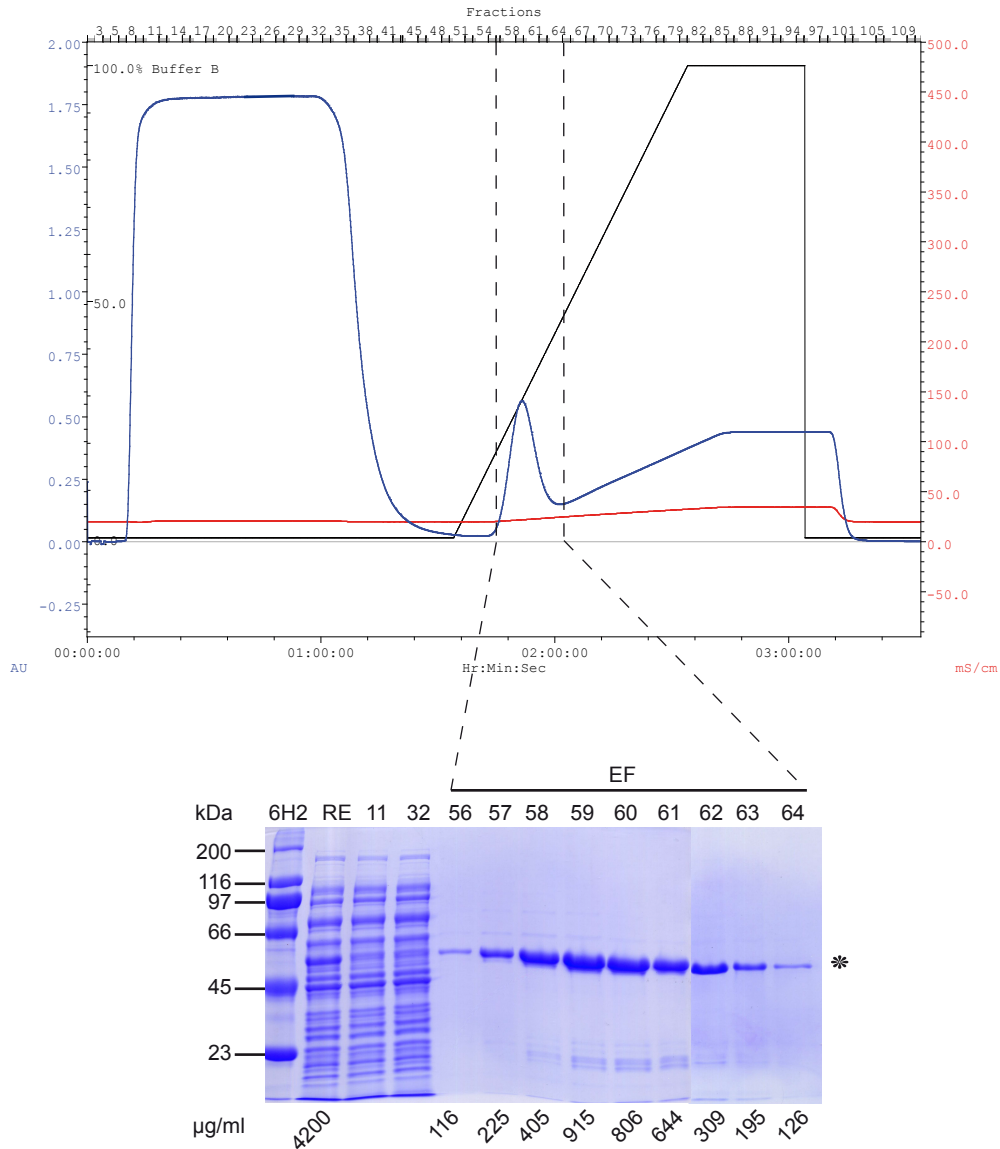


Abbildung 5.2: Chromatogramm und SDS-PAGE Analyse nach Aufreinigung von His-getagtem SNAP-GFP aus Bakterienzellysate mittels Affinitätschromatographie. Der im Chromatogramm erscheinende Peak in der UV-Absorption (Elutionsfraktionen (EF) 56 bis 64) korreliert mit der im Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel sichtbaren Bande um 50 kDa, die dem His-SNAP-GFP entspricht (markiert mit einem Sternchen). Die Konzentrationen der Proteine im RE und EF wurden mittels BCA-Assay bestimmt. Größenstandard: SDS-6H2.

5.1.3 Vergleich der Expression von hsEcad1-2-SNAP und hsEcad1-5-SNAP in HEK293 und COS-7

Verschiedene Zelllinien wurden auf ihre Effizienz, die beiden E-Cadherin-Konstrukte hsEcad1-2-SNAP und hsEcad1-5-SNAP zu exprimieren verglichen. Wie aus Abb. 5.3 hervorgeht, sind die gewünschten E-Cadherin-Fragmente im Überstand von HEK293- aber nicht von COS-7-Zellen nachzuweisen.

Beide Zelllinien wurden jeweils in 25 cm² Kulturflaschen in 5 ml Medium mit den jeweiligen E-Cadherin-Konstrukten (Vektorkarten siehe Anhang) transfiziert. Für die Western-Blot-Analyse wurden zwei Tage nach der Transfektion dem Überstand Proben entnommen. Im Überstand aus HEK293-Zellen konnte mit dem α -SNAP-tag eine Bande in der Höhe von 50 kDa detektiert werden (Abb 5.3 a). Dies entspricht der Größe des hsEcad1-2-SNAP. Diese Bande konnte jedoch nicht mit dem α -Ecad (Sec21), welches die EC1 spezifisch erkennen sollte, detektiert werden (Abb 5.3 a). Im Überstand von COS-7-Zellen konnte mit beiden Antikörpern, α -SNAP-tag und α -Ecad (Sec21), keine Bande in der Höhe von 50 kDa (hsEcad1-2-SNAP) nachgewiesen werden (Abb 5.3 b). Im Überstand von mit hsEcad1-5-SNAP transfizierten HEK293-Zellen konnte mit dem α -SNAP-tag eine Bande in der Höhe von ca. 120 kDa nachgewiesen werden (Abb 5.3 d). Dies entspricht der Größe des hsEcad1-5-SNAP. Die Proteine konnten im Coomassie gefärbten Polyacrylamidgelen nicht sichtbar gemacht werden (Abb 5.3 c und e). In Überständen von untransfizierten Kontrollzellen (K) konnten die Proteine hsEcad1-2-SNAP und hsEcad1-5-SNAP nicht nachgewiesen werden.

In HEK293-Zellen konnten beide Konstrukte hsEcad1-2-SNAP und hEcad-1-5-SNAP exprimiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Expression von His12-getaggten hsEcad1-5-SNAP in HEK293-Zellen durchgeführt, die im folgenden Kapitel 5.1.4 beschrieben wird.

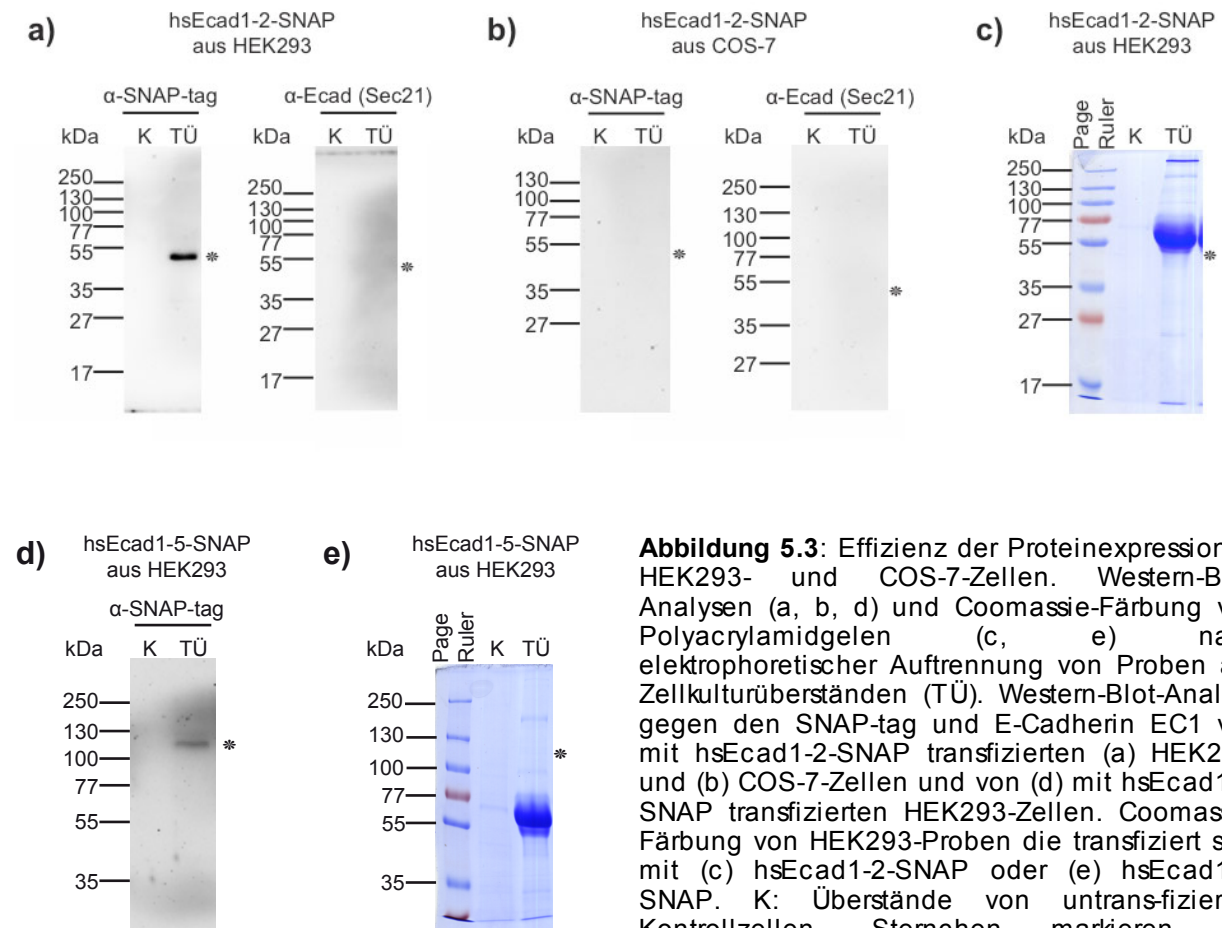


Abbildung 5.3: Effizienz der Proteinexpression in HEK293- und COS-7-Zellen. Western-Blot-Analysen (a, b, d) und Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen (c, e) nach elektrophoretischer Auftrennung von Proben aus Zellkulturüberständen (TÜ). Western-Blot-Analyse gegen den SNAP-tag und E-Cadherin EC1 von mit hsEcad1-2-SNAP transfizierten (a) HEK293- und (b) COS-7-Zellen und von (d) mit hsEcad1-5-SNAP transfizierten HEK293-Zellen. Coomassie-Färbung von HEK293-Proben die transfiziert sind mit (c) hsEcad1-2-SNAP oder (e) hsEcad1-5-SNAP. K: Überstände von untransfizierten Kontrollzellen. Sternchen markieren die erwarteten Positionen der proteinspezifischen

Banden. Größenstandard: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder. Detektion der Proteine im Western-Blot erfolgte mittels der Peroxidase-Methode.

5.1.4 Reinigung von hsEcad1-5-SNAP-His12 aus Zellkulturüberständen

Für die Reinigung des Proteins hsEcad1-5-SNAP-His12 wurden HEK293-Zellen in 75 cm²-Kulturflaschen ausgesät und mit dem hsEcad1-5-SNAP-His12 (Vektorkarte siehe Anhang) transfiziert. Über einen Zeitraum von 7-8 Tagen wurde der Zellkulturüberstand alle zwei Tage gesammelt und mit frischem Medium ersetzt, bis die Zellen abstarben. Gesammelte Zellkulturüberstände wurden eingengt und gepoolt. Dieser Rohextrakt wurde anschließend auf eine Ni²⁺-NTA-Säule beladen und mit einem Imidazol-Gradienten eluiert. Die Expression von hsEcad1-5-SNAP-His12 in transient und stabil transfizierten HEK293-Zellen wurde verglichen. Sowohl transient als auch stabil transfizierte Zellen konnten für die Expression und Aufreinigung von

hsEcad1-5-SNAP-His12 erfolgreich eingesetzt werden. Abb. 5.4 a zeigt beispielhaft ein Chromatogramm der Aufreinigung von hsEcad1-5-SNAP-His12 aus dem Überstand transient transfizierter HEK293-Zellen.

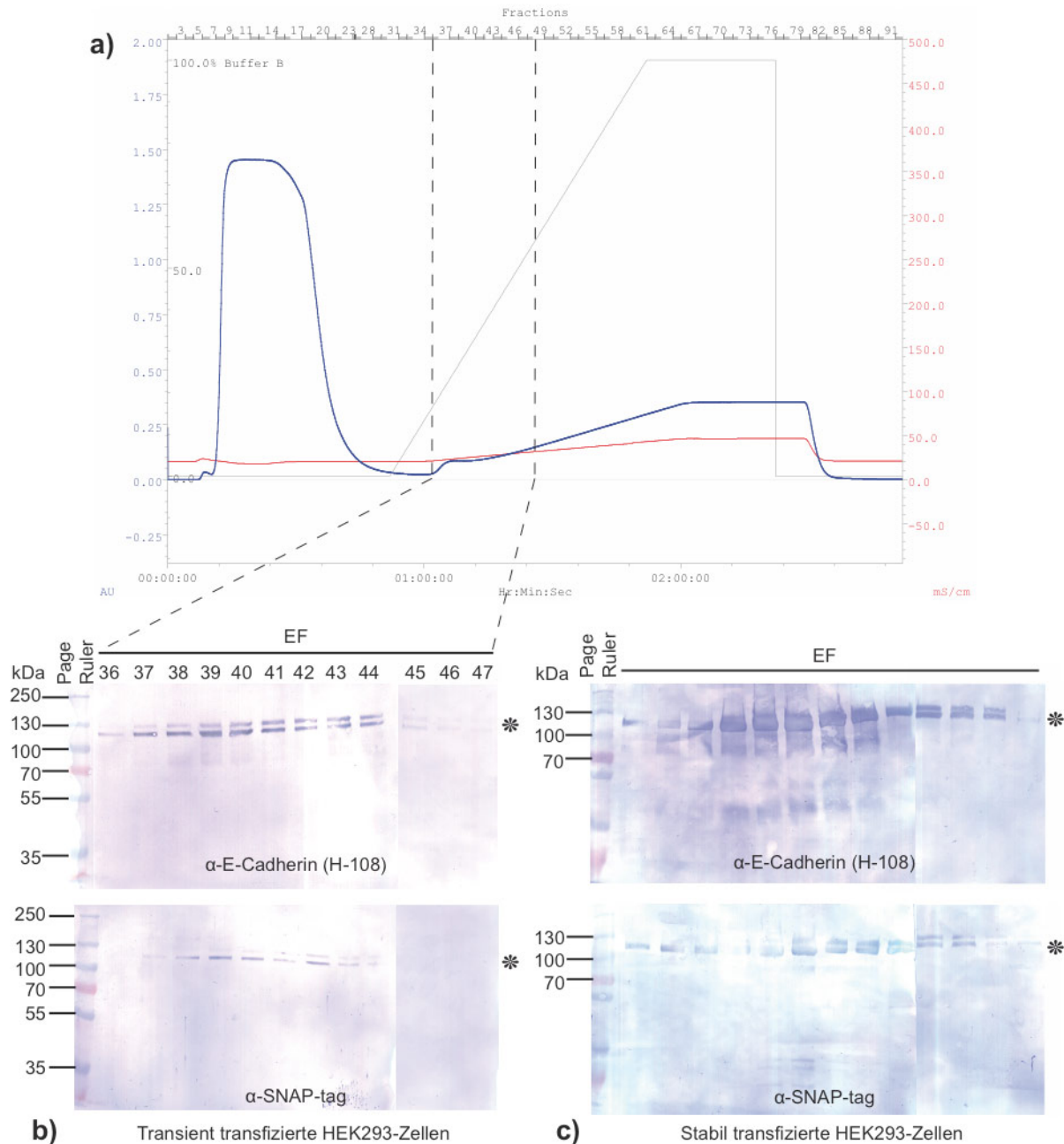


Abb. 5.4: Chromatogramm und Western-Blot-Analysen von Elutionsfraktionen nach Reinigung von His-getaggttem hsEcad1-5-SNAP aus HEK293 Zellkulturüberständen. (a) Chromatogramm nach einer Aufreinigung aus Zellkulturüberständen transient transfizierter HEK293-Zellen. (b) Western-Blot-Analyse gegen E-Cadherin und SNAP-tag von Elutionsfraktionen (EF) 36 bis 47 aus der Aufreinigung von (a) und (c) von EF einer Aufreinigung von hsEcad1-5-SNAP aus stabil transfizierten HEK293-Zellen. Sternchen markieren die erwarteten Positionen der

proteinspezifischen Banden. Detektion der Proteine im Western-Blot erfolgte mittels der AP-Methode.

Der in diesem Chromatogramm erscheinende kleine Peak in der UV-Adsorption (Fraktionen 36-47) korreliert mit der in den Western-Blot-Analysen gegen SNAP-tag und E-Cadherin sichtbaren Doppelbanden bei etwa 120 und 130 kDa (Abb 5.4 b). Die Intensität dieser Doppelbanden waren in Western-Blot-Analysen von Elutionsfraktionen nach der Aufreinigung aus Überständen von stabil transfizierten HEK293-Zellen deutlich intensiver (Abb. 5.4 c). Die Menge des exprimierten hsEcad1-5-SNAP-His12 war jedoch nicht hoch genug, um auf Coomassie gefärbten Polyacrylamidgelen visualisiert zu werden. Mittels Silberfärbung konnten jedoch Banden in der entsprechenden Höhe auf dem Gel nachgewiesen werden (Abb. 5.5 a). Im Gegensatz zu transient transfizierten Zellen konnte aus stabil transfizierten Zellen mehr als die doppelte Menge an Protein gewonnen werden (transient: 610 µg/ml = 5 µM; stabil: 1,65 mg/ml = 14 µM).

Die Expressioneffizienz von hsEcad1-5-SNAP-His12 in HEK293- und COS-7-Zellen wurde verglichen. Nach affinitätschromatografischer Reinigung von aus HEK293- und COS-7-Zellen gewonnener Überstände, wurden die Elutionsfraktionen gepoolt und eingeeengt (EP). Anschließend wurden Western-Blot-Analysen gegen E-Cadherin, SNAP-tag und His-tag durchgeführt. Aus Abb. 5.5 b, c und d geht hervor, dass mit allen drei Antikörpern die für E-Cadherin typische Doppelbande in der Höhe von etwa 120/130 kDa in den Proben aus HEK293-Zellen zu detektieren waren. Bei den Proben, die aus COS-7-Zellkulturüberständen gewonnen wurden, konnte nur mit dem α -E-Cadherin (H-108) ein schwaches Signal detektiert werden (vergleiche Abb. 5.5 b). Die Expression von hsEcad1-5-SNAP-His12 war in HEK293-Zellen effektiver als in COS-7-Zellen, so dass für die Gewinnung von hsEcad1-5-SNAP-His12 nur HEK293-Zellen verwendet wurden.

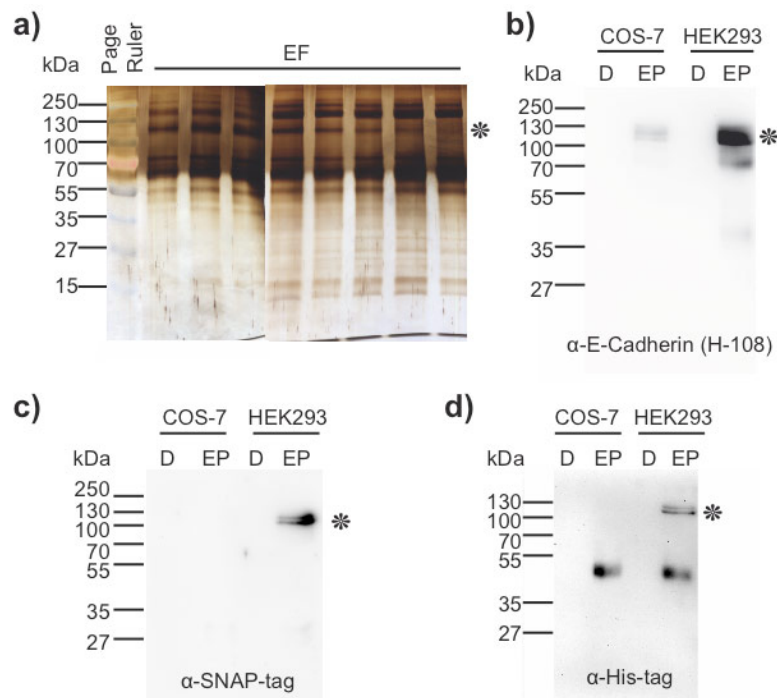


Abb. 5.5: Nachweis von hsEcad1-5-SNAP-His12 in Elutionsfraktionen mittels Silberfärbung (a) und Western-Blot-Analysen (b, c, d). (a) Silberfärbung von Elutionsfraktionen nach elektrophoretischer Auftrennung. Western-Blot-Analysen von Proben aus Überständen transfizierter HEK293- und COS-7-Zellen gegen (b) E-Cadherin, (c) SNAP-tag und (d) His-tag. Sternchen markieren die erwarteten Positionen der proteinspezifischen Banden. D: Durchlauf nach Poolen und Einengen von EF. Detektion der Proteine im Western-Blot erfolgte mittels der Peroxidase-Methode.

5.2 Oberflächenanalytik

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war die Herstellung von funktionalen Oberflächen, die für die Kopplung SNAP-getaggtter Fusionsproteine eingesetzt werden können. Die Funktionalisierung mit BG-Gruppen (Substrat des SNAP-tags) erfolgte über selbstorganisierte Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs) bestehend aus BG-Thiolen an Goldoberflächen. Die Verwendung von BG-Thiolen in SAMs war bis zu diesem Zeitpunkt in der Literatur nicht beschrieben. Daher war eine detaillierte Analyse der SAMs mittels unterschiedlicher Methoden notwendig, deren Ergebnisse sich ergänzen und ein Gesamtbild der Qualität erstellen. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Methoden dargestellt.

5.2.1 Nachweis der SAM-Ausbildung mittels XPS

Für den Nachweis der an Gold-beschichteten Oberflächen gebundenen Thiol-SAMs wurde die Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) angewendet. Grundlagen der XPS-Methode können Kapitel 4.4.4 entnommen werden.

Zunächst wurde die Veränderung eines Me-EG₃-Thiol-SAMs in Abhängigkeit von der Röntgenbestrahlungszeit ermittelt (Abb. 5.6). Mit zunehmender Expositionszeit konnte eine Abnahme der Signalintensität für den Sauerstoff gebundenen Kohlenstoff C 1s detektiert werden.

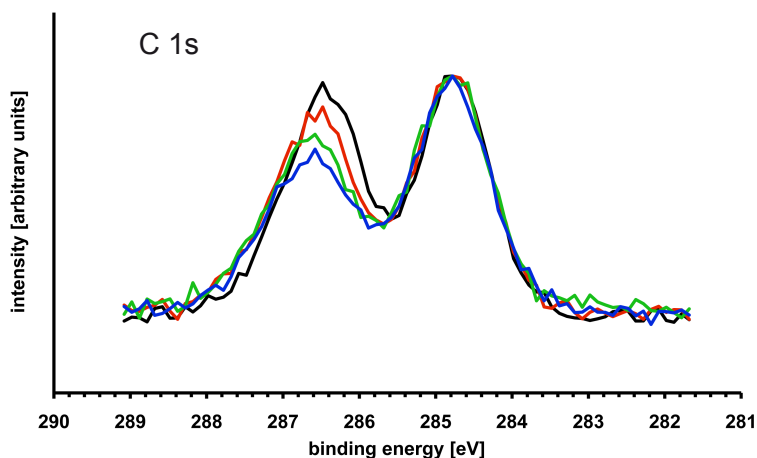


Abb. 5.6: Veränderung eines Me-EG₃-Thiol-SAMs in Abhängigkeit der Expositionsdauer mit Röntgenstrahlung. Zu erkennen ist die Abnahme der Signalintensität des Sauerstoff gebundenen Kohlenstoffs nach längerer Exposition. Farbcodierung für die einzelnen Spektren: – zu Beginn der Messung, – nach 9 Minuten, – nach 21 Minuten, – nach 27 Minuten.

Dies bedeutet, dass bei längerer Exposition mit Röntgenstrahlung der SAM geschädigt wurde. Um die Schädigung des SAMs zu vermeiden, wurden hochaufgelöste Element-felder jeweils an 36 Probenpositionen mit kurzer Strahlungsexposition gemessen und zu jeweils einem Spektrum zusammengefasst. Alle SAMs wurden aus einer 100 µM-Lösung gebildet und direkt nach der Herstellung vermessen. Abb. 5.7 zeigt diese XPS-Spektren für S 2p, O 1s und C 1s von SAMs aus reinem Me-EG₃-Thiol (Abb. 5.7 a). Der S 2p_{3/2}-Peak erscheint bei 162,1 eV. Dies

entspricht der Bindungsenergie von Schwefel das an Gold gebunden ist. Für O 1s zeigte das Spektrum einen Peak bei 533,0 eV der der Komponente C-**O**-C zugeordnet werden kann. Das C 1s-Spektrum enthielt zwei Hauptkomponenten bei 284,9 und 286,7 eV. Diese geben jeweils die Bindungsenergien von C-**CH** und **C**-O wieder. Zusätzlich war eine schwache Komponente bei 284,9 eV zu sehen.

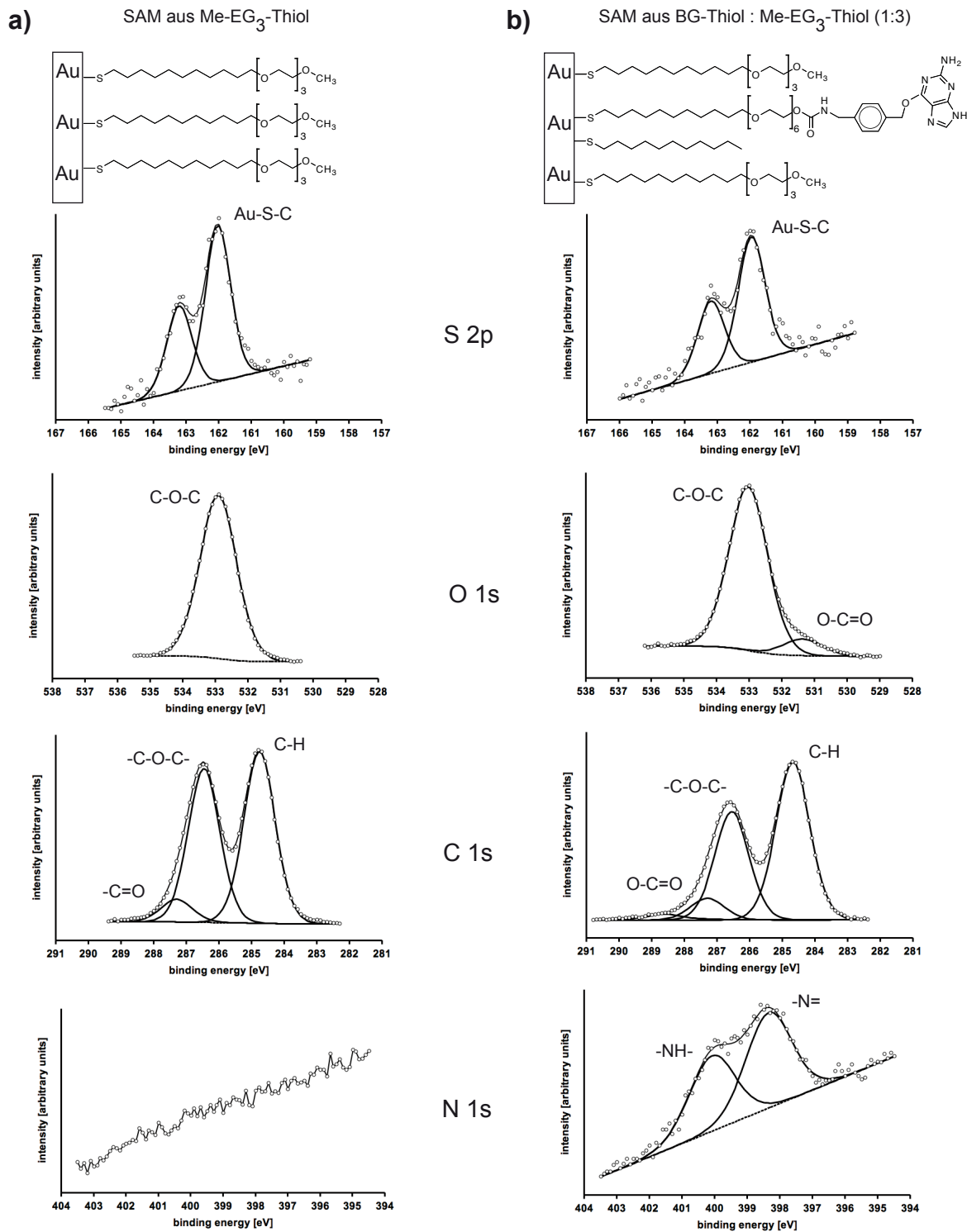


Abb. 5.7: S 2p-, O 1s-, C1s- und N 1s-XPS-Spektren für SAMs aus (a) Me-EG₃-Thiol und (b) einem gemischten SAM aus BG-Thiol und Me-EG₃-Thiol im Verhältnis 1:3.

Wurden SAMs aus einer Mischung von BG-Thiol und Me-EG₃-Thiol im Verhältnis 1:3 hergestellt (Abb. 5.8 b) erschienen im O 1s- und C 1s-Spektrum zusätzliche Komponenten außerhalb der Stickstoff-Detektion. Der Peak bei 531,6 eV im O 1s-

Spektrum und der C 1s-Peak bei 288,6 eV konnte der Komponente C=O des BG-Thiols zugeordnet werden. Diese Peaks waren im Spektrum von SAMs aus reinem Me-EG₃-Thiol nicht zu beobachten. Das N 1s-Spektrum des gemischten SAMs zeigte ein Multiplett aus zwei Peaks bei 398,7 und 400,3 eV. Diese Bindungsenergien sind den Komponenten C–N=C und C–N–H/O=C–N–H vom BG-Thiol zuzuordnen. Eine Schichtdickenbestimmung des Me-EG₃-Thiol-SAMs mittels winkelaufgelöster XPS-Messungen zeigte eine Schichtdicke von 2,2 nm die dem Tiefenprofil in Abb. 5.8 zu entnehmen ist. Des weiteren bestätigte das Tiefenprofil die erwartete Orientierung der Thiol-Moleküle in dem SAM, in dem die EG₃-O-CH₃-Einheit der Goldfläche abgewendeten Seite sitzen und der Schwefel an der Grenzfläche Gold/SAM liegt. Mittels XPS konnte die Bildung eines SAMs das BG-Thiol enthält bestätigt werden.

XPS-Messungen und Auswertungen wurden unter Anleitung von Dr. Michael Bruns am Institut für Materialforschung III durchgeführt. Winkelaufgelöste XPS-Messungen wurden von Dr. R. White im ThermoFisher Scientific Applikationslabor durchgeführt.

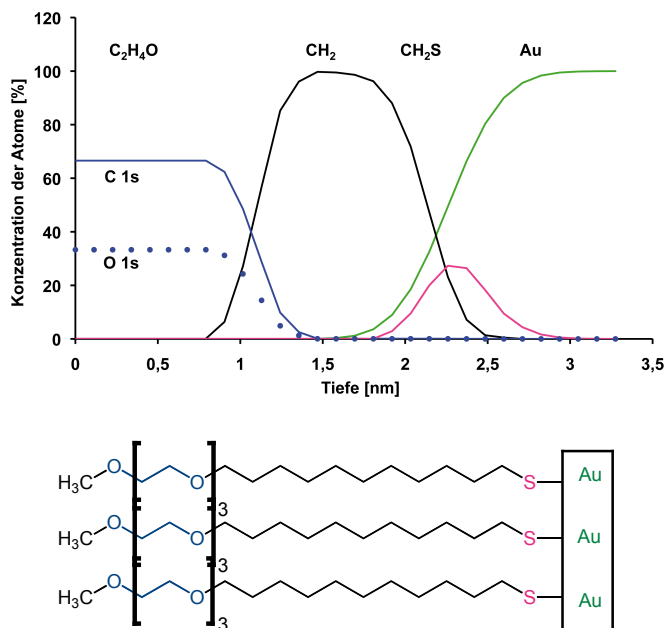
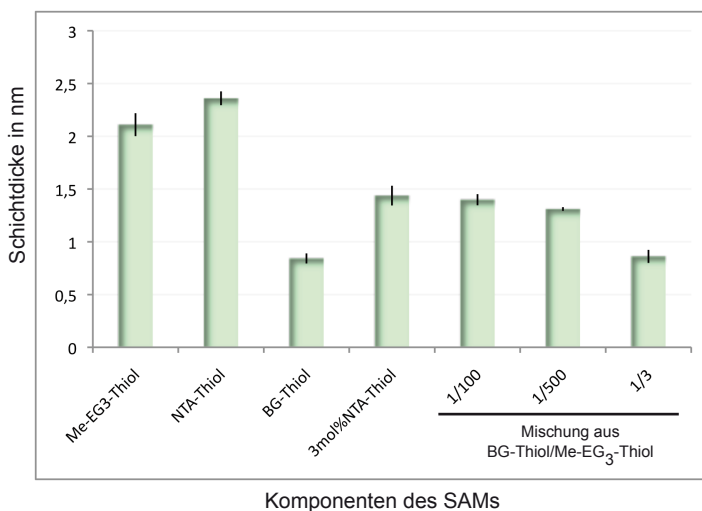


Abb. 5.8: Tiefenprofil erstellt aus winkelaufgelösten XPS-Messungen an einem Me-EG₃-Thiol-SAM. C–O- (schwarz) und O- (blau) Elemente sind in der Oberfläche angesiedelt. C–H (grün) ist im mittleren Bereich und S (pink) sitzt in der Grenzfläche zum Gold. Zum Vergleich ist ein SAM schematisch abgebildet. Die Farb-codierung im Schema entspricht der in der schematischen Abbildung des SAMs an der Goldoberfläche.

5.2.2 Bestimmung der SAM-Schichtdicke mittels Ellipsometrie

Abb. 5.9 zeigt eine Zusammenstellung der ellipsometrisch ermittelten Schichtdicken unterschiedlicher Thiol-SAMs in einem Diagramm. 5-10 Proben einer SAM-Sorte wurden an jeweils drei Stellen vermessen. Das Diagramm zeigt eine Abnahme der Schichtdicken von SAMs die aus zwei Thiolsorten bestehen (3mol% NTA-Thiol, 1/100,



1/500, 1/3). Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen mit den Standardfehlern. Mit dieser Methode erhielt man die niedrigste Schichtdicke für SAMs aus reinem BG-Thiol.

Abb. 5.9: Schichtdicken von SAMs ermittelt aus ellipsometrischen Messungen.

Die ellipsometrischen Messungen unterstützten die XPS-Ergebnisse und zeigten eine SAM-Bildung, bei der eine Schichtzunahme an der Goldoberfläche gezeigt werden konnte.

Alle ellipsometrischen Messungen wurden mit Unterstützung von Vanessa Trouillet am Institut für Materialforschung III durchgeführt.

5.2.3 Bestimmung der SAM-Schichtdicke mittels AFM

Um die Schichtdicke mittels AFM zu bestimmen wurden SAMs auf Goldoberflächen gestempelt. Abb. 5.10 zeigt AFM-Aufnahmen und die entsprechenden Höhen-darstellungen. Die Aufnahmen wurden im Kontaktmodus durchgeführt. Dabei wurden die Proben an der Luft abgerastert. Gestempeltes Me-EG₃-Thiol wurde ohne Auffüllen unbeschichteter Goldoberflächen vermessen (Abb. 5.10 a). Entlang einer ausgewählten Linie wurde das Höhenprofil hergestellt und eine Schichtdicke von ca.

2 nm bestimmt (Abb. 5.10 b). Wurde eine Mischung aus BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol im Verhältnis 1:20 gestempelt und ohne Auffüllen unbeschichteter Goldoberflächen vermessen (Abb. 5.10 c) so erhielt man mittels der Höhendarstellungen eine Schichtdicke von 1 nm (Abb. 5.10 d).

AFM-Messungen bestätigten die Ergebnisse aus XPS und Ellipsometrie und zeigten die erfolgreiche Herstellung von gemusterten SAMs auf Goldoberflächen

Alle AFM-Messungen und Auswertungen wurden von Dr. Clemens Franz am CFN durchgeführt.

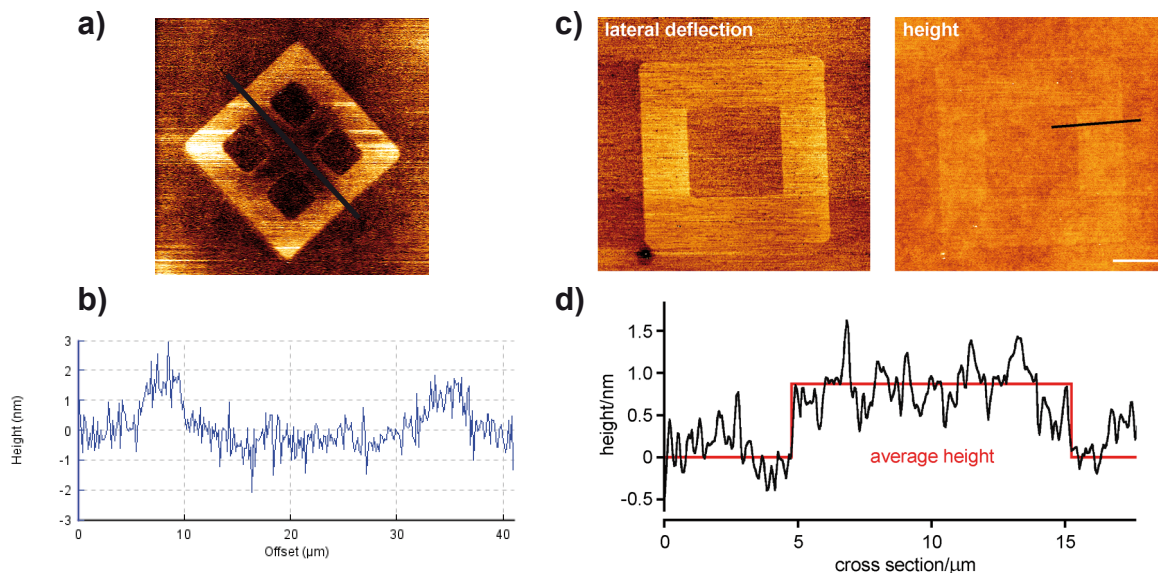


Abb. 5.10: Bestimmung der Schichtdicken mittels AFM. Kontaktmodus-Aufnahmen an Luft von gestempeltem (a) Me-EG₃-Thiol und (c) 1:20-Mischung aus BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol ohne Auffüllen nicht-bestempelter Goldoberflächen. (b) und (d) Graphische Höhendarstellungen entlang der in a und c gezeichneten Linien.

5.2.4 Nachweis der SAM-Ausbildung mittels ToF-SIMS

Um das BG-Thiol in gemischten SAMs bei einem Mischungsverhältnis von 1:100 (BG-Thiol: Me-EG₃-Thiol) nachzuweisen, wurden ToF-SIMS-Analysen ausgeführt. Für die Oberflächenspektrometrie wurden Goldoberflächen in jeweils 100 µM-Lösungen von einer 1:100- oder 1:3-Mischung BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol behandelt. Wie den Spektren in Abb. 5.11 zu entnehmen ist, konnten in SAMs aus einer 1:100-Mischung (Abb. 5.11 a) und einer 1:3-Mischung (Abb. 5.11 b) Fragmente des BG-Thiols identifiziert werden. Bei der Oberflächenabbildung sollten laterale Strukturen im µm-Bereich abgebildet werden. Hierfür wurden bestempelte Proben eingesetzt. Die Ergebnisse können Abb. 5.12 entnommen werden. Es wurden zwei verschiedene Proben untersucht. Probe 1 wurde mit einer 1:100-Mischung von BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol bestempelt wobei nicht bestempelte Flächen mit Me-EG₃-Thiol aufgefüllt wurden (Abb. 5.12 a). Probe 2 wurde mit Me-EG₃-Thiol bestempelt und nicht bestempelte Flächen mit einer 1:100-Mischung von BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol aufgefüllt. BG-Thiol-Fragmente konnten auf Probe 1 nicht eindeutig an den bestempelten Stellen nachgewiesen werden. Auf Probe 2 wurden BG-Thiol-Fragmente vermehrt auf den aufgefüllten Flächen detektiert. Hier konnte das Muster des Stempels gut abgebildet werden.

Die ToF-SIMS-Analysen ermöglichten die Detektion von BG-Thiol in einer 1:100-Mischung und unterstützten die XPS-Messungen. Für die XPS-Analyse konnte aufgrund der Nachweisgrenze das BG-Thiol in einem SAM, das aus einer 1:100-Mischung hergestellt wurde das BG-Thiol nicht detektiert werden.

Da ein ToF-SIMS in Karlsruhe nicht verfügbar ist, wurden die von mir hergestellten Proben in meinem Beisein in Münster bei der Firma IonTOF analysiert.

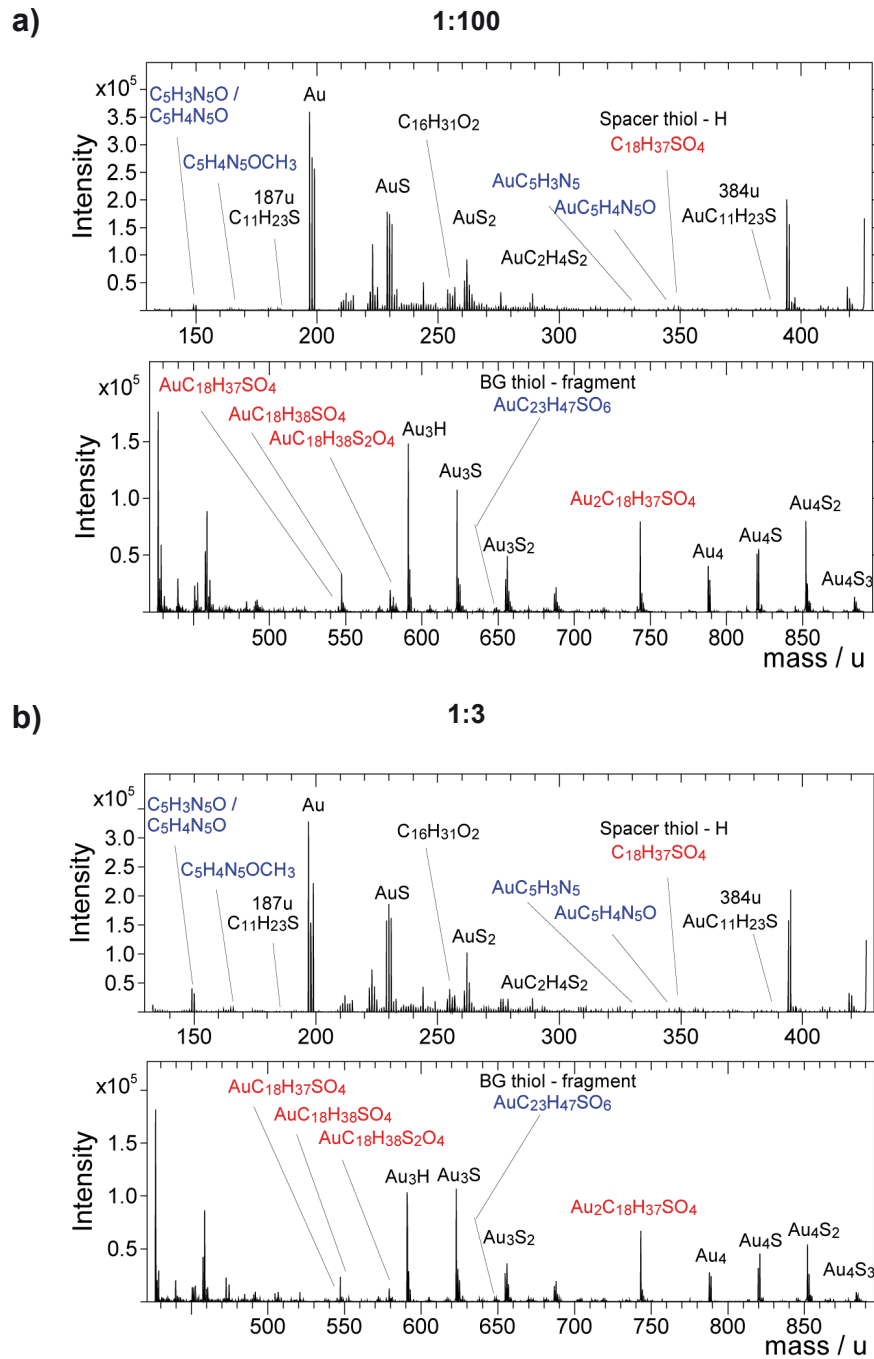


Abb. 5.11: ToF-SIMS-Spektren von SAMs aus einer (a) 1:100- und (b) 1:3-Mischung BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol. Spacerthiol: Me-EG₃-Thiol, rot: Me-EG₃-Thiol-Fragmente, blau: BG-Thiol-Fragmente.

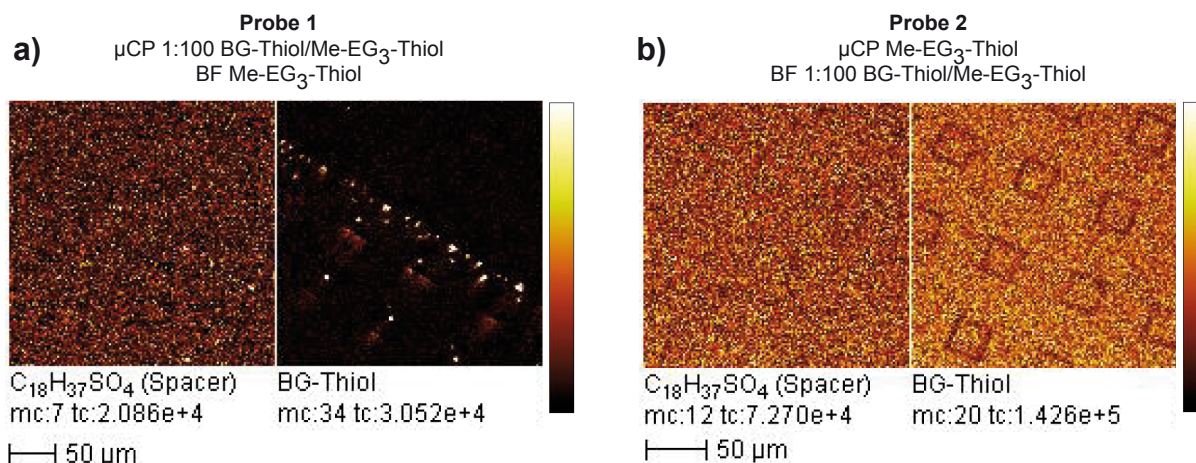


Abb. 5.12: Oberflächenabbildung mit Thiolen bestempelter Proben mittels ToF-SIMS. (a) Probe 1: 1:100-Mischung von BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol wurde gestempelt (μ CP) und anschließend mit Me-EG₃-Thiol (Spacer) aufgefüllt (BF). (b) Probe 2: Me-EG₃-Thiol wurde gestempelt und anschließend mit 1:100-Mischung von BG-Thiol/Me-EG₃-Thiol aufgefüllt.

5.2.5 Bestimmung der Menge an SNAP-getaggttem His-GFP auf BG-Thiol funktionalisierten Oberflächen mittels QCM-D und AFM

Zur Bestimmung der spezifischen und unspezifischen Proteinadsorption auf den SAMs aus MeO-EG₃-Thiol und BG-Thiol wurden QCM-D- und AFM-Messungen durchgeführt. Für die QCM-D-Analyse wurden die Proben auf QCM-D Kristallen frisch hergestellt. Abb. 5.13 zeigt die Adsorptionsergebnisse auf gemischten Thiol-SAMs, die mittels QCM-D- und AFM-Messungen, erhalten wurden. Die Ergebnisse der QCM-D-Messungen sind in einem Diagramm zusammengestellt (Abb. 5.13 a). Hier konnte eine starke Zunahme der Proteinadsorption von 475 ng/cm² für die 1:100-Mischung auf 720 ng/cm² für die 1:10-Mischung von BG-Thiol/MeO-EG₃-Thiol gezeigt werden. Für die AFM-Messungen wurden Oberflächen mit 1:100- und 1:10-Mischungen von BG-Thiol/MeO-EG₃-Thiol bestempelt und mit MeO-EG₃-Thiol aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit His-SNAP-GFP behandelt. Diese Analysen ergaben eine Erhöhung der Proteindichte von 17,4% für den 1:100-SAM auf 78,7% für den 1:10-SAM aus BG-Thiol/MeO-EG₃-Thiol (Abb. 5.13 b).

QCM-D- und AFM-Messungen konnten zeigen, dass an BG-Thiol enthaltenden SAMs das Testprotein His-SNAP-GFP binden kann.

QCM-D-Messungen wurden mit Unterstützung von Dr. Alexander Welle im Institut für Biologische Grenzflächen und AFM-Messungen von Dr. Clemens Franz am CFN durchgeführt.

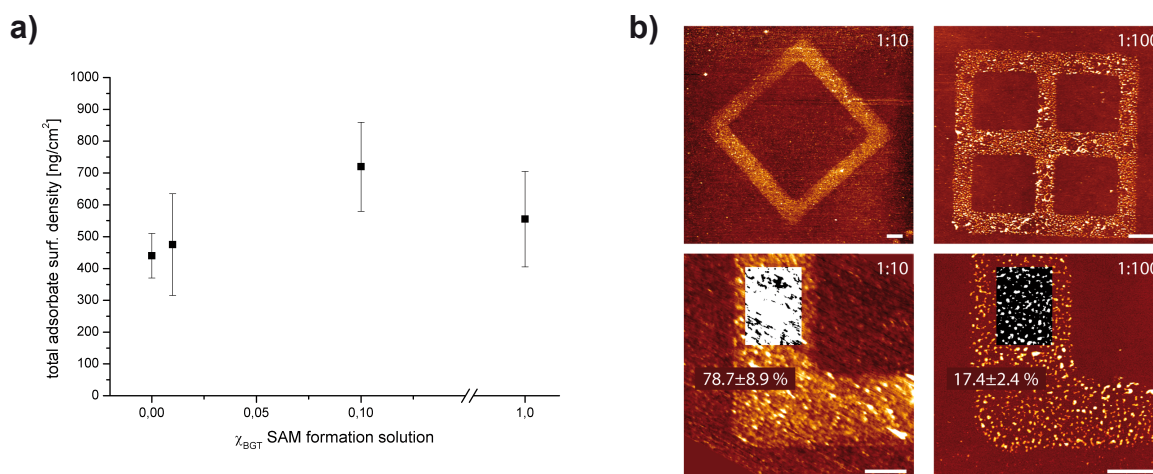


Abb. 5.13: Quantifizierung der Proteinadsorption mittels QCM-D und AFM. (a) Zusammenstellung der Adsorptionsergebnisse auf MeO-EG₃-Thiol-, BG-Thiol- und gemischten BG-Thiol/MeO-EG₃-Thiol-SAMs mittels QCM-D in einem Diagramm. Molare Fraktion $\chi_{\text{BGT}} = 0, 0,01, 0,1$ und $1, n \geq 3$. BGT: BG-Thiol. (b) AFM-Höhenbilder gestempelter SAMs zweier Mischungen BG-Thiol/MeO-EG₃-Thiol nach der Kopplung von His-SNAP-GFP. Oberer Bildreihe: Übersichtsscans. Untere Bilderreihe: Dazugehörigen höher aufgelösten Scans. Schwarz-weiß markierten Flächen: Flächen, in denen die Proteindichte quantifiziert wurde. Verhältnis Proteinbeschichtet (weiß) zu nicht-beschichtet (schwarz) ist unter den markierten Flächen angegeben.

5.3 Überprüfung der SNAP-BG-Reaktion an Oberflächen

Nach erfolgreicher Reinigung des Testproteins His-SNAP-GFP (siehe Kapitel 5.1) und oberflächenanalytischer Identifizierung der hergestellten SAMs (siehe Kapitel 5.2) konnten Versuche durchgeführt werden, bei der das Testprotein über die SNAP-BG-Reaktion an Oberflächen gebunden werden sollte. Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse dieser Bindungsversuche dargestellt.

5.3.1 Bindung von His-SNAP-GFP an μ CP-Oberflächen

Zunächst musste die Realisierbarkeit der SNAP-BG-Bindung an BG-Thiol enthaltenden SAMs getestet werden. Dafür wurde mit Thiol-SAMs bestempelte Proben mit dem His-SNAP-GFP behandelt und anschließend am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Es wurden zwei verschiedene Proben hergestellt. Probe 1 wurde mit einer 1:100-Mischung BG-Thiol/MeO-EG₃-Thiol bestempelt. Nicht bestempelte Goldflächen wurden mit MeO-EG₃-Thiol aufgefüllt. Nach Behandlung mit frisch gereinigtem His-SNAP-GFP zeigte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung die Bindung des His-SNAP-GFPs an den erwarteten Flächen (Abb. 5.14 a). Allerdings war ein leichter Hintergrund erkennbar, der auf eine unspezifische Proteinadsorption an MeO-EG₃-Thiol beschichteten Flächen deutet. Zur Kontrolle wurde die MeO-EG₃-Thiol Beschichtung verglichen mit einer unbehandelten Goldoberfläche (Probe 2). Dazu wurde mit MeO-EG₃-Thiol gestempelt und auf eine Auffüllung verzichtet. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen dieser Probe zeigten, dass das MeO-EG₃-Thiol-SAM unspezifische Proteinadsorption an Gold sehr stark unterbindet, die gestempelten Muster erschienen dunkel (Abb 5.14 b). Um die stark Protein adsorbierenden Goldoberflächen zu passivieren wurde daher in den späteren Experimenten stets eine Auffüllung mit MeO-EG₃-Thiol vorgenommen. In einem Kontrollexperiment sollte gezeigt werden, dass die Bindung des GFPs spezifisch über die BG-SNAP-Bindung verläuft. Hierfür wurde das His-SNAP-GFP vor der Bindung auf SAMs mit frei löslichem BG behandelt, um die SNAP-tag Bindungsstellen zu besetzen. Eine 1:100-Mischung von BG-Thiol/MeO-EG₃-Thiol wurde auf einer Goldoberfläche bestempelt und mit MeO-EG₃-Thiol aufgefüllt. Diese Oberfläche wurde mit dem SNAP-tag-blockierten His-SNAP-GFP behandelt. In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten auf diesen Proben keine Stempelmuster nachgewiesen werden (Abb. 5.14 c).

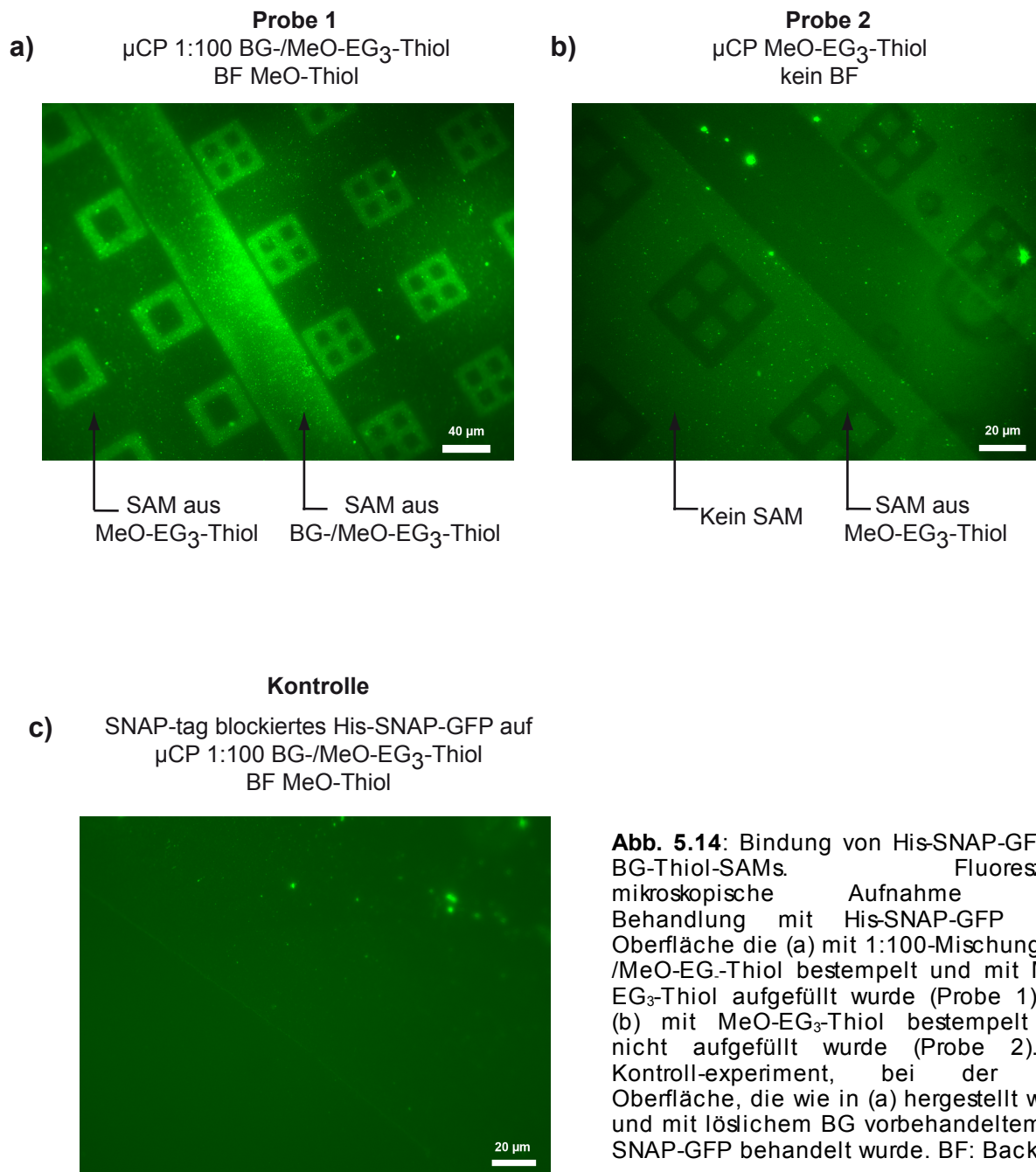


Abb. 5.14: Bindung von His-SNAP-GFP an BG-Thiol-SAMs. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Behandlung mit His-SNAP-GFP einer Oberfläche die (a) mit 1:100-Mischung BG-/MeO-EG₃-Thiol bestempelt und mit MeO-EG₃-Thiol aufgefüllt wurde (Probe 1) und (b) mit MeO-EG₃-Thiol bestempelt und nicht aufgefüllt wurde (Probe 2). (c) Kontroll-experiment, bei der eine Oberfläche, die wie in (a) hergestellt wurde und mit löslichem BG vorbehandeltem His-SNAP-GFP behandelt wurde. BF: Back-Fill.

Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Testprotein His-SNAP-GFP spezifisch über die SNAP-BG-Bindung an BG-enthaltenden SAMs bindet.

5.3.2 Bindung von His-SNAP-GFP an Lipid-DPN-Oberflächen

Als weitere Methode wurde die Kopplung von His-SNAP-GFP an BG-Lipid-Schichten erprobt. Hierfür wurden mit von Alexander Welle synthetisierten BG-Lipiden mittels Dip-Pen Nanolithographie (DPN) Lipidlayer erzeugt. Die Lipid-Strukturen und eine detaillierte Beschreibung der DPN können Kapitel 3 und 4 entnommen werden.

Die Lipid-Mischungen BG-DOPE/DOPC und BG-PEG-DOPE/DOPC wurden mittels DPN als Streifenmuster in $10 \mu\text{m}^2$ auf Glasoberflächen gebracht. Dabei wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Lipiden getestet. Nach der Herstellung der Lipidlayer waren die gebildeten Strukturen mikroskopisch im Durchlicht sichtbar (Abb. 5.15 a). Die Oberflächen wurden zum Blockieren freier Glasflächen mit 1% BSA und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ His-SNAP-GFP behandelt. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten die spezifische Bindung von His-SNAP-GFP an BG-Lipidlayer (Abb. 5.15 b). Die Bildung von Lipidlayer hing von den eingesetzten Lipid-Komponenten und deren Mischungsverhältnissen ab. Abb. 5.15 a zeigt, dass die Lipidlayer aus den reinen BG-Lipiden (1:0) in Durchlicht nicht zu sehen sind, während Lipidlayer aus den Mischungen 1:1 und 1:10 visualisiert werden konnten. Dabei zeigte die Mischung aus BG-PEG-DOPE/DOPC im Verhältnis 1:1 eine höhere Lipid-Abscheidungseffizienz als die Mischung BG-DOPE/DOPC. Aus Abb. 5.15 b geht hervor, dass eine Bindung von His-SNAP-GFP an die 1:10-Mischungen der BG-Lipide nicht nachweisbar ist. Das beste GFP-Signal wurde bei den 1:1-Mischungen detektiert. Zu erkennen war auch das GFP-Signal auf den Stellen mit reinem BG-PEG-Lipid, obwohl in der Durchlichtaufnahme kein Lipid-Muster erkennbar gewesen war (vergleiche Abb. 5.15 a und b). Bei höherer mikroskopischer Auflösung der GFP-gebundenen Lipid-Flächen wurden die Vorteile der DPN-Methode, Muster im μm - und nm-Bereich zu erzeugen, deutlich (Abb. 5.15 c). Die Quadrate mit den Kantenlängen von $10 \mu\text{m}$ wurden aus Linien gebildet, deren minimale Abstände bis zu 500 nm betragen hatten.

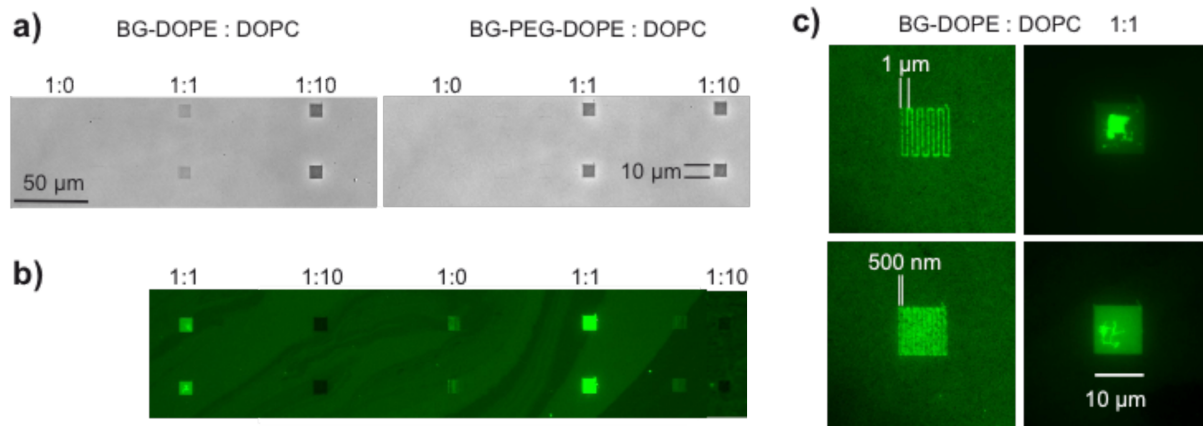


Abb. 5.15: Bindung von His-SNAP-GFP an BG-Lipidlayern. (a) Mikroskopische Durchlichtaufnahmen der gebildeten Lipidlayern aus Mischungen von BG-DOPE/DOPC und BG-PEG-DOPE/DOPC. (b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der in (a) gezeigten Lipidlayern nach Behandlung mit His-SNAP-GFP. (c) Höhere mikroskopische Auflösung von GFP-gebundenen Lipidflächen.

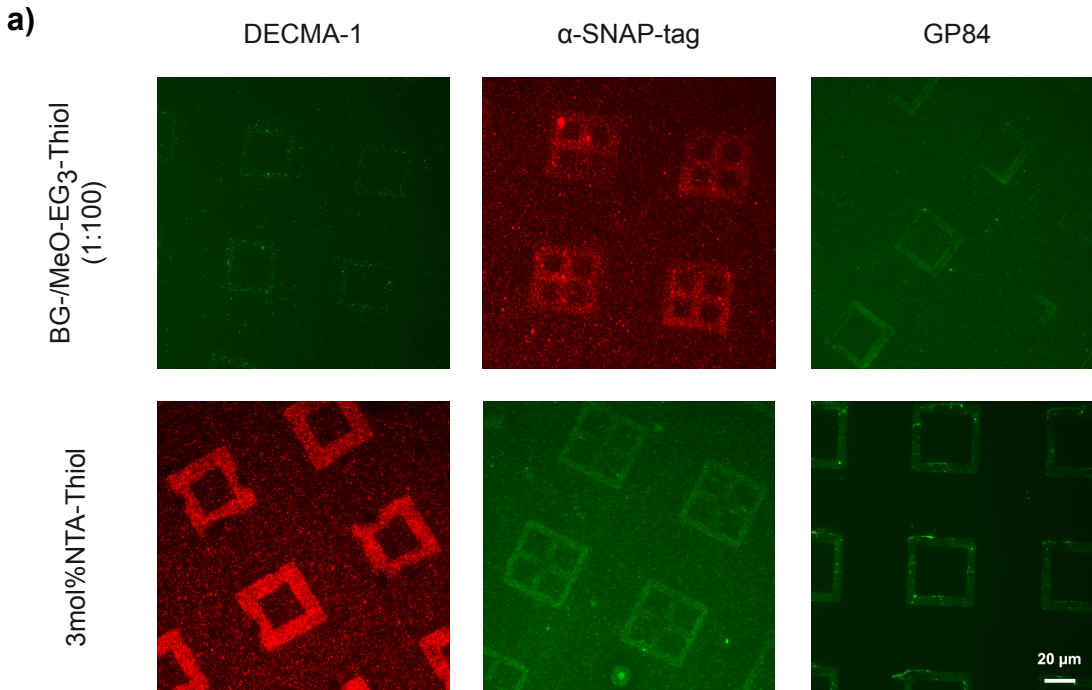
5.4 Bindung von SNAP-His-getagtem E-Cadherin EC1-5 an BG-funktionalisierte Oberflächen

Nach erfolgreicher Kopplung von His-SNAP-GFP wurde versucht, hsEcad1-5-SNAP-His12 an BG- bzw. NTA-funktionalisierten Oberflächen zu koppeln und dabei die E-Cadherin-spezifischen Adhäsionen zu erhalten.

5.4.1 Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 an μCP-Oberflächen

Zum Nachweis des an die μCP-Oberflächen gebundenen hsEcad1-5-SNAP-His12 wurden verschiedene Antikörper für indirekte Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt. Die Oberflächen wurden entweder mit einer 1:30-Mischung NTA-Thiol in MeO-EG₃-Thiol oder mit einer 1:100-Mischung aus BG-/MeO-EG₃-Thiol bestempelt und anschließend die freien Flächen mit MeO-EG₃-Thiol aufgefüllt. Nach Behandlung dieser Oberflächen mit hsEcad1-5-SNAP-His12 wurden unter Verwendung der Antikörper DECMA-1, α-SNAP-tag und GP84 indirekte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. DECMA-1 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die E-Cadherin

EC5 und GP84 ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchenserum, der gegen die E-Cadherin EC1-5 gerichtet ist. In Abb. 5.16 a sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen zusammengefasst.



b) Kontrolle:
SAM nicht mit E-CadherinEC1-5
funktionalisiert

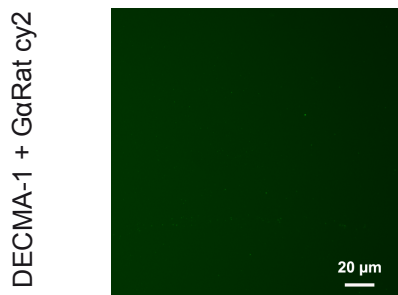


Abb. 5.16: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von hsEcad1-5-SNAP-His12 auf BG- bzw. NTA-Thiol enthaltenden SAMs mittels (a) zwei Antikörpern gegen das E-cadherin (DECMA-1 und GP84) und eines Antikörpers gegen den SNAP-tag. (b) Exemplarisches Ergebnis eines Kontrollexperimentes, an Oberflächen, die nicht mit hsEcad15-SNAP-His12 behandelt wurden. Kein Muster erkennbar.

Sowohl auf NTA-Thiol- als auch auf BG-Thiol-SAMs konnte das Protein mit dem DECMA-1, α -SNAP-tag und GP84-Antikörper detektiert werden. Der Nachweis war spezifisch, da sowohl die NTA-Thiol als auch die BG-Thiol SAM-Oberflächen an sich

bei direkter Inkubation mit den primären und/oder den sekundären Antikörpern kein Signal lieferten (Abb. 5.16 b).

Durch die indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen die E-Cadherin EC5 und den SNAP-tag konnten an BG-Thiol bzw. NTA-Thiol enthaltenden SAMs gebundenes E-Cadherin EC1-5 nachgewiesen werden.

5.4.2 Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 an Lipid-DPN-Oberflächen

Zum Nachweis des an Lipidlayern gebundenen hsEcad1-5-SNAP-His12 wurde ebenfalls die indirekte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Lipidlayer aus BG-DOPE:DOPC und BG-PEG-DOPE:DOPC wurden mittels DPN auf Glas abgeschieden. Die Bildung der Lipid-Muster konnte mikroskopisch im Durchlicht bestätigt werden (Abb. 5.17 a). Nach Blockierung mit BSA wurden die Oberflächen mit hsEcad1-5-SNAP-His12 behandelt und anschließend eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen die E-Cadherin EC5 mit dem Antikörper H-108 und gegen den SNAP-tag durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopische Analysen dieser Proben zeigten, dass hsEcadEC1-5-SNAP-His12 an BG-Lipid enthaltenden Lipidlayern gebunden war (Abb. 5.17 b). Eine Vergrößerung zeigte die feinen Strukturen aus denen die Lipidlayer-Muster aufgebaut sind (Abb. 5.17 c). Besonders deutlich erkennbar waren die Linien der Quadrate bei der Färbung gegen den SNAP-tag auf einer 1:1-Mischung von BG-DOPE:DOPC und auf reinem BG-PEG-DOPE.

Um die Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 an Oberflächen über den His-tag zu zeigen, wurden NTA-Lipidlayer hergestellt. Hierfür wurde ein NTA-Lipid in einer Mischung mit DOPC mittels DPN auf Glasoberflächen in Mustern abgeschieden.

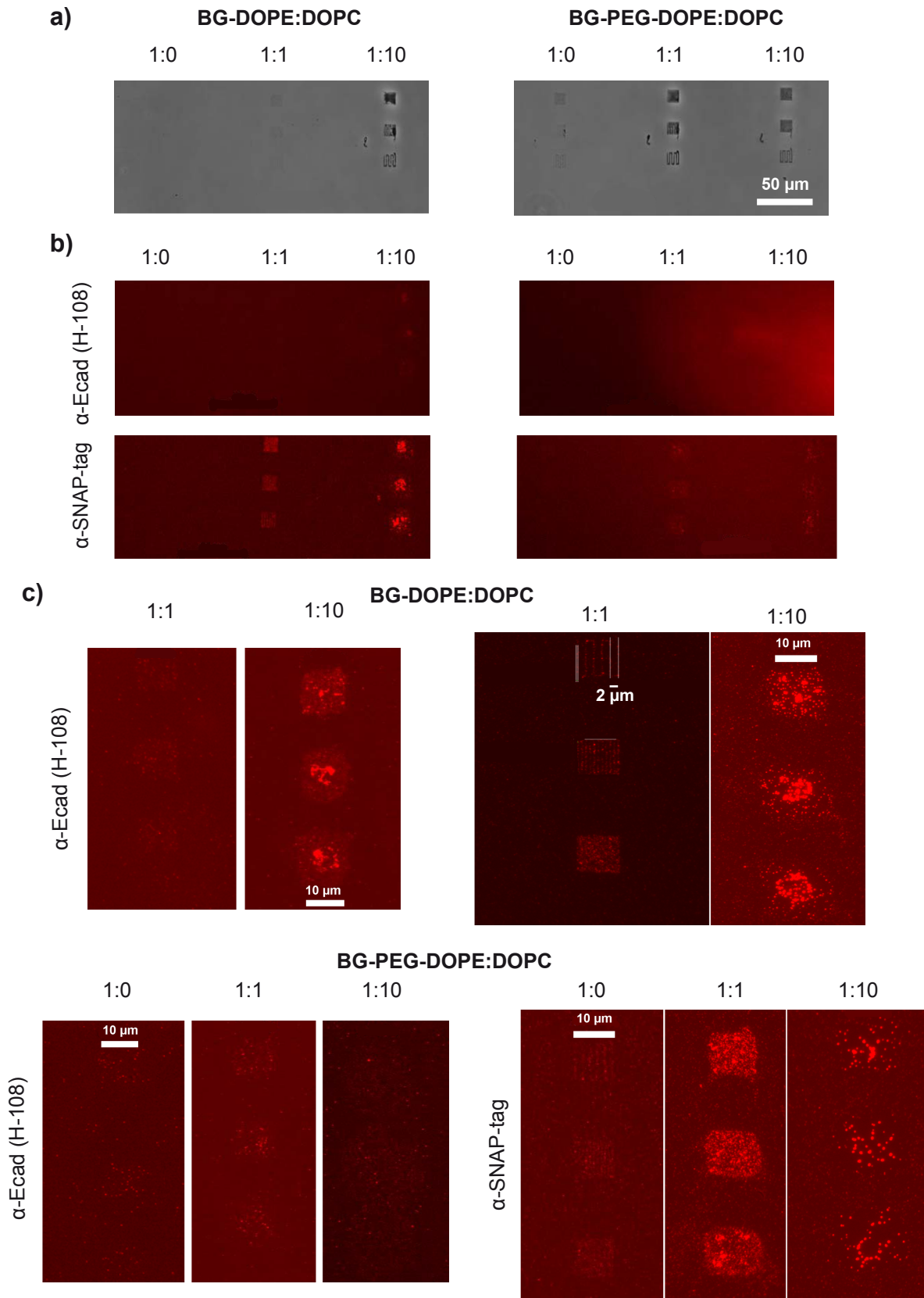


Abb. 5.17 (vorherige Seite): Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von hsEcad1-5-SNAP-His12 auf BG-enthaltenden Lipidlayern. (a) Lipidlayer-Muster in der Durchlichtaufnahme. (b) Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin EC5 mit dem Antikörper H-108 und gegen den SNAP-tag nach Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 an die in (a) gezeigten Flächen. (c) Darstellung der Strukturen in (b) bei höherer Auflösung.

Es wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse aufgetragen. Die unterschiedliche Qualität der Lipidlayer-Muster aus verschiedenen NTA-Lipid/DOPC-Mischungen konnte mikroskopisch im Durchlicht erkannt werden (Abb. 5.18 a). Nach Blockierung freier Glasoberflächen mit 1% BSA wurden die Oberflächen mit hsEcad1-5-SNAP-His12 behandelt und anschließend eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen die E-Cadherin EC5 und den SNAP-tag durchgeführt.

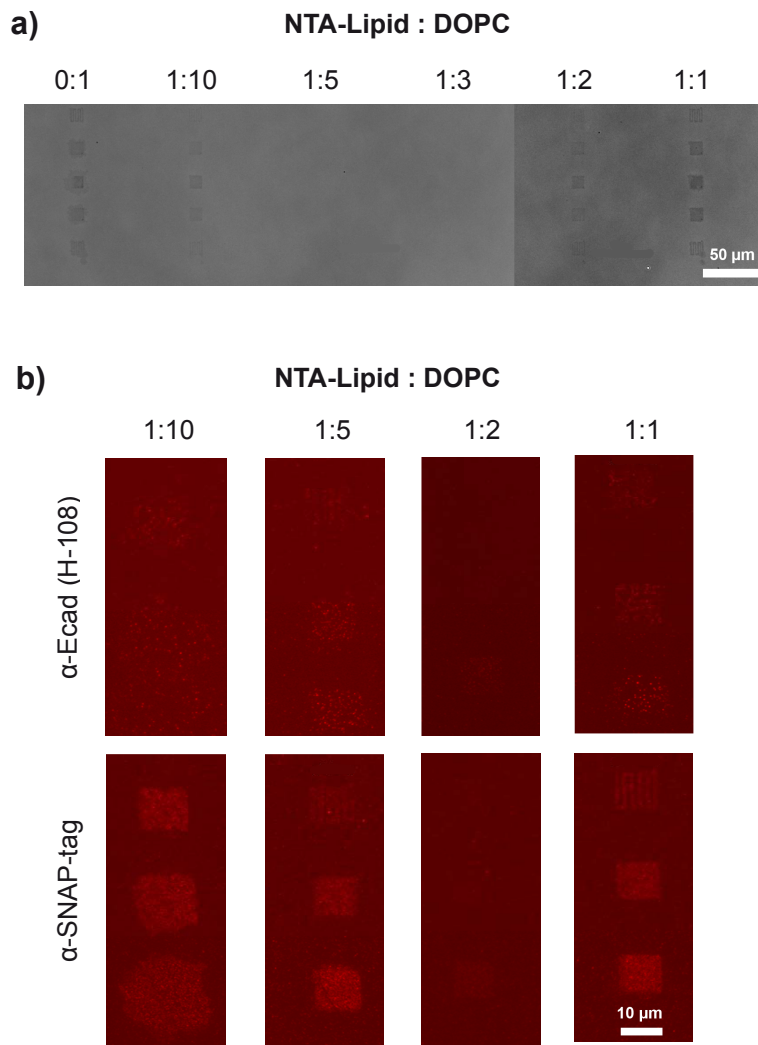


Abb. 5.18: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von hsEcad1-5-SNAP-His12 auf NTA-enthaltenden Lipidlayern. (a) Lipidlayer-Muster in der Durchlichtaufnahme. (b) Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin EC5 mit dem Antikörper H-108 und gegen den SNAP-tag nach Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 an die in (a) gezeigten Flächen.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten die Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 an NTA-Lipid enthaltenden Mustern (Abb. 5.18 b). Die Linien der Quadrate waren besonders gut bei der Färbung gegen den SNAP-tag zu sehen.

Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen die E-Cadherin EC5 und den SNAP-tag konnte die Bindung von hsEcad1-5-SNAP-His12 über die BG-SNAP-Bindung an BG-Thiol enthaltenden SAMs und über die Ni²⁺-NTA-His-tag Komplexierung an NTA-Lipid enthaltenden Lipidlayern nachgewiesen werden.

5.5 Funktionalität des über SNAP-BG bzw. His-Ni²⁺-NTA gebundenen hsE-Cadherin EC1-5

5.5.1 E-Cadherin-beschichtete Microspheres (Ecad-MS) auf hsEcad1-5-SNAP-His12 gekoppelten Lipid-DPN-Oberflächen

Die Funktionalität von hsEcad1-5, das über die His-Ni²⁺-NTA-Bindung an Ni²⁺-NTA-Lipid-Multilayern gebunden wurde, wurde mit E-Cadherin beschichteten Microspheres (Ecad-MS) getestet. Hierfür wurden MS zunächst mit dem Antikörper G α H IgFc γ behandelt. Zum Blockieren freier Bindungsstellen wurden die G α H IgFc γ -gebundene MS mit BSA behandelt und anschließend mit rhEcad-Fc beladen, so dass das rhEcad-Fc über die Antikörper-Bindung zwischen Fc-Domäne und G α H IgFc γ an die MS bindet.

Um die erfolgreiche Bindung des rhEcad-Fc an die MS zu bestätigen, wurden diese einer Western-Blot-Analyse unterzogen und in einem weiteren Experiment mit einem Antikörper gegen die E-Cadherin EC5 (DECMA-1) mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Wenn MS mit dem Antikörper G α H IgFc γ behandelt, anschließend mit BSA blockiert und mit rhEcad-Fc beschichtet wurden, konnte in der Western-Blot-Analyse E-Cadherin nachgewiesen werden (Abb. 5.19 a; Probe 4 und 5). MS, die ohne G α H IgFc γ -Behandlung mit rhEcad-Fc inkubiert wurden, zeigten keine Bande in der entsprechenden Höhe (Probe 6). Eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung der Proben

zeigte, dass sowohl die nicht mit E-Cadherin beschichteten MS (Probe 2) als auch die E-Cadherin beschichteten MS (Probe 4) vom DECMA-1-Antikörper erkannt werden (Abb. 5.19 b). Wurden diese Proben ohne Behandlung mit DECMA-1 alleine mit dem sekundären Antikörper G α Rat cy3 behandelt konnte keine Fluoreszenz detektiert werden (Probe 3 und 5). Demzufolge bindet der DECMA-1 Antikörper auch an G α H IgFc γ . Es wurde trotzdem neben dem α SNAP-tag Antikörper auch DECMA-1 im Test eingesetzt, da davon ausgegangen wurde, dass bei Inkubation der MS mit einem Überschuss von rhEcad-Fc, die Fc-Bindungsstellen des Kopplungsantikörpers G α H IgFc γ vollständig besetzt waren.

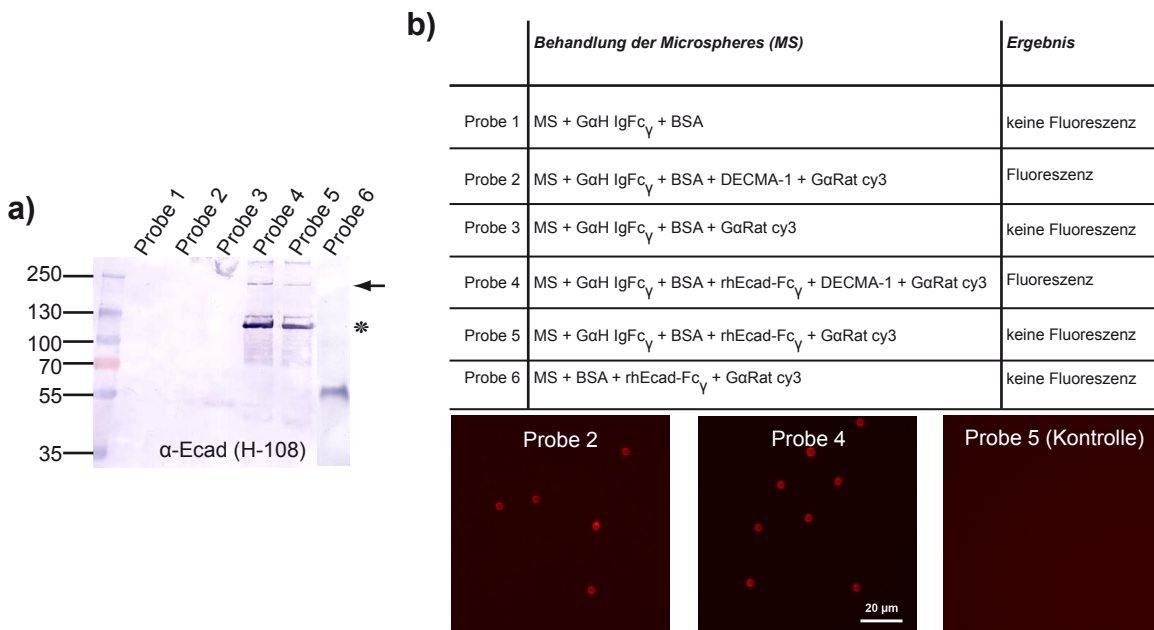


Abb. 5.19: Bindung des rhEcad-Fc an Microspheres (MS). (a) Western-Blot-Analyse der unterschiedlich behandelten MS-Proben gegen E-Cadherin. Die mit dem Sternchen markierte Höhe entspricht dem E-Cadherin-Monomer. Der Pfeil markiert das Dimere des E-Cadherins, welches durch die Fc-Gruppe zustande kommt. (b) Tabellarische Übersicht aller MS-Probenzusammensetzungen. Probe 1 bis 3 und Probe 6: Kontrollen. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen resultierten in einem Fluoreszenzsignal bei Probe 2 und 4.

NTA-Lipidlayer wurden mit hsEcad1-5-SNAP-His12 funktionalisiert und anschließend mit Ecad-MS drei Stunden unter leichtem Schütteln bei 37°C in Anwesenheit von 2 mM Ca²⁺ behandelt. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen gegen die E-Cadherin EC5 (DECMA-1) und den SNAP-tag zeigten, dass hsEcad1-5-SNAP-His12 an den Lipid-

Multilayern gebunden ist (Abb. 5.20). Den Lipid-Mischungen wurde ein Rhodamin-markiertes Lipid hinzugefügt, um die Lipidlayer-Muster detektieren zu können. Die Lipidlayer zeigten sowohl eine E-Cadherin- als auch eine SNAP-tag-Färbung (Abb. 5.20 obere Bildreihe). Weiter konnte durch die Rhodaminfärbung aufgedeckt werden, dass Lipide durch die Ecad-MS aus den Lipidlayern herausgezogen werden und an den Ecad-MS haften bleiben. Die Ecad-MS zeigten eine Rhodaminfärbung in der Fokusebene 1 (Pfeile). Die herausgezogenen Lipide hinterließen kleine Löcher in den Lipidlayern, was sowohl in der Rhodamin- als auch in der E-Cadherin-Färbung gesehen werden konnte (Abb. 5.20 untere Bildreihe).

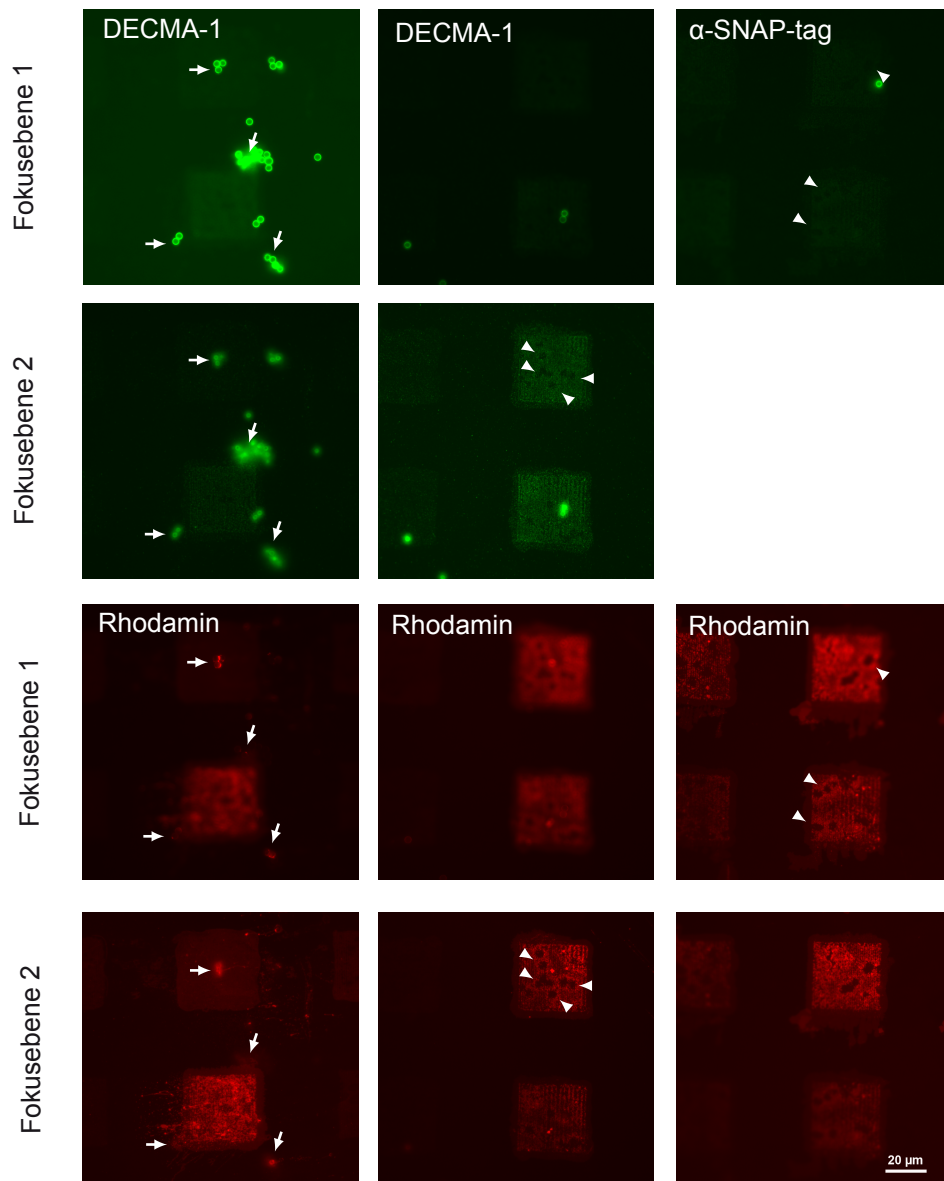


Abb. 5.20 (vorherige Seite): Behandlung von hsEcad1-5-SNAP-His12 funktionalisierten NTA-Lipid-Multilayern mit Ecad-MS. Gezeigt sind die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen gegen die E-Cadherin EC5 (DECMA-1) und den SNAP-tag jeweils zweier Fokusebenen. Die Lage der Ecad-MS sind in Fokusebene 1, die der Lipidlayer in Fokusebene 2 gezeigt. Pfeile deuten auf Ecad-MS, die eine Rhodaminfärbung aufweisen. Pfeilspitzen markieren Löcher in den Lipidlayern.

MS konnten mit rhEcad-Fc beschichtet werden. Eine Tendenz der Ecad-MS an E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten NTA-Lipidlayern bevorzugt zu binden, konnte nicht festgestellt werden, da die Lipidlayer durch die Behandlung mit Ecad-MS beschädigt wurden.

5.5.2 Zelladhäsion auf hsEcad1-5-SNAP-His12 beschichteten Oberflächen

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität des an Oberflächen gebundenen hsEcad1-5 wurden Zelladhäsionsassays durchgeführt. Dies erfolgte mit Zelllinien die endogen kein bzw. nur geringfügig E-Cadherin exprimieren. Diese Zelllinien wurden mit E-Cadherin stabil transfiziert. Als Kontrollen dienten die nicht transfizierten Ausgangszelllinien. Im Adhäsionsassay wurden L-Zellen (L-Zellen, L-1-1-Uvo-Zellen, EcadEGFP-L-Zellen) und HeLa-Zellen (HeLa, EcadEGFP-HeLa) eingesetzt. L-1-1-Uvo-Zellen enthalten stabil transfiziert murines E-Cadherin (Uvomorulin) (Ozawa & Kemler, 1990). Bei den EcadEGFP-Zellen handelt es sich um stabil mit humanem E-Cadherin-EGFP transfizierte Zellen. Zunächst wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung und Western-Blot-Analyse die Produktion des E-Cadherins in den transfizierten Zellen gezeigt. Abb. 5.21 zeigt L-1-1-Uvo- und L-Zellen nach Kultivierung auf Alzianblau beschichteten Plättchen. In L-1-1-Uvo Zellen zeigte die Immunfluoreszenzfärbung die Lokalisation von β -Catenin an den Zell-Zell-Kontakten. In L-Zellen konnte dieses Muster nicht beobachtet werden. Auch E-Cadherin konnte in L-1-1-Uvo-Zellen an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert werden. Dieses Ergebnis konnte jedoch nur mit dem DECMA-1-Antikörper, nicht aber mit dem α -E-Cadherin-Antikörper H-108 gezeigt werden. Beide Antikörper erkennen die fünfte Ektodomäne, wobei DECMA-1 ein monoklonaler und H-108 ein polyklonaler Antikörper ist. Die Färbung mit dem H-108-Antikörper führte nicht zu einer Detektion an den Zell-Zell-Kontakten, sondern zu einem punktförmigen Verteilungsmuster in den Zellen. In nicht-

transfizierten L-Zellen konnte E-Cadherin weder mit dem DECMA-1- noch mit dem H-108-Antikörper identifiziert werden. Hier fiel die Färbung generell sehr schwach und somit unspezifisch aus.

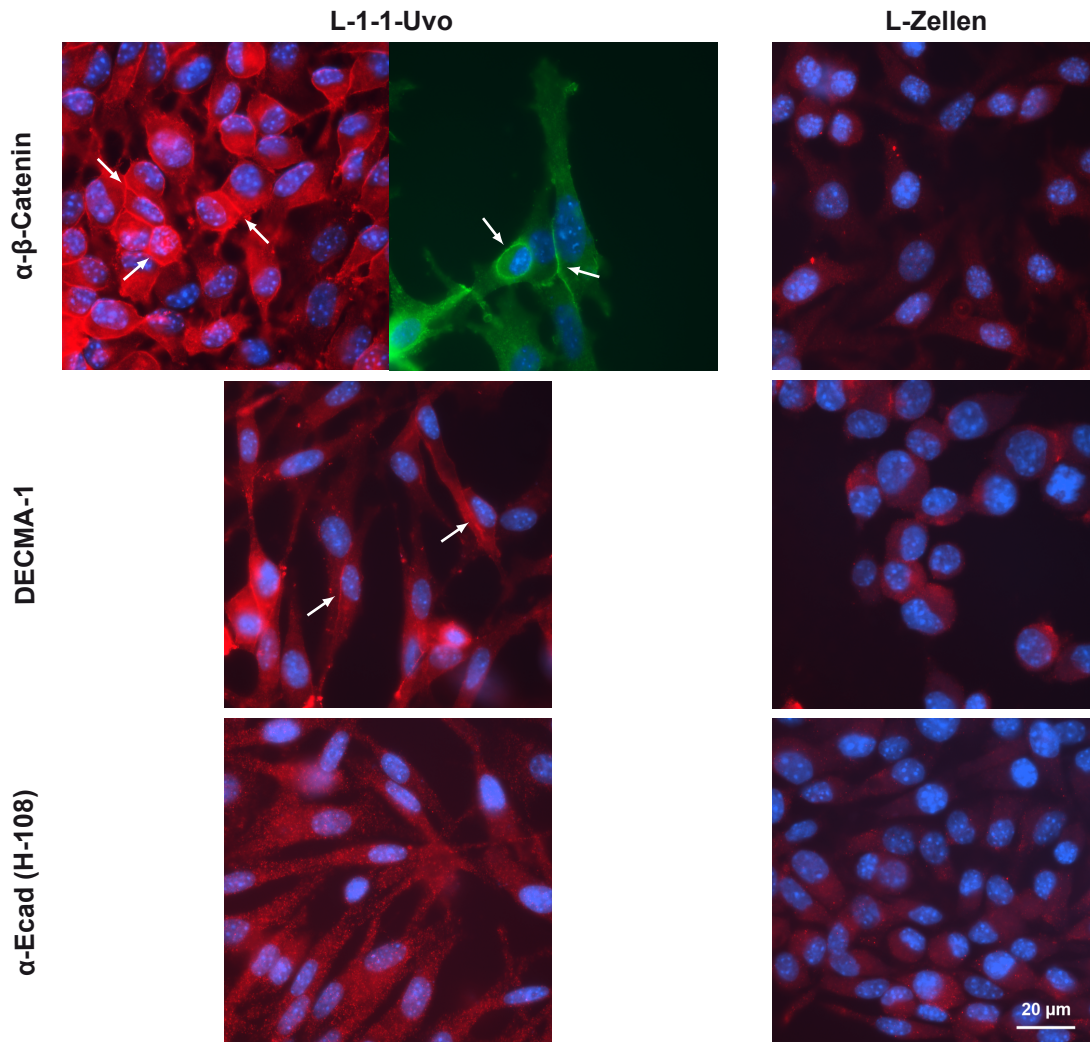


Abb. 5.21: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von L-1-1-Uvo-Zellen (stabil transfiziert mit mE-Cadherin) und L-Zellen gegen β -Catenin und E-Cadherin EC5 mit den Antikörpern DECMA-1 (monoklonal) und H-108 (polyklonal).

Die Identifizierung von E-Cadherin in HeLa-Zellen zeigte ebenfalls ein punktförmiges Verteilungsmuster (Abb. 5.22 a). Die Färbung gegen β -Catenin hingegen konnte eine Lokalisation an den Zellkontakten und im Zytoplasma aufdecken. Wurden NOP-Lysate aus L-1-1-Uvo- und L-Zellen im Western-Blot untersucht, konnte E-Cadherin nur in L-1-1-Uvo-Zellen detektiert werden (Abb. 5.22 b). Beide E-Cadherin-Antikörper, DECMA-1 und H-108, führten zu einer Bande im erwarteten Bereich von ca. 120 kDa. In NOP-

Lysaten aus EcadEGFP-L-Zellen und EcadEGFP-HeLa-Zellen war die Detektion mit dem DECMA-1-Antikörper schwach (Abb. 5.22 c). Die Bande erschien hier in der Größenordnung von ca. 140 kDa, was der Größe des Fusionsproteins E-Cadherin-EGFP entspricht. In NOP-Lysaten aus EcadEGFP transfizierten L- und HeLa-Zellen konnte mit dem H-108-Antikörper eine Bande in der Höhe von 140 kDa detektiert werden (Abb. 5.22 c).

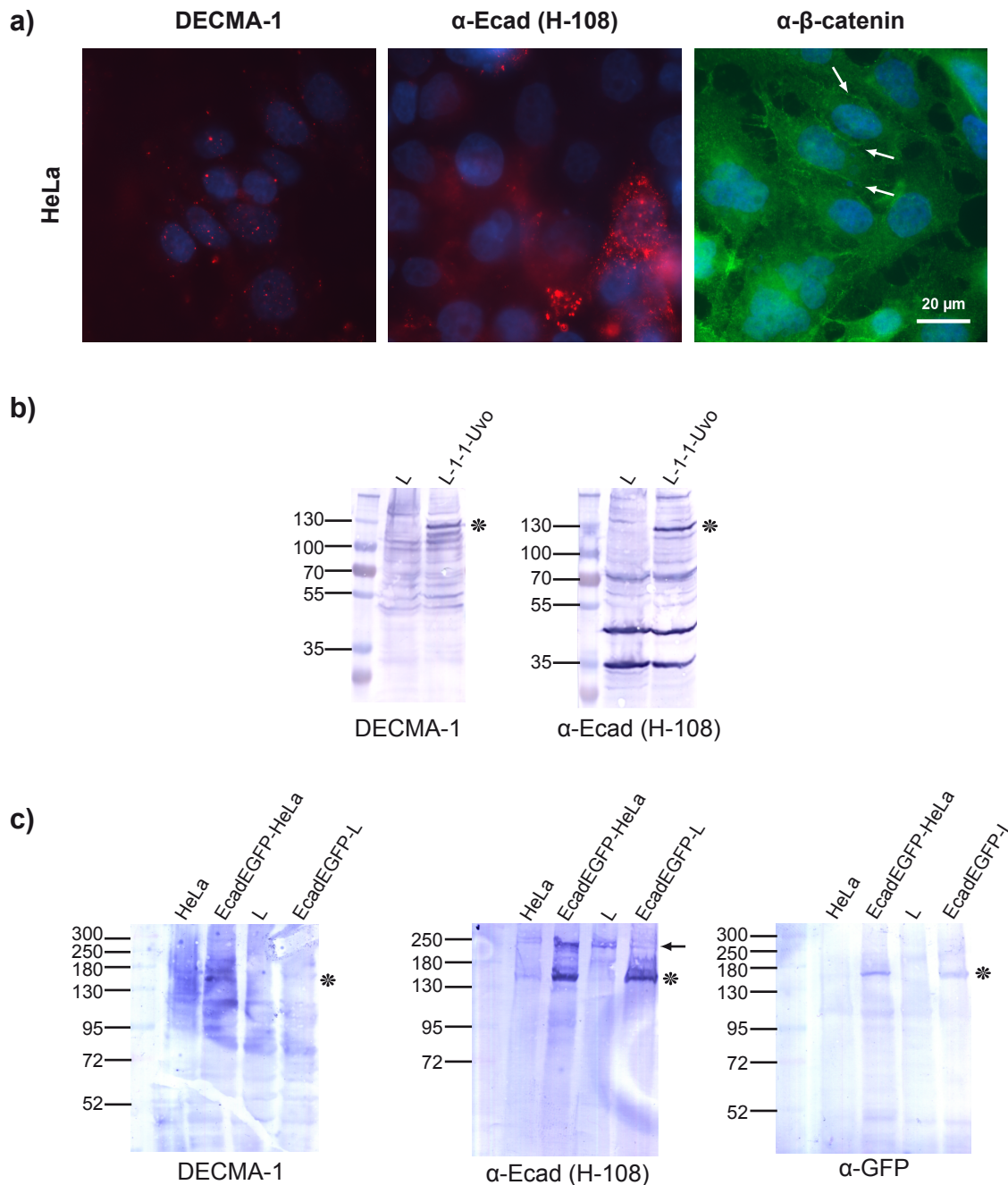


Abb. 5.22 (vorherige Seite): (a) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen gegen E-Cadherin EC5 und β -Catenin. Pfeile markieren Zell-Zell-Kontakte. Western-Blot-Analysen gegen E-Cadherin EC5 und GFP von NOP-Lysaten aus (b) L- und L-1-1-Uvo-Zellen und (c) aus EcadEGFP-HeLa- und EcadEGFP-L-Zellen und den entsprechenden nicht transfizierten Ausgangszelllinien. Detektion der Proteine im Western-Blot erfolgte mittels der AP-Methode.

Der H-108-Antikörper gegen E-Cadherin EC5 erkannte in diesen NOP-Lysaten eine zusätzliche Bande in der Größe von ca. 250 kDa. Diese Größe entspricht der eines E-Cadherin-Dimers, welches entweder aufgrund der EGFP-vermittelten Dimerisierung oder der homophilen Wechselwirkung zwischen E-Cadherin Ektodomänen zustande kommen kann. Die Detektion gegen GFP ergab eine Bande im erwarteten Bereich von 140 kDa in NOP-Lysaten aus EcadEGFP transfizierten L- und HeLa-Zellen. In Proben aus nicht transfizierten Zellen konnten keine Banden detektiert werden.

Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin EC5 und β -Catenin konnte die Expression von E-Cadherin in L-1-1-Uvo-Zellen (stabil transfiziert mit murinem E-Cadherin) bestätigt werden. Eine Immunfluoreszenzfärbung von nicht transfizierten L-Zellen hingegen ergab, dass in diesen Zellen kein E-Cadherin exprimiert wird. Die Expression von EcadEGFP in stabil transfizierten L- und HeLa-Zellen konnte mittels Western-Blot-Analysen gegen E-Cadherin EC5 und GFP aus NOP-Lysaten gezeigt werden.

Zur Überprüfung der Aktivität der an Oberflächen gebundenen E-Cadherin EC1-5 wurden die auf ihre E-Cadherin-Produktion untersuchten Zellen in Zelladhäsionsassays auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen eingesetzt. Zunächst wurden Goldoberflächen mit einer Mischung aus NTA-/MeO-EG₃-Thiol bestempelt und mit MeO-EG₃-Thiol aufgefüllt. Nach Beladung der NTA-Kopfgruppen mit Ni²⁺ wurden die SAMs mit hsEcad1-5-SNAP-His12 funktionalisiert. Nach Aussaat der L-1-1-Uvo- und L-Zellen auf diesen strukturierten Oberflächen wurde die Reaktion der Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Färbung gegen E-Cadherin EC5 mit monoklonalem DECMA-1 zeigte sowohl die Lokalisation der E-Cadherin funktionalisierten Bereiche auf den Oberflächen, als auch die E-Cadherin exprimierenden Zellen im Fall von L-1-1-Uvo-Zellen (Abb. 5.23). Während nicht transfizierte L-Zellen in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme abgerundet

erschieden, breiteten sich die transfizierten Zellen an E-Cadherin funktionalisierten Stellen aus und suchten mit ihren Zellmembranen maximalen Kontakt an den gestempelten E-Cadherin1-5-Mustern zu erzielen.

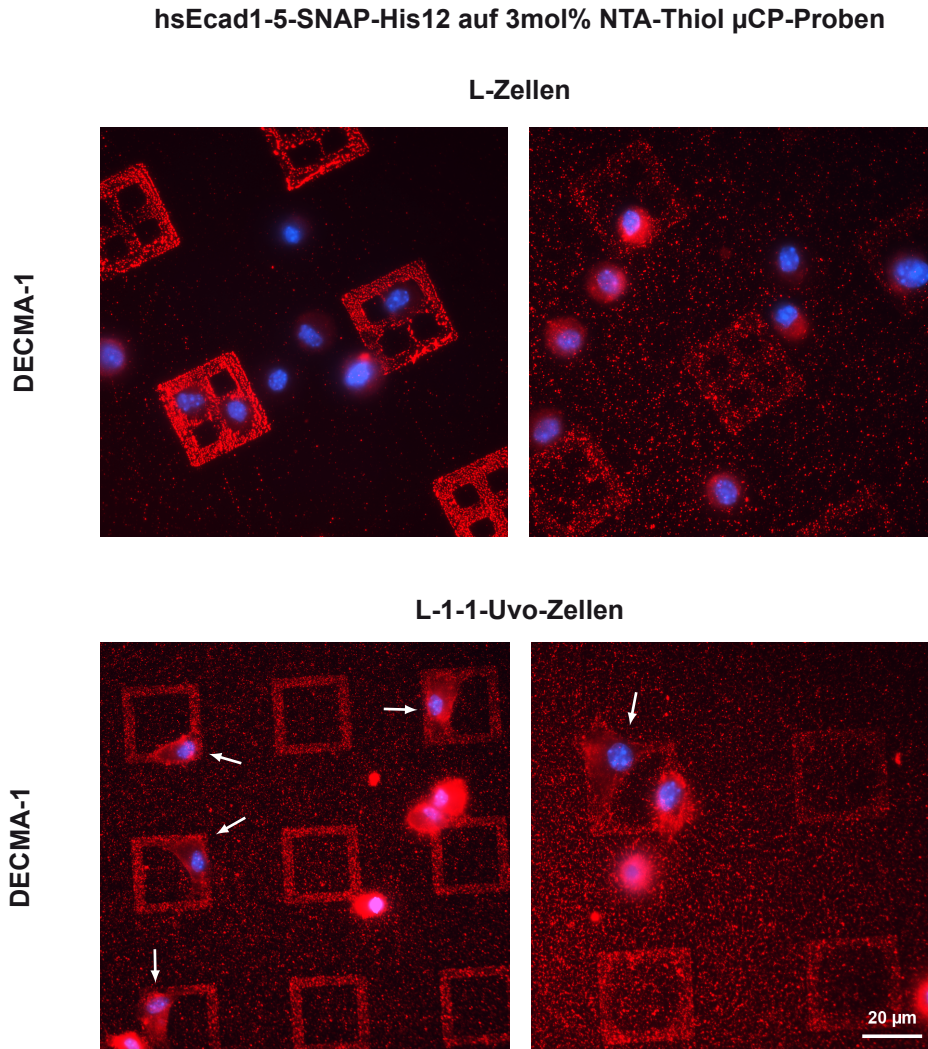


Abb. 5.23: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin EC5 mit dem polyklonalen Antikörper DECMA-1 von E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen über die Ni^{2+} -NTA-His-tag-Komplexierung nach Behandlung mit nicht transfizierten L-Zellen (Bildreihe oben) und L-1-1-Uvo-Zellen (Bildreihe unten). Pfeile in der unteren Bildreihe markieren L-1-1-Uvo-Zellen, die maximalen Kontakt zu den E-Cadherin1-5-Mustern bilden. Blau: DAPI-Färbung.

In einem weiteren Versuch wurden Oberflächen über die BG-SNAP-Bindung mit E-Cadherin EC1-5 funktionalisiert. Hierfür wurde eine 1:100-Mischung aus BG/MeO-EG₃-Thiol gestempelt und mit MeO-EG₃-Thiol aufgefüllt. Nach Bindung von hsEcad1-

5-SNAP-His12 wurden die Oberflächen mit nicht transfizierten L-Zellen und L-1-1-Uvo-Zellen behandelt (Abb. 5.24).

hsEcad1-5-SNAP-His12 auf 1:100 BG/Me-EG₃-Thiol μ CP-Proben

L-1-1-Uvo-Zellen

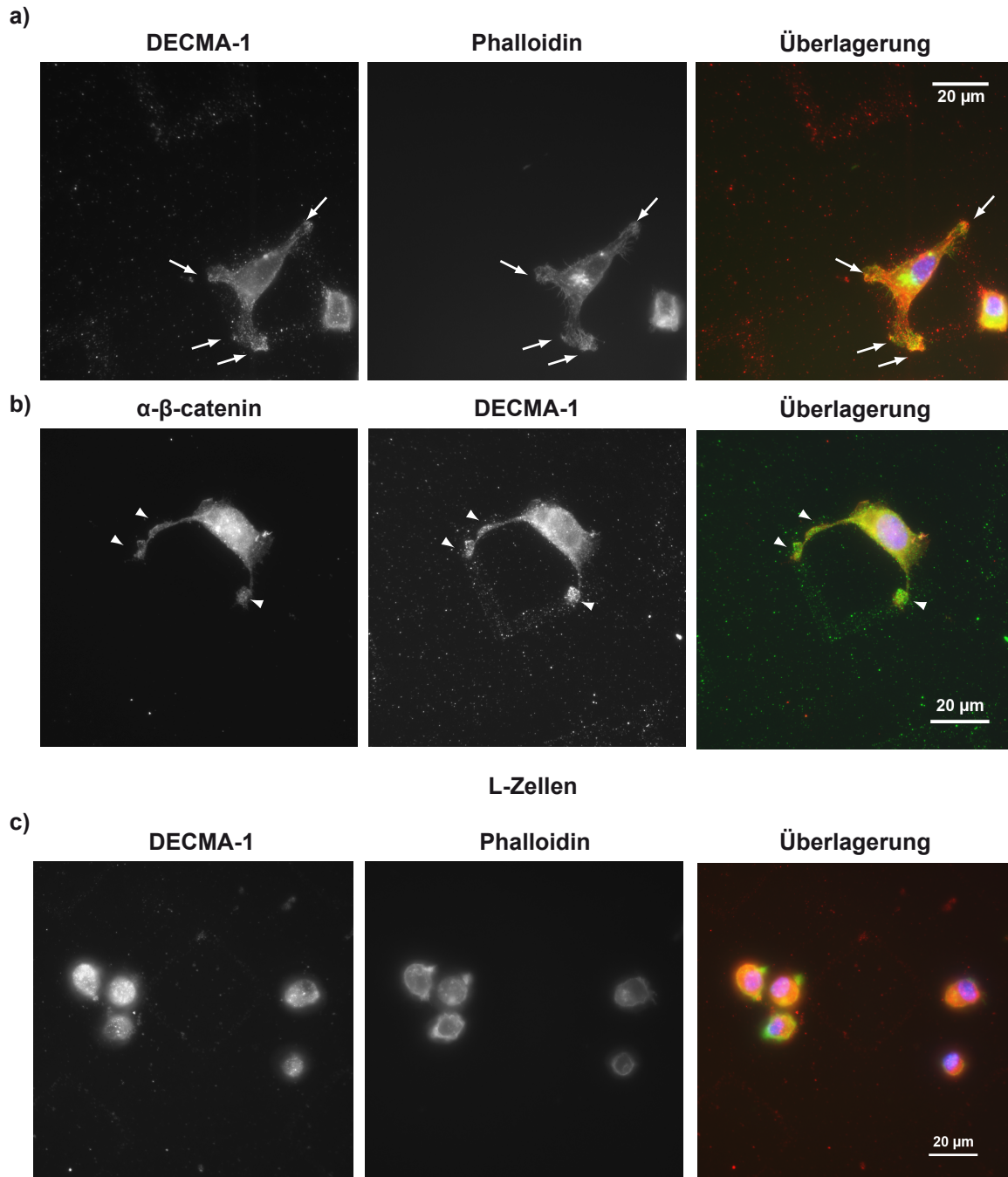


Abb. 5.24: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von nicht transfizierten L-Zellen und L-1-1-Uvo-Zellen auf E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten Oberflächen. Doppelfärbung von L-1-1-Uvo-Zellen gegen (a) E-Cadherin EC5 (DECMA-1) und das Aktin-Zytoskelett (Phalloidin) und (b) E-Cadherin EC5

und β -Catenin. Pfeile in (a) markieren Stellen, an denen die Zelle mit dem E-Cadherin-Muster in Kontakt ist. Pfeilspitzen in (b) markieren Stellen, an denen die β -Catenin-E-Cadherin Co-Lokalisation erwartet wurde. (c) Doppel-färbung von L-Zellen gegen E-Cadherin EC5 und das Aktin-Zytoskelett. Blau: DAPI-Färbung

Eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung deckte die Bindung der L-1-1-Uvo-Zellen an E-Cadherin funktionalisierten Mustern auf, während nicht transfizierte Zellen abgerundet erschienen (vergleiche Abb. 5.24 a und b mit c). L-1-1-Uvo-Zellen breiteten sich auf den Mustern aus und versuchten maximalen Kontakt zu E-Cadherin-Mustern herzustellen. Nicht transfizierte L-Zellen zeigten keine bevorzugte Bindung an E-Cadherin-Mustern. Diese Zellen waren abgerundet. L-1-1-Uvo-Zellen, die auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen gebunden hatten, wurden einer Doppelfärbung gegen E-Cadherin und Aktin unterzogen. Die Doppelfärbung ergab eine Co-Lokalisation von E-Cadherin an den Enden des Aktin-Zytoskeletts an Stellen, wo die Zelle den Kontakt mit Oberflächen gebundenem E-Cadherin aufnimmt (Pfeile in Abb. 5.24 a).

Da β -catenin eine Komponente des Adhäsionskomplexes von E-Cadherin ist, wurde eine Doppelfärbung gegen β -Catenin und E-Cadherin durchgeführt. In einer ersten Analyse sollte so eine Co-Lokalisation von β -Catenin und E-Cadherin nachgewiesen werden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen konnten keine genaue Co-Lokalisation von β -catenin und E-Cadherin auf Oberflächen gebundenen E-Cadherin zeigen. Pfeilspitzen in Abb. 5.24 b markieren Bereiche, in denen eine Co-Lokalisation von β -catenin und E-Cadherin erwartet wurde.

Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass mit murinem E-Cadherin stabil transfizierte L-1-1-Uvo-Zellen an E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten Flächen spezifisch binden und maximalen Kontakt zu den E-Cadherin-Mustern bilden. Im Gegensatz hierzu erschienen L-Zellen auf diesen Oberflächen abgerundet. Unabhängig von der Methode der E-Cadherin-Funktionalisierung, Ni^{2+} -NTA-His-tag-Komplexierung oder BG-SNAP-Bindung, konnte somit eine E-Cadherin spezifische Adhäsion von Zellen gezeigt werden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden EcadEGFP-L-Zellen und EcadEGFP-HeLa-Zellen auf E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten Oberflächen untersucht. Hierfür wurden die über die BG-SNAP-Bindung mit E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten Oberflächen mit EcadEGFP-L-Zellen bzw. EcadEGFP-HeLa-Zellen inkubiert und anschließend eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin EC5 durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EcadEGFP-L-Zellen auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen zeigten die Bindung dieser Zellen an E-Cadherin EC1-5-Mustern (Abb. 5.25). Die Morphologie der Zellen passte sich der Form an, in der E-Cadherin an die Oberflächen gebunden war. An Bereichen, an der die Zellen mit E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten Flächen in Kontakt gekommen waren konnte eine Verstärkung des EcadEGFP-Signals aufgedeckt werden (mit Pfeilen markierte Stellen in Abb. 5.25).

hsEcad1-5-SNAP-His12 auf 1:100 BG/Me-EG₃-Thiol μ CP-Proben

EcadEGFP-L-Zellen

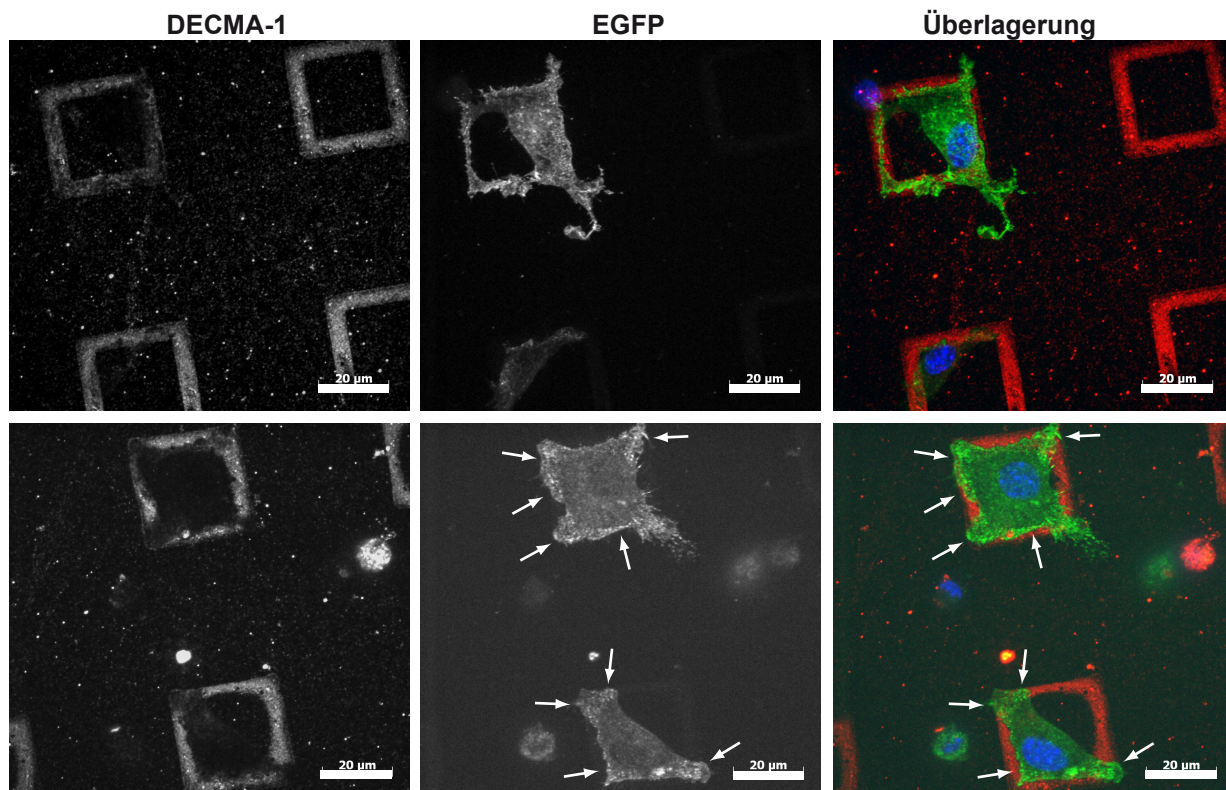


Abb. 5.25: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin EC5 von EcadEGFP-L-Zellen auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen. Fluoreszenzaufnahmen mit dem Spinning Disk

Mikroskop. Pfeile markieren Stellen, bei der eine Signalverstärkung im EGFP-Kanal detektiert wurde. Blau: DAPI-Färbung.

Dieser Effekt konnte auch sehr gut mit EcadEGFP-HeLa-Zellen gezeigt werden (Vergleiche Abb. 5.26 und 5.27 a). Die Anreicherung des EcadEGFP-Signals der Zellen führte hier zur Abbildung des Musters, in der das E-Cadherin an die Oberflächen gebunden ist. Dies ist besonders deutlich im EGFP-Kanal zu erkennen, da hier nur das Signal der zellulären E-Cadherine gezeigt wird und dieses deckungsgleich mit dem Kreuz in den Quadranten im DECMA-1 bzw. H-108-Kanal ist (Vergleiche Abb. 5.26 und 5.27 a).

hsEcad1-5-SNAP-His12 auf 1:100 BG/Me-EG₃-Thiol μ CP-Proben

EcadEGFP-HeLa-Zellen

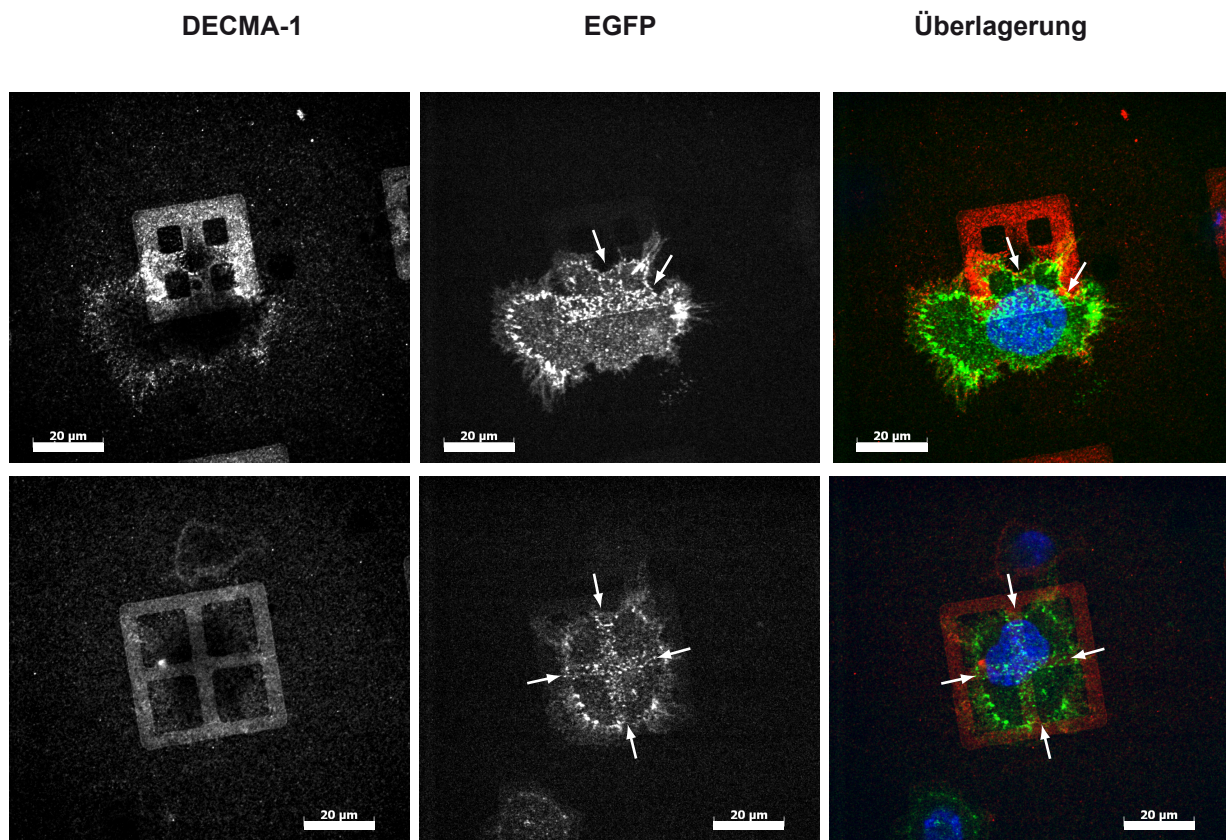


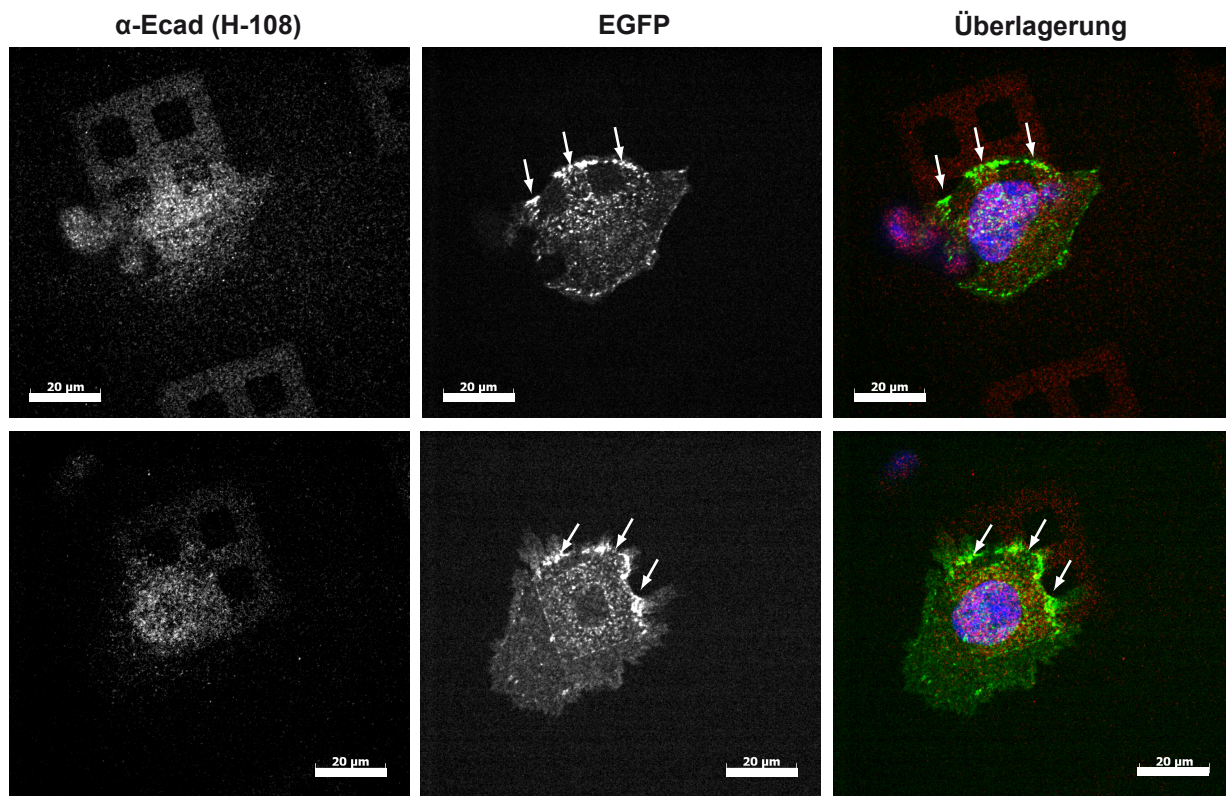
Abb. 5.26: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin EC5 mit dem monoklonalem DECMA-1-Antikörper von EcadEGFP-HeLa-Zellen auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen. Fluoreszenz-aufnahmen erhalten am Spinning Disk Mikroskop. Pfeile markieren Stellen, bei der eine Signalverstärkung im EGFP-Kanal detektiert wurde. Blau: DAPI-Färbung.

Während EcadEGFP-L-Zellen mit dem monoklonalen DECMA-1-Antikörper nicht angefärbt werden konnten, konnten EcadEGFP-HeLa-Zellen sowohl mit monoklonalen DECMA-1- und polyklonalen H-108-Antikörper angefärbt werden. DECMA-1- und H-108-Färbung zeigten unterschiedliche Färbungsmuster. Die DECMA-1-Färbung war ausschließlich an den Zellrändern zu sehen, während die H-108-Färbung gleichmäßig über der ganzen Zelle verteilt war. (Vergleiche DECMA-1- mit H-108-Kanal in Abb. 5.26 und 5.27 a).

hsEcad1-5-SNAP-His12 auf 1:100 BG/Me-EG₃-Thiol μ CP-Proben

a)

EcadEGFP-HeLa-Zellen



b)

Kontrolle

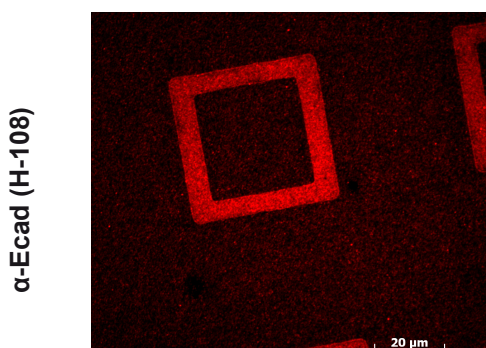


Abb. 5.27: (a) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von EcadEGFP-HeLa-Zellen gegen E-Cadherin EC5 mit dem polyklonalen H-108-Antikörper. (b) Exemplarische Abbildung einer E-Cadherin funktionalisierten Oberfläche, die mit nicht transfizierten HeLa-Zellen

behandelt wurde. Fluoreszenzaufnahmen erhalten am Spinning Disk Mikroskop. Blau: DAPI-Färbung.

Nach der Behandlung E-Cadherin EC1-5 funktionalisierter Oberflächen mit nicht transfizierten HeLa-Zellen konnten nach einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung keine Zellen auf den Oberflächen detektiert werden. Es konnten nur die E-Cadherin funktionalisierten Flächen gesehen werden (Abb 2.27 b).

Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen zeigten die E-Cadherin spezifische Bindung von EcadEGFP-L- und EcadEGFP-HeLa-Zellen auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen. Dabei zeigten EcadEGFP-L-Zellen eine ausgeprägte morphologische Anpassung an die E-Cadherin-Muster. Bei den EcadEGFP-HeLa-Zellen konnte eine Akkumulation des EcadEGFPs an Oberflächen mit E-Cadherin-Mustern gezeigt werden.

In einem weiteren Experiment sollte das Verhalten von HEK293-Zellen auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen untersucht werden. Hierfür wurden Goldoberflächen mit einer 1:100-Mischung BG-/MeO-EG₃-Thiol bestempelt und mit MeO-EG₃-Thiol aufgefüllt. Nach Bindung des hsEcad1-5-SNAP-His12 wurden die Oberflächen mit HEK293-Zellen behandelt. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen dieser Oberflächen gegen E-Cadherin EC5 zeigten, dass die HEK293-Zellen auf E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten Bereichen sitzen aber überwiegend abgerundet sind (Abb. 5.28 a). Wenn HEK293-Zellen ausgebreitet an funktionalisierten Flächen sitzen, so konnte im DECMA-1-Kanal keine Signalverstärkung an den Bereichen registriert werden, an denen die Zellen in Kontakt mit Oberflächen gebundenem E-Cadherin sind. Ausgebreitete Zellen hatten viele Filopodien. Die E-Cadherin-Färbung der Zellen war punktförmig über den Zellkörper verteilt und nicht in den Filopodien lokalisiert (Vergleiche DECMA-1- und Phalloidin-Kanal). Eine Western-Blot-Analyse des NOP-Lysats aus HEK293-Zellen zeigte eine sehr schwache Bande im Bereich der für E-Cadherin erwarteten Größe von ca.120 kDa (Abb. 5.28 b).

Durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass HEK293-Zellen unabhängig von den E-Cadherin-Mustern auf funktionalisierten Oberflächen haften bleiben. In der Färbung des Aktin-Zytoskeletts war eine ausgeprägte Filopodienbildung zu erkennen. In den Filopodien war keine E-Cadherin-Färbung lokalisiert.

hsEcad1-5-SNAP-His12 auf 1:100 BG/Me-EG₃-Thiol μ CP-Proben

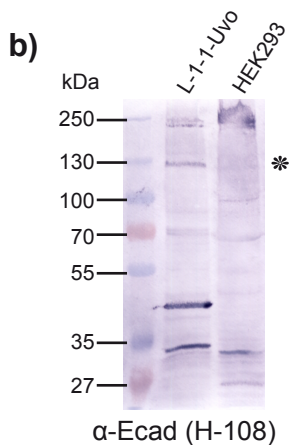
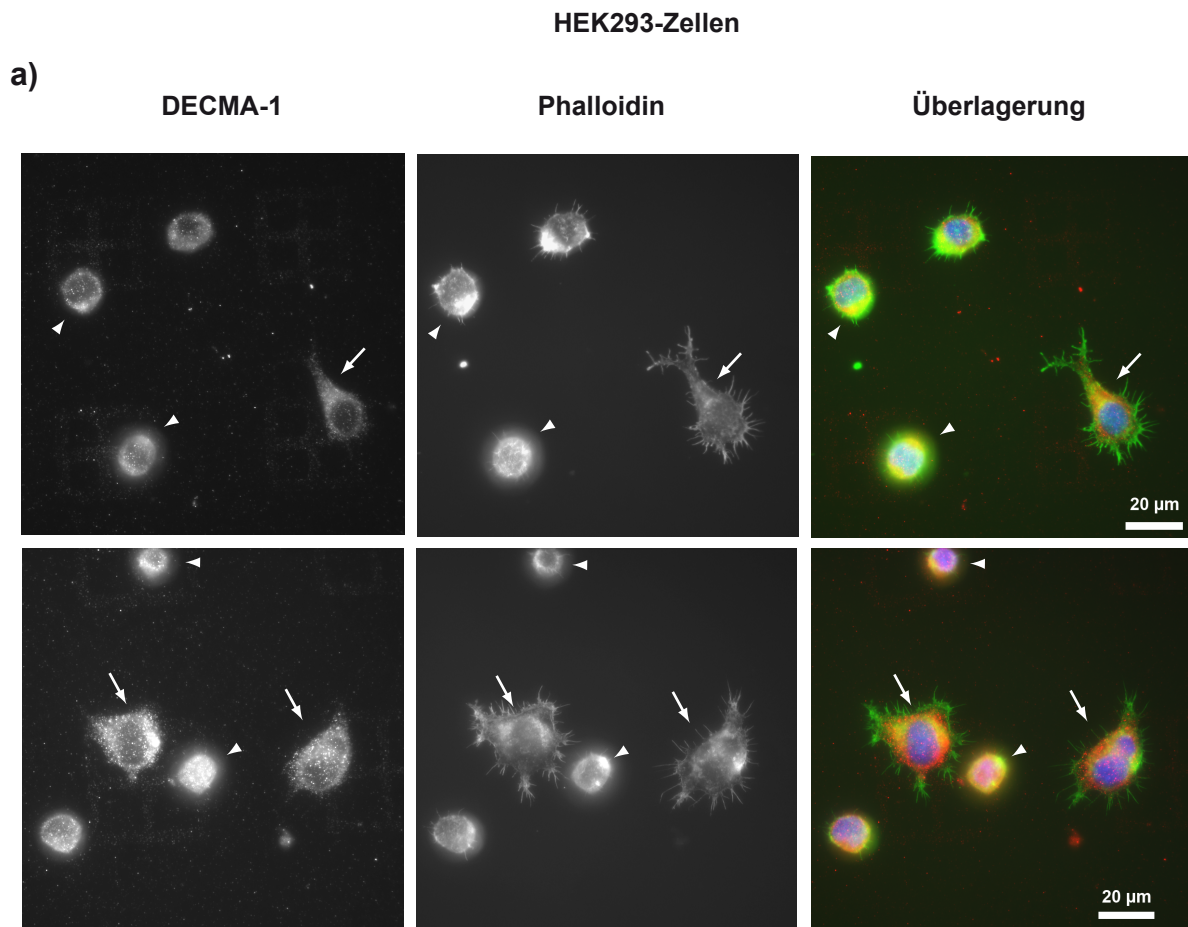


Abb. 5.28: (a) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von HEK293-Zellen auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen. Doppelfärbung gegen E-Cadherin EC5 und Aktin-Zytoskelett. Abgerundete Zellen sind mit Pfeilspitzen, Zellen die Filopodien aufweisen mit Pfeilen markiert. Färbung der E-Cadherin-Muster auf Oberflächen sehr schwach. (b) Western-Blot-Analyse von NOP-Lysaten aus HEK293- und L-1-1-Uvo-Zellen als Kontrolle. Das

Stemchen markiert die Höhe der erwarteten Bande für E-cadherin. Western-Blot-Analyse wurde mittels AP-Methode durchgeführt.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine kovalente und gerichtete Bindung von humanen E-Cadherin Ektodomänen unter Erhalt ihrer adhäsiven Eigenschaften an strukturierten Oberflächen erzielt. Die kovalente Bindung wurde durch das BG-SNAP-tag System etabliert. Dabei lagen die Herausforderungen in der Etablierung von Thiol-SAMs und Lipidlayern mit funktionellen Kopfgruppen sowie in der eukaryotischen Expression, Aufreinigung und Kopplung von E-Cadherin Ektodomänen. Diese Aspekte werden im Folgenden ausgiebig diskutiert.

6.1 Expression von E-Cadherin Ektodomänen in eukaryotischen Zellen und Aufreinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie

Die Konstrukte hsEcad1-2-SNAP und hsEcad1-5-SNAP wurden für die Untersuchung der Transfektionseffizienz von HEK293- und COS-7-Zellen eingesetzt. Da diese Konstrukte kein His-tag besitzen, sollten die Zellkulturüberstände ohne Aufreinigung über die Ni^{2+} -NTA-Säule auf die Anwesenheit der Zielproteine hin untersucht werden. Die Western-Blot-Analysen von Proben aus eingeeengten Zellkulturüberständen zeigten, dass sich nur in HEK293- aber nicht in COS-7-Zellen das gewünschte Protein nachweisen liess. Diese Zelllinienabhängigen Unterschiede im Expressionsverhalten können zwei Ursachen haben. Das gewählte Transfektionssystem kann bei verschiedenen Zelllinien unterschiedlich erfolgreich sein (von Gersdorff et al., 2006), obwohl nach Herstellerangaben TransPassTM für beide Zelllinien erfolgreich eingesetzt werden kann. Des weiteren besteht die Möglichkeit, dass der einzuschleusende Vektor den Erfolg der Transfektion bestimmt. Aufgrund der vorangehenden Ergebnisse sind HEK293-Zellen als eukaryotisches Zellsystem für die Expression von hsEcad1-5-SNAP-His12, das anschließend über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden sollte, eingesetzt worden. Das Chromatogramm der Aufreinigung zeigt einen kleinen Peak in der UV-Adsorption. Aus

Western-Blot-Untersuchungen geht hervor, dass dieser Peak mit Doppelbanden in der Höhe von 120/130 kDa korreliert, die der Größenordnung von hsEcad1-5-SNAP-His12 entspricht. Das Auftreten einer Doppelbande entspricht den Beobachtungen in der Literatur und wird mit der unvollständigen Prozessierung der E-Cadherin Ektodomäne begründet. Die zusätzliche Bande bei 130 kDa entspricht dem Propeptid, das nicht abgespalten wurde (Perez et al., 2005). Dies wurde durch Peptidsequenzierung bestätigt (M. Gentzel; unveröffentlichte Daten). Das Fusionsprotein konnte mit einem Antikörper gegen den SNAP-tag, den His-tag und gegen die fünfte Ektodomäne des E-Cadherins (H-108) erkannt werden. Dies belegt die erfolgreiche Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins hsEcad1-5-SNAP-His12. Im Gegensatz zu transient transfizierten Zellen zeigt die Aufreinigung aus Zellkulturüberständen stabil transfizierter Zellen deutlich intensivere Banden. Die Konzentrationsbestimmung belegt eine stärkere Expression in stabil transfizierten Zellen als in transient transfizierten Zellen. Aus stabil transfizierten Zellen erhält man das 2,7-fache an hsEcad1-5-SNAP-His12 als aus transient transfizierten Zellen. Die stärkere Expression kann damit erklärt werden, dass bei stabil transfizierten Zellen der Anteil transfizierter Zellen größer ist als bei transient transfizierten Zellen. In der Literatur ist die eukaryotische Expression und Aufreinigung verschiedener Cadherin Ektodomänen als Fc-Fusionsprotein beschrieben. C-Cadherin EC1-5-Fc wurde in stabil transfizierten CHO-Zellen exprimiert und über Protein A aufgereinigt (Chappius-Flament et al., 2001). Hier werden aus einem Liter Zellkulturüberstand etwa 0,5 bis 1 mg C-Cadherin-Fc gewonnen. Lambert et al. beschreiben die Expression von N-Cadherin EC1-5-Fc in HEK293-Zellen (Lambert et al., 2000). Die Aufreinigung erfolgt hier über Protein G und liefert etwa 1 mg N-Cadherin-Fc aus einem Liter Zellkulturüberstand. Gereinigtes hsEcad1-5-SNAP-His12 enthält noch Verunreinigungen, wie aus der Silberfärbungen nach elektrophoretischer Auftrennung von Elutionsfraktionen zu entnehmen ist. Bei der Konzentrationsangabe des hsEcad1-5-SNAP-His12 muss dies berücksichtigt werden. Unter Berücksichtigung dieser Verunreinigungen stimmt die ermittelte hsEcad1-5-SNAP-His12 Ausbeute von 1,65 mg aus 400 ml-Zellkulturüberstand mit den Literaturwerten in etwa überein. Eine genauere Aussage kann jedoch nicht getroffen werden, da der Anteil der

Verunreinigungen am Gesamtproteinanteil nicht bekannt ist. Für die Bindung des hsEcad1-5-SNAP-His12 über die BG-SNAP-Bindung an Oberflächen sind Verunreinigungen mit anderen Proteinen nicht von Bedeutung. Da die BG-SNAP-Bindung sehr spezifisch verläuft, wird in der Literatur die Bindung SNAP-getaggtter Proteine an Oberflächen sogar aus Zelllysaten direkt beschrieben (Kindermann et al., 2003). SAMs aus Passivierungsthiolen zeigen jedoch, im Widerspruch zu Literaturangaben (Mrksich et al., 1995), unspezifische Proteinadsorption, die in Gegenwart von Restkontaminationen immer zu beobachten sind (persönliche Mitteilung von Dr. Alexander Welle). Um diese Restadsorption an SAMs aus Passivierungsthiolen so gering wie möglich zu halten, wurde daher eine Vorreinigung des hsEcad1-5-SNAP-His12 über die Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie für lohnenswert gehalten.

6.2 BG-Thiol enthaltende SAMs lassen sich für die Funktionalisierung mit SNAP-getaggtten Proteinen herstellen

Während die Immobilisierung von Peptiden und Oligonukleotiden erfolgreich mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden kann (Köhn, 2009), bleibt die Immobilisierung von Proteinen noch immer eine große Herausforderung. Der Erhalt der Proteinfunktionalität nach der Immobilisierung ist für biologische Anwendungen von großer Bedeutung und daher erwünscht. Die Proteinfunktionalität ist von der korrekten Proteinfaltung und der richtigen Proteinorientierung abhängig. Methoden, die nach der Immobilisierung die korrekte Proteinfaltung beibehalten und die korrekte Orientierung des Proteins auf der Oberfläche gewährleisten, sind für biologische Anwendungen erstrebenswert, denn nur solche Methoden können proteinspezifische Ergebnisse liefern. Für die Immobilisierung von Proteinen sind vier Methoden bekannt: (1) Die nicht-spezifische Physiosorption, (2) die kovalente Immobilisierung auf chemisch aktivierten Oberflächen mittels Aldehyd-, Epoxid- und Amin-Chemie, (3) die nicht-kovalente Bindung mittels Affinitätstags und (4) die selektive kovalente Bindung durch Enzyme. Während die Methoden (1) und (2) zu einer willkürlichen

Orientierung der Proteine führen, kann die Orientierung des Proteins mit der Methode (3) gezielt beeinflusst werden. Durch die Produktion von Fusionsproteinen, die in Bakterien oder eukaryotischen Zellen produziert werden, kann ein Affinitätstag N- oder C-terminal mit jedem Zielprotein verknüpft werden. Neben dem His-tag, einer Sequenzfolge von 6 bis 12 Histidin-Gruppen (Dietrich et al., 1995; Gamsjäger et al., 2004; Kato et al., 2005) ist die Fc-Domäne des Immunglobulins (Baumgartner et al., 2000, Prakasam et al., 2006) als nicht-kovalent bindender Affinitätstag weit verbreitet. Diese nicht-kovalenten Immobilisierungsmethoden haben den Nachteil, dass sie reversibel sind und unter bestimmten Bedingungen gelöst werden können. Die Dissoziationskonstante vom Ni^{2+} -NTA-His-tag Komplex beträgt ca. $10 \mu\text{M}$ und deutet auf eine schwache Affinität zwischen den Komponenten (Dorn et al., 1998). Je kleiner die Dissoziationskonstante ist, wie sie z. B. für die Biotin-Streptavidin-Bindung ist (ca. $10^{-6} \mu\text{M}$) (Laitinen et al., 2006), desto stärker ist die Bindung. Kovalente Bindungen bilden die stabilste Form der Immobilisierung. Für Zelladhäsionsassays ist eine stabile Immobilisierung der E-Cadherin Ektodomäne erwünscht. Baumgartner et al. zeigten für die initiale *trans*-Interaktion zwischen VE-Cadherin Ektodomänen eine schwache Affinität mit einer Dissoziationskonstante von $0,1\text{-}10 \mu\text{M}$ (Baumgartner et al., 2000). Zum Trennen einer einzelnen initialen *trans*-Interaktion benötigt man eine Kraft von $35\text{-}55 \text{ pN}$. Erst bei Verlängerung der Cadherin-Interaktionszeit wird eine Steigerung der *trans*-Interaktionskraft beobachtet, die mit einer Bindungskraft von $70\text{-}80 \text{ pN}$ korreliert (Baumgartner et al., 2000). In einer AFM-Studie wird die Annahme, dass für die Funktionalisierung mit Cadherin Ektodomänen eine kovalente Bindung notwendig ist, widersprochen. In dieser AFM-Studie wurde die ungerichtete kovalente Immobilisierung an PEG mit der Immobilisierung über die Ni^{2+} -NTA-Komplexierung zur Analyse der homophilen Interaktion zwischen Cadherin-Fragmenten verglichen (du Roure et al., 2006). Hier erhielt man bei beiden Immobilisierungsmethoden die gleichen Adhäsionskräfte. Trotz der schwachen Affinität zwischen Ni^{2+} -NTA und His-tag wurde hier durch die Cadherin-Cadherin-Interaktion der Ni^{2+} -NTA-His-tag Komplex nicht gelöst. Allerdings wurden hier keine Cadherin-Clusterungseffekte und Zugkräfte von Zellen untersucht, sondern lediglich die *trans*-Interaktionskraft von EC1-EC2 E-Cadherin Ektodomänen vermessen. Ferner muss bei einer ungerichteten Bindung

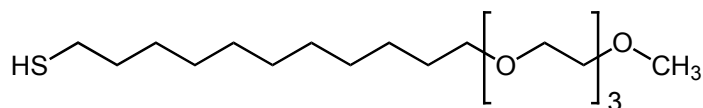
von EC1-EC2 Domänen davon ausgegangen werden, dass nur bei einem Teil der gebundenen Cadherin-Fragmente die Funktionalität erhalten geblieben ist.

Enzyme die an Zielproteinen fusioniert werden können, wurden als Tags für kovalente Proteinimmobilisierung erfolgreich eingesetzt (Hodneland et al., 2002). Für die Immobilisierung von Fusionsproteinen mit dem SNAP-tag werden Oberflächen benötigt, die mit Benzylguanin (BG), dem Substrat des SNAP-tags, beschichtet sind. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden BG-Funktionalisierungen für Proteinimmobilisierungen über die EDC/NHS-Chemie durchgeführt (Kindermann et al., 2003) oder über die zeitaufwendige Herstellung sogenannter „Polymer Brushes“ (Tugulu et al., 2005). Eine zeitsparende und einfachere Methode zur Funktionalisierung von Oberflächen mit BG ist die Verwendung von BG-terminalen Thiolen, die in dieser Arbeit gezeigt wird. Die Eigenschaft von Alkanthiolen, spontan selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) auf Goldoberflächen zu bilden, wurde hier ausgenutzt.

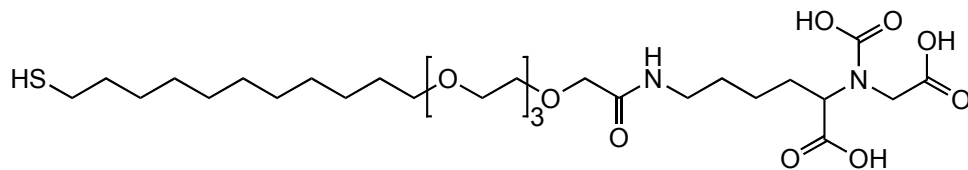
XPS-Messungen belegen die SAM-Bildung auf Goldoberflächen, die mit dem proteinadhäsionsresistentem MeO-EG₃-Thiol behandelt wurden. Mit einer Bindungsenergie von 162,1 eV für das Schwefel-Signal (S 2p_{3/2}) ist die Bindung der Schwefel-Atome in dem SAM an Gold bestätigt. Der Wert für die Bindungsenergie stimmt mit denen in der Literatur überein (Beulen et al., 1996; Joseph et al., 2003). Das Sauerstoff-Signal (O 1s) bei 533,0 eV entspricht ebenfalls den Werten aus der Literatur, die für Polymere berichtet wurden (Lopez et al., 1991). Das Kohlenstoff-Spektrum (C 1s) zeigt wie erwartet zwei Hauptkomponenten bei 284,9 und 286,7 eV. Diese korrelieren mit den Bindungsenergien für C-CH und für C-O und stimmen mit Literaturwerten überein (Beulen et al., 1996). Wurden SAMs aus einer 1:3-Mischung von BG-Thiol und MeO-EG₃-Thiol hergestellt, konnten beide Molekülsorten im SAM mittels XPS ermittelt und die SAM-Bildung bestätigt werden. SAMs dieser Mischung zeigten wie erwartet zusätzliche Signale im O 1s- und C 1s-Spektrum, die im Spektrum der MeO-EG₃-Thiol-SAMs nicht zu sehen sind. Die Komponenten bei 531,6 eV im O 1s-Spektrum und bei 288,6 eV im C 1s-Spektrum konnten der C=O-Gruppe (Lopez et al., 1991) im BG-Thiol zugeordnet werden und waren im Spektrum des MeO-EG₃-Thiol-SAMs nicht zu sehen. Bei dem gemischten SAM erscheint zusätzlich ein Stickstoff-Signal (N 1s), das die Anwesenheit des BG-Thiols bestätigt. Das N 1s-

Spektrum setzt sich aus einem Multiplett mit den Komponenten bei 398,7 und 400,3 eV zusammen. Diese Werte korrelieren mit C-N=C und C-N-H/O=C-N-H und entsprechen denen der Literatur (Rouxhet et al., 2008). Geringere BG-Thiol-Konzentrationen in SAMs (z. B. 1:100-Mischung), die für die Anwendung in der μ CP-Methode erfolgreich eingesetzt wurden, konnten aufgrund der Nachweisgrenze der XPS-Methode nicht detektiert werden. Die Existenz des BG-Thiols in SAMs aus 1:100-Mischungen wurde jedoch mit ToF-SIMS-Messungen belegt.

Winkelaufgelöste XPS-Messungen ergaben für MeO-EG₃-Thiol-SAMs eine Schichtdicke von 2,2 nm. Die Struktur des MeO-EG₃-Thiols kann Abb. 6.1 entnommen werden. Geht man von 0,15 nm je CH₂-Einheit (Bain et al., 1989) und 0,3 nm je EG-Einheit (Valiokas et al., 1999; Harder et al., 1998) aus, so erhält man als theoretische Gesamtlänge für das MeO-EG₃-Thiol-Molekül 2,7 nm. Wird eine Orientierung der Thiol-Moleküle in einem 20 bis 30° großen Winkel bezüglich der Flächennormale berücksichtigt (Porter et al., 1987), stimmt die ermittelte Schichtdicke von 2,2 nm mit dem theoretischen Wert annähernd überein. Der aus der XPS-Messung erhaltene Wert für die Schichtdicke wird durch die ellipsometrische Messung und AFM-Messung unterstützt. Hier lagen die ermittelten Werte der MeO-EG₃-Thiol-SAM-Schichtdicke bei ca. 2,2 nm für die Ellipsometrie und ca. 2 nm für die AFM.

MeO-EG₃-Thiol

NTA-Thiol



BG-Thiol

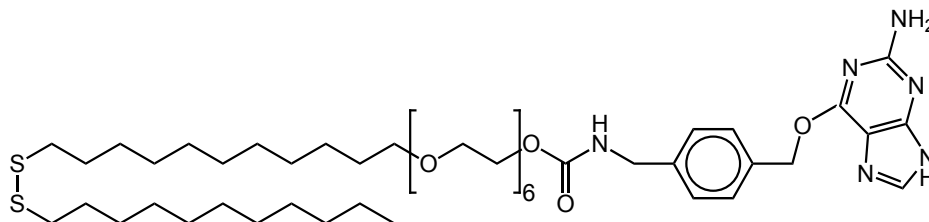


Abb. 6.1: Zusammenstellung der Thiol-Strukturen.

Mit den bereits oben angenommenen Werten für die Längen der CH_2 - und EG-Einheiten ist die ellipsometrisch ermittelte Schichtdicke von ca. 2,4 nm für ein NTA-Thiol-SAM (Struktur siehe Abb. 6.1) zu gering. Der theoretische Wert liegt bei 4 nm und wird auch in der Literatur bestätigt (Tinazli et al., 2005). Der unerwartet kleine Wert kann damit erklärt werden, dass die NTA-Thiol-SAM-Schicht bei den gemessenen Proben inhomogen war. Defekte, wie z. B. Abknicken einzelner Thiole (Abb. 6.2) in einem Thiol-SAM werden bei der Messung auch erfasst und führen zu einer geringeren Schichtdicke. Defekte in einer SAM-Schicht können verschiedene Gründe haben, u. a. unebene Goldoberflächen oder Alkylketten, die sich im SAM gefaltet haben. Eine Zusammenstellung möglicher SAM-Defekte kann Abb. 6.2 entnommen werden.

Vergleicht man die Struktur eines BG-Thiol-Moleküls (Abb. 6.1) mit der ellipsometrisch ermittelten Schichtdicke eines reinen BG-Thiol-SAMs wird deutlich, dass der SAM nicht homogen geordnet sein kann. Die ermittelte Schichtdicke für ein BG-Thiol-SAM ist kleiner als 1 nm. Da die ellipsometrische Messgrenze zwischen 1 nm und 100 μm liegt, kann dieses Ergebnis nicht aussagefähig sein. Das Ergebnis ist jedoch ein Hinweis dafür, dass aus reinem BG-Thiol kein geordneter SAM gebildet werden kann. Tatsächlich zeigen SAMs, die aus einer Mischung von BG-Thiol und MeO-EG₃-Thiol gebildet wurden, Schichtdicken zwischen 1 und 1,5 nm. Obwohl auch diese Schicht-

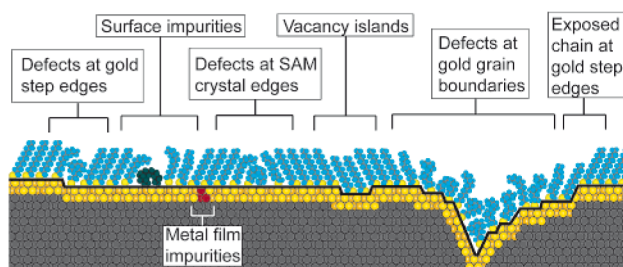


Abb. 6.2: Schematische Darstellung intrinsischer und extrinsischer Defekte an einem Alkanthiol-SAM (aus Love et al., 2005).

dicken kleiner als erwartet sind, ist ein Trend zu erkennen, bei der die SAM-Bildung durch ein zusätzliches Spacerthiol, in diesem Fall MeO-EG₃-Thiol, begünstigt wird.

Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass ein reiner BG-Thiol-SAM vergleichsweise schlecht geordnet ist, so dass die BG-Kopfgruppen durch Faltung der Moleküle in den Thiolmonolayer eingebettet sind. Tatsächlich weisen erste LEIS-Messungen (Low Energy Ion Scattering) darauf hin, dass die BG-Kopfgruppen eines BG-Thiol-SAMs nicht auf dem SAM sondern in dem SAM lokalisiert sind (persönliche Mitteilung von Dr. Michael Bruns). Durch Mischen mit einem kürzeren, nicht funktionalisierten Alkylthiol, hier MeO-EG₃-Thiol, verbessert sich durch die Van-der-Waals Wechselwirkungen der Alkylketten im SAM die Ordnung, so dass die BG-Kopfgruppen aus dem SAM herausgedrückt werden. Dieses Verhalten kann auch bei Biotin-funktionalisierten SAMs beobachtet werden (Nelson et al., 2001) (vergleiche Abb. 6.3). Ein Zustand, bei der die BG-Kopfgruppe vollständig über dem Thiol-SAM orientiert ist, wird aber nicht erhalten, da trotz Mischung mit MeO-EG₃-Thiol die SAM-Schichtdicke nicht die der reinen MeO-EG₃-Thiol-SAM-Schichtdicke entspricht. Die ellipsometrischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die BG-Kopfgruppe auf dem SAM liegt und Defekte in der SAM-Ordnung hervorruft, die in unerwartet geringen Schichtdicken resultieren. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen belegen jedoch die Bindung von His-SNAP-GFP als auch von hsEcad1-5-SNAP-His12 an den BG-Thiol bestempelten Flächen. Zieht man die erfolgreiche Bindung SNAP-getagter Proteine (His-SNAP-GFP, hsEcad1-5-SNAP-His12) an BG-SAM Oberflächen in Betracht, so kann man annehmen, dass die BG-Kopfgruppen aus dem SAM herausragen. Zu berücksichtigen ist, dass ellipsometrische Schichtdickenbestimmungen unter Luft und LEIS-Messungen im Vakuum durchgeführt werden. Wird der BG-Thiol enthaltende SAM mit Pufferlösung benetzt, können die BG-Kopfgruppen solvatisiert werden und sind frei zugänglich für die Reaktion mit dem SNAP-tag.

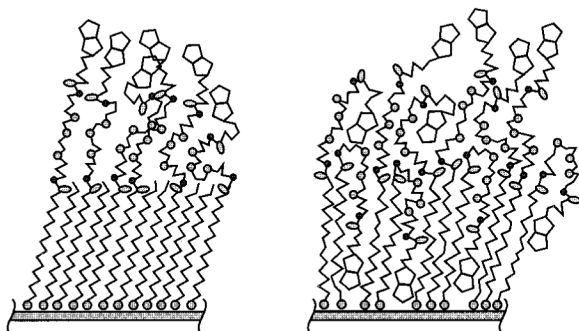


Abb. 6.3: Schematischer Aufbau eines gemischten Thiol-SAMs aus Biotin-terminalem Alkylthiol und einem Spacerthiol. Links geordneter SAM aus gemischtem SAM, rechts ungeordneter SAM aus reinem Biotinthiol (aus Nelson et al., 2001).

Die Quantifizierung von gebundenem His-SNAP-GFP mittels QCM-D-Messungen ergab Abweichungen zu den spezifischen Mustern, die sich im Fluoreszenzmikroskop und im AFM nachweisen liessen. Man würde aufgrund der im QCM-D ermittelten unspezifischen Protein-Adsorption auf reinem MeO-EG₃Thiol einen sehr viel höheren Hintergrund auf den Backfill-Arealen erwarten. QCM-D Messungen können nur an homogenen Oberflächen durchgeführt werden. Eine Unterscheidung zwischen His-SNAP-GFP und noch vorhandenen Kontaminanten aus dem Bakterienlysat kann nicht getroffen werden. Dies erklärt zum einen die geringe Zunahme von Proteinbindung zwischen reinem MeO-EG₃-Thiol und der 1:100-Mischung BG- und MeO-EG₃-Thiol und zum anderen die hohen Standardabweichungen (siehe Abb. 5.13 a). Die Abnahme an gebundenem Protein zwischen reinem BG-Thiol und der 1:10-Mischung BG- und MeO-EG₃-Thiol hingegen lässt sich einerseits erklären durch Fehler in BG-SAMs (siehe Abb. 6.2 und 6.3). Andererseits könnte durch die alleinige Präsenz spezifischer Kopplungsgruppen die unspezifische Physiosorption geringer als auf reinem MeO-EG₃-Thiol ausfallen. Insgesamt deuten die Untersuchungen auf eine geringe Passivierungseigenschaft des verwendeten MeO-EG₃-Thiols. Die proteinadsorptionsresistenz von Alkylthiolen mit terminalen EG-Einheiten ist seit langem bekannt (Prime & Whitesides, 1993; Mrksich et al., 1995). In der Literatur wird der erfolgreiche Einsatz von EG-terminierten Alkylthiolen für die Passivierung von Oberflächen gegen unspezifische Proteinadsorption und Zelladhäsion beschrieben (Mrksich et al., 1997; Herrwerth et al., 2003; Lehnert et al., 2004;). Dennoch wird in dieser Arbeit die unspezifische Adsorption von Proteinen auf SAMs beobachtet, die aus einem Thiol bestehen, das in der Literatur als proteinadsorptionsresistent beschrieben wird. QCM-D-Messungen mit SAMs aus anderen Passivierungsthiolen als das MeO-EG₃-Thiol führen immer zu einer hohen unspezifischen Proteinadsorption (persönliche Mitteilung von Dr. Alexander Welle). Dabei führt die Verwendung zusätzlicher EG-Einheiten (EG₄ bis EG₆) oder der Austausch der terminalen CH₃-Gruppe durch eine OH-Gruppe nicht zu einer Veränderung der unspezifischen Proteinadsorption auf den

jeweiligen SAMs. Um die Physisorption zu vermindern, muss eine Optimierung der SAM-Qualität hinsichtlich der Passivierungseigenschaft noch erfolgen.

6.3 BG-Lipid enthaltende Lipidlayer können mit SNAP-getaggtten Proteinen funktionalisiert werden

Phospholipide gehören zu den Hauptkomponenten biologischer Membranen. Ihre flüssig-kristalline Natur ermöglicht es ihnen sich unter physiologischen Bedingungen in zwei-dimensionalen Bilayern anzuordnen. Die Eigenschaften dieser Lipid-Bilayer sind grundlegend für verschiedene biologische Prozesse und unerlässlich für ihre biologische Funktion. So ist die Bildung von Fokalkontakten und von Zell-Zell-Adhäsionsknotenpunkten (AJ und TJ) ohne laterale Bewegungsfreiheit der jeweiligen transmembranen Proteine innerhalb der Zellmembran nicht denkbar.

Lithographisch gemusterte Phospholipidmembranen können ein Modell für die Zelloberfläche darstellen und für die Analyse von Zell-Zell-Interaktionen eingesetzt werden (Wu et al., 2004; Mossman et al., 2005). An Lipid-Bilayern gebundene Cadherine besitzen laterale Mobilität und könnten für die Analyse der Abhängigkeit der Cadherinmobilität auf die Zelladhäsion eingesetzt werden. Für diesen Zweck sind E-Cadherin-Ektodomänen über die Fc-Domäne des Immunglobulins an Glycosylphosphatidylinositol (GPI) gebundene Lipide an Lipidlayern immobilisiert worden (Perez et al., 2005).

Um Modellsysteme biologischer Membranen herzustellen kann die Dip-Pen Nanolithographie (DPN) für hoch aufgelöste Erzeugung von Membranismustern und parallele Ablagerung verschiedener Phospholipidmaterialien eingesetzt werden (Lenhert et al., 2007). Um SNAP-getaggte Proteine an BG-Lipid enthaltende Lipidlayer zu immobilisieren sind am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG) zwei BG-Lipide von Dr. Alexander Welle synthetisiert worden (Strukturen siehe Kapitel 3, Seite 23). Das BG-PEG-DOPE besitzt im Gegensatz zum BG-DOPE eine (EG)₃-Einheit zwischen der Phospholipidgruppe und der BG-Kopfgruppe. Mittels DPN können beide BG-Lipidsorten in einer Mischung mit einem Spacerlipid (DOPC) auf Glassoberflächen

als Lipidlayer abgeschieden werden. Dabei ist unter den gegebenen Bedingungen (Luftfeuchtigkeit, RT) die Abscheidung für die Mischung mit BG-PEG-DOPE effektiver als für die Mischung mit BG-DOPE. Nach Bindung des His-SNAP-GFPs an 1:1 gemischten Lipidlayern erkennt man eine stärkere Fluoreszenz in der Mischung vom BG-PEG-DOPE als in der vom BG-DOPE. Zu erklären ist diese Beobachtung durch die bessere Zugänglichkeit der BG-Gruppe für die SNAP-tag-Reaktion aufgrund des Linkers (EG₃-Einheit) zwischen der Phospholipidgruppe und der BG-Kopfgruppe. Die Bindung von hsE-Cadherin1-5-SNAP-His12 war sowohl auf BG-Lipid als auch auf NTA-Lipid enthaltenden Lipidlayern erfolgreich. Eine optimale Immunfluoreszenzfärbung gegen den SNAP-tag und das E-Cadherin lieferte die Lipid-Mischungen 1:1. Sowohl die Mischung mit BG-DOPE als auch die Mischung mit BG-PEG-DOPE zeigten in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung die Strukturen der Lipidlayer auf der Oberfläche (10 µm² Quadrate aus Linien). Mit der DPN kann eine Linienbreite von 30 nm erreicht (Piner et al., 1999) und der Abstand zwischen den Linien kann bis zu 100 nm reduziert werden (Lenhert et al., 2007). Im Vergleich hierzu sind die kleinsten Strukturen, die man mittels µCP auf Oberflächen anbringen kann, 300 nm groß (Lehnert et al., 2004). Der Vorteil der DPN gegenüber dem µCP liegt darin, dass mit der DPN eine Serie von Mustern gleichzeitig auf einem Substrat hergestellt werden kann. Dabei können Lipide oder Thiole mit unterschiedlichen funktionalen Kopfgruppen selektiv an bestimmten Bereichen abgeschieden werden (Hong et al., 1999).

Für den Funktionalitätsnachweis der an Lipidlayern gebundenen E-Cadherin Ektodomäne wurden E-Cadherin funktionalisierte Microspheres (Ecad-MS) verwendet. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass an Ecad-MS Lipide aus den oberflächengebundenen Lipidlayern nachzuweisen sind. Rhodamin markierte oberflächengebundene Lipidlayer weisen kreisförmige Flächen mit schwacher Fluoreszenzintensität auf. Man kann annehmen, dass die Ecad-MS oberflächengebundene Lipide aus den Lipidlayern herausziehen und dadurch selbst eine Rhodamin Färbung zeigen. Diese Beobachtung stellt die Anwendung von auf Oberflächen abgeschiedenen Lipidlayern für Untersuchungen von Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten in Frage. Für die Cadherin vermittelte Zelladhäsion ist

eine stabile Verankerung der Cadherin Ektodomäne wichtig. Können aber Lipide aus den Lipidlayern herausgezogen werden, ist dieses Kriterium nicht erfüllt. Zellen wären also in der Lage an Lipidlayern gebundene Cadherin Ektodomänen zu binden und durch Ausüben von Zugkraft Cadherin gebundene Lipide aus Lipidlayern herauszuziehen. Dies steht im Kontrast zu der in der Literatur gezeigten Anwendung von an Lipidlayern gebundenen E-Cadherin Ektodomäne in Zell-Assays (Perez et al., 2005). In dieser Studie wurden Lipidlayer eingesetzt, die durch Behandlung von Glasoberflächen mit E-Cadherin funktionalisierten Liposomen hergestellt wurden. Es handelt sich also um eine homogene Lipidschicht im Unterschied zu den mittels DPN erzeugten Lipid-Nanostreifen. Es kann sein, dass eine homogene Lipidschicht stabiler ist. Dies könnte erklären, warum Zellen die E-Cadherin funktionalisierten Lipidlayern nicht zerstören (Perez et al., 2005), während in der vorliegenden Arbeit allein Ecad-MS bereits die DPN Lipidlayer beschädigen.

6.4 An BG-Thiol-SAM gebundenes E-Cadherin EC1-5 ist funktional

Eine Cadherin-Funktionalisierung von Oberflächen wurde bereits erfolgreich etabliert. Es handelt sich dabei meistens um Cadherin-Ektodomänen, an die eine Fc-Einheit fusioniert ist. Cadherin-Fc-Einheiten können käuflich erworben werden. Sie wurden überwiegend über unspezifische Physiosorption auf Oberflächen aufgebracht (Gavard et al., 2004; Lambert et al., 2007). Für die Untersuchung von Cadherin- und Integrin-regulierter Migration von Epithelzellen wurde die Funktionalisierung mit E-Cadherin über direkte Bindung der Fc-gebundenen Ektodomäne mittels der EDC/NHS-Aktivierung eingesetzt (Silvestre et al., 2009). Diese Methoden der Cadherin-Funktionalisierung können zwar nicht die für die Cadherin-Funktionalität notwendige orientierte Immobilisierung gewährleisten, werden dennoch für biologische Anwendungen eingesetzt.

Um die Funktionalität der an BG-Thiol-SAM gebundenen E-Cadherin EC1-5 zu analysieren wurden verschiedene Zelllinien auf μ CP strukturierten und E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen untersucht. Im Gegensatz zu nicht-transfizierten Zellen zeigen Zellen, die nachweislich E-Cadherin exprimieren, Bindung an E-Cadherin-EC1-5 funktionalisierten Flächen. Dies kann bei L-1-1-Uvo-Zellen, stabil transfiziert

mit murinem E-Cadherin, beobachtet werden. Die Morphologie der Zellen unterscheidet sich auf Oberflächen, die über NTA-Thiol-SAMs funktionalisiert sind, von denen, die über BG-Thiol-SAMs funktionalisiert sind. Bei der E-Cadherin-Funktionalisierung über NTA-Thiol-SAMs bilden die Zellen maximalen Kontakt mit ihren Zellmembranen zu den gestempelten E-Cadherin EC1-5-Mustern. Auf über BG-funktionalisierte Oberflächen ist dies nicht so ausgeprägt zu sehen. Hier binden zwar die Zellen an die E-Cadherin EC1-5-Muster und breiten sich aus, zeigen aber keinen maximalen Kontakt. Die Funktionalisierung mit E-Cadherin EC1-5 über den His-tag an NTA-Thiol-SAMs und über den SNAP-tag an BG-Thiol-SAMs hat vermutlich Einfluss auf die Ausprägung der E-Cadherin-Erkennung zwischen oberflächengebundenem E-Cadherin und Zell-gebundenem E-Cadherin. Um diese Aussage zu kräftigen, müsste man jedoch eine Quantifizierung durchführen, bei der man eine große Anzahl von Zellen auf gleichen Mustern untersucht und die Längen der Kontakte vermisst.

EcadEGFP-L-Zellen zeigen eine starke Affinität zu E-Cadherin EC1-5-Mustern. Zellen, die auf funktionalisierten Oberflächen adhäreren, passten ihre Morphologie dem E-Cadherin EC1-5-Muster an. Hingegen waren die wenigen einzelnen Zellen, die sich auf nicht funktionalisierten Flächen abgesetzt haben, abgerundet. Besonders auffällig war die Akkumulation von EcadEGFP in Zellbereichen, die unmittelbar auf einer E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten Fläche lagen. Dies wurde in transfizierten L- und HeLa-Zellen beobachtet. Dies spricht für eine homophile Wechselwirkung zwischen Oberflächen-gebundenem E-Cadherin und membrangebundenem EcadEGFP und für einen Erhalt der Funktionalität des an BG-Thiol-SAM gebundenen E-Cadherin EC1-5. Um diese Aussage zu bekräftigen, müssten Kontrollexperimente durchgeführt werden, in denen eine Blockade homophiler Cadherin Interaktionen durch spezifische Antikörper erzielt wird. In einem solchen Experiment sollten sich Unterschiede zwischen den transfizierten L- und HeLa-Zellen ergeben. Denn im Gegensatz zu den EcadEGFP-L-Zellen breiteten sich EcadEGFP-HeLa-Zellen auch auf nicht funktionalisierten SAMs aus. Studien mit verschiedenen Zelllinien ergaben, dass L-Zellen bezüglich Oberflächen die am spezifischsten reagierenden Zellen sind (Doktorarbeit von S. Kalinina, 2007).

In der Literatur wurde die Adhäsion von Zellen auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen bereits beschrieben. Perez et al. (2005) setzten für ihre Experimente mit MCF-7-Zellen E-Cadherin funktionalisierte Lipidlayer ein. Allerdings wurden nur abgerundete Zellen vorgefunden und die Spezifität der Bindung nicht nachgewiesen. Ein Spreiten der Zellen wurde nur beobachtet, wenn E-Cadherin funktionalisierte Lipidlayer zwischen Fibronectin beschichteten Bereichen aufgebracht wurden. Das Fibronectin-Muster bestimmte zudem die Zellmorphologie. Die Ergebnisse von Perez et al. (2005) weichen von allen anderen Adhäsionsstudien auf Cadherin funktionalisierten Oberflächen ab. Wie verschiedenen Studien zu entnehmen ist, breiten sich N-Cadherin exprimierende Zellen auf homogen mit N-Cadherin-Fc beschichteten Oberflächen maximal aus. Dies wurde unter anderem mit myogenen C2-Zellen, die endogen N-Cadherin exprimieren gezeigt (Gavard et al., 2004; Lambert et al., 2007). Die Ausbreitung der Zelle induziert hier immer die Bildung von Cadherin-Kontakten in einem auffallendem radialen Muster. Die Bildung dieser N-Cadherin vermittelten Kontakte haben immer eine Akkumulation der cytoplasmatischen Bindungspartner des Cadherin-Komplexes, wie β -Catenin, α -Catenin und p120 zur Folge. In einem ersten Ansatz sollte an L-1-1-Uvo-Zellen auf E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen die Lokalisation von E-Cadherin und β -Catenin an E-Cadherin EC1-5-Mustern untersucht werden. Eine Co-Lokalisation beider Proteine sollte auch hier erwartet werden. Allerdings müssten dazu detailliertere Analysen mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden.

Für die Ausbildung der E-Cadherin vermittelten Adhäsionen wurden die Zellen zwei Stunden auf E-Cadherin funktionalisierten SAMs kultiviert. Dieser Zeitraum wurde aufgrund der bereits oben beschriebenen Studien gewählt, bei denen die N-Cadherin-Adhäsion beobachtet wird (Gavard et al., 2004; Lambert et al., 2007).

Nach Etablierung der kovalenten Bindung von E-Cadherin Ektodomänen an SAMs unter Erhalt der Funktionalität würde es sich jetzt anbieten, eine Langzeitkultivierung verschiedenster Zellen, u. a. auch Stammzellen, auf derartigen Oberflächen anzustreben.

7 Zusammenfassung

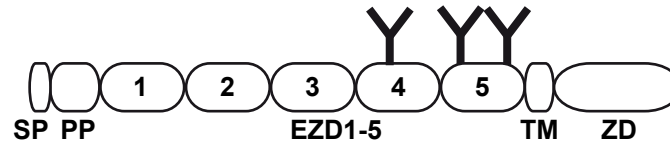
Eines der zentralen Probleme in der regenerativen Medizin und Gewebezüchtung zur gezielten Kontrolle von Zellverhalten und Zellfunktion ist die gerichtete biologische Aktivierung künstlicher Materialien mit Zell-Adhäsionsmolekülen unter Beibehaltung ihrer Funktionalität.

Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit die Ektodomäne 1-5 von E-Cadherin über die SNAP-tag Kopplungsmethode kovalent immobilisiert. Ein SNAP-tag Fusionsprotein von Ecad1-5, das zusätzlich mit einem His12-tag versehen war (Ecad1-5-SNAP-His12) wurde in HEK293-Zellen exprimiert und erfolgreich über die Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie aus Zellkulturüberständen aufgereinigt. Für die Immobilisierung über den SNAP-tag wurden Oberflächen mit Benzylguanin (BG), dem Substrat des SNAP-tags, funktionalisiert. Die Bildung homogener BG-/Spacerthiol-SAMs konnte mittels Oberflächenanalytik, wie XPS, Ellipsometrie, ToF-SIMS und AFM nachgewiesen werden. An selbst organisierten Monoschichten (SAMs) aus einer Mischung von BG-terminalem Thiol und passivierenden Spacerthiol wurden mittels Micro-Contact Printing (μCP) Muster hergestellt. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen visualisierten das immobilisierte Fusionsprotein und belegten die Immobilisierung an gemusterten BG-/Spacerthiol-SAMs über die BG-SNAP-Bindung. Um die Funktionalität der an BG-Thiol-SAM gebundenen E-Cadherin EC1-5 zu analysieren wurden verschiedene Zelllinien auf den strukturiert funktionalisierten Oberflächen untersucht. L-Zellen, die mit E-Cadherin-EGFP transfiziert waren, zeigten eine hohe Affinität zu E-Cadherin EC1-5-Mustern. Dabei passten die adhärenen Zellen ihre Morphologie dem Muster an. HeLa-Zellen, die mit E-Cadherin-EGFP transfiziert waren, breiteten sich auch auf nicht funktionalisierten Bereichen aus. Allerdings akkumulierte E-Cadherin EGFP auch in diesen Zellen auf E-Cadherin EC1-5 funktionalisierten Bereichen. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass an BG-Thiol-SAMs E-Cadherin Ektodomänen kovalent und gerichtet unter Beibehaltung ihrer Funktionalität über das SNAP-tag gemustert aufgebracht werden können.

Die Kombination der Immobilisierungen über das His-tag und über das SNAP-tag erlaubt eine gezielte Applikation unterschiedlicher Proteine, um damit das Verhalten einer Zelle gezielt zu beeinflussen.

8 Anhang

8.1 Schematischer Aufbau des E-Cadherins



Y = N-Glycan

SP = Signalpeptid

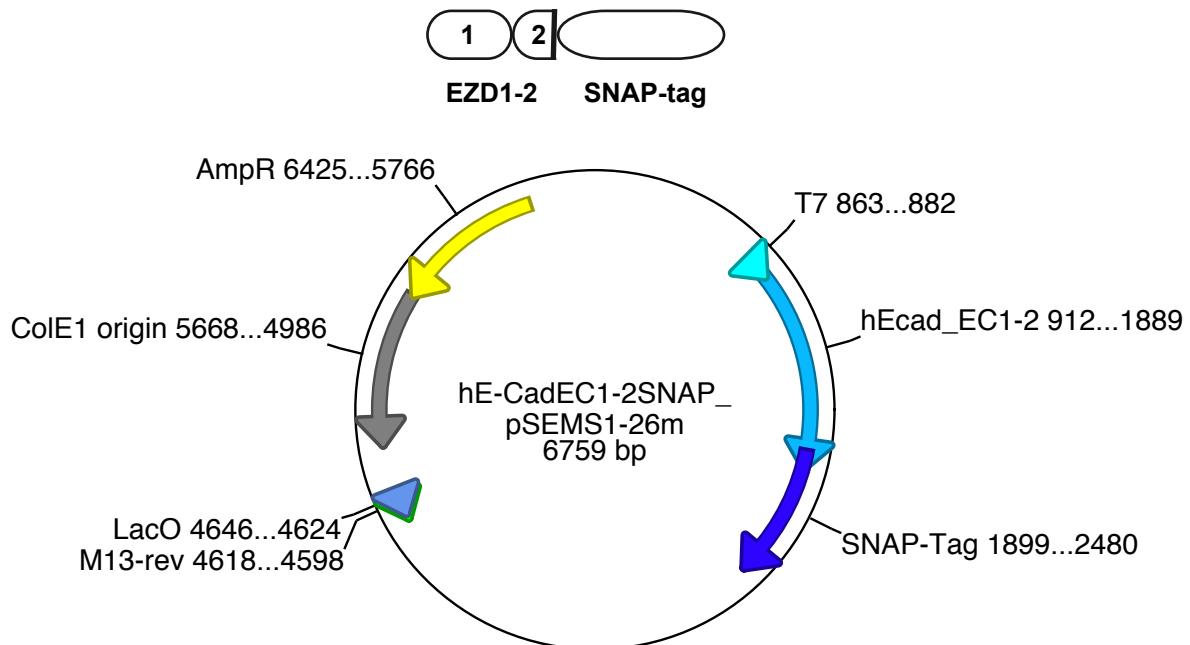
PP = Propeptid

EKD1-5 = Extrazelluläre Domänen 1-5

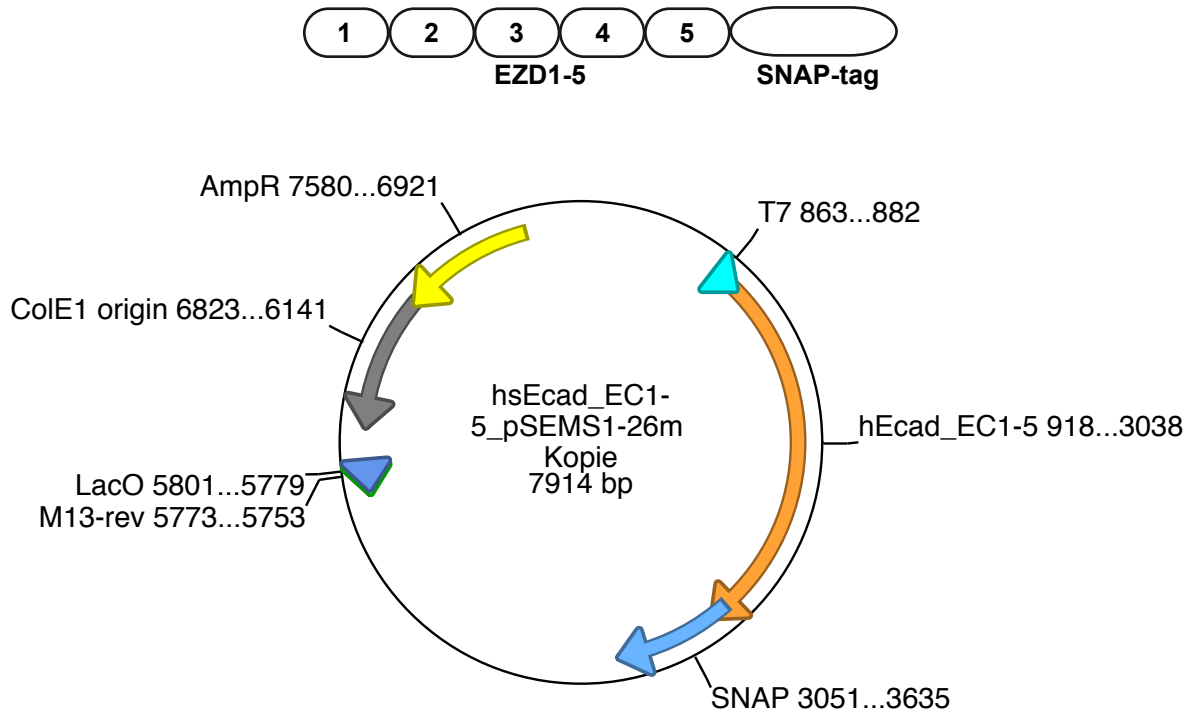
TM = Transmembrandomäne

ZD = Zytoplasmatische Domäne

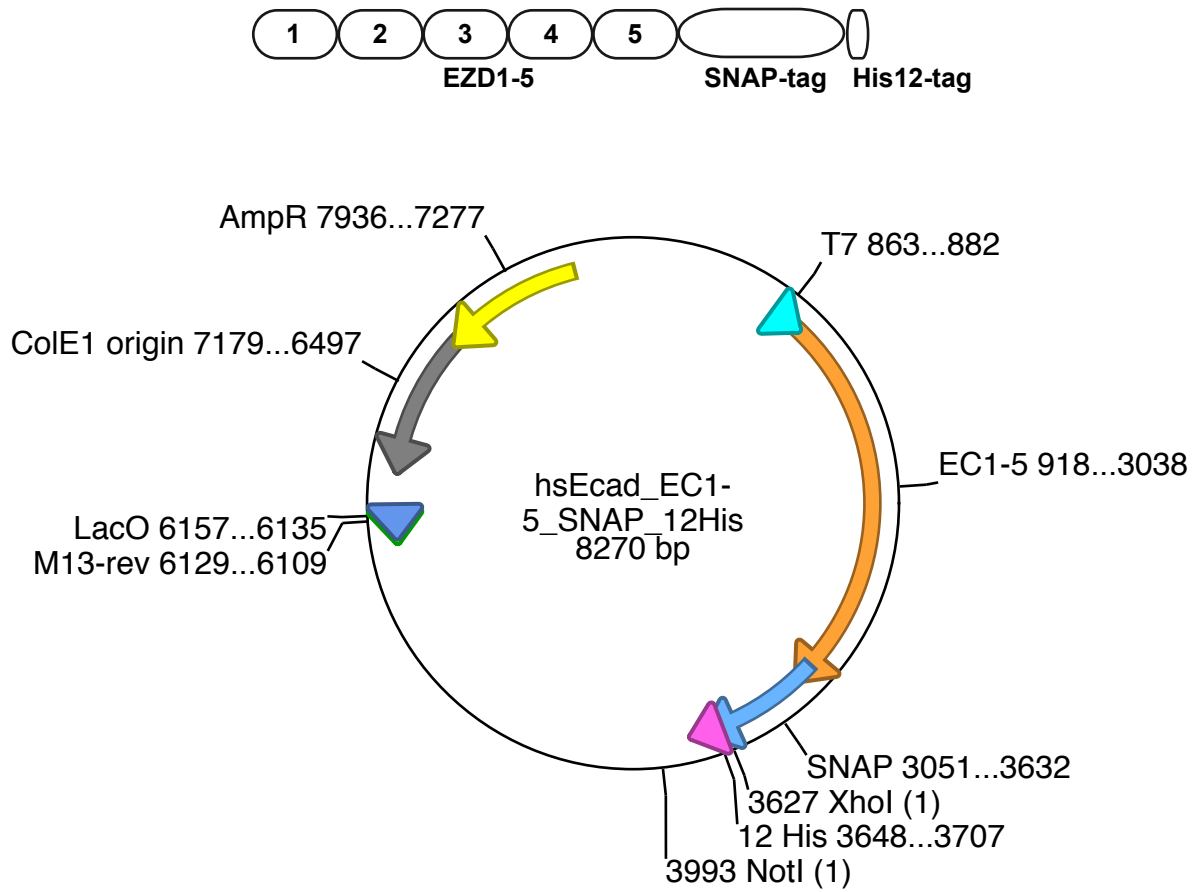
8.2 Vektorkarte für hsEcad1-2-SNAP



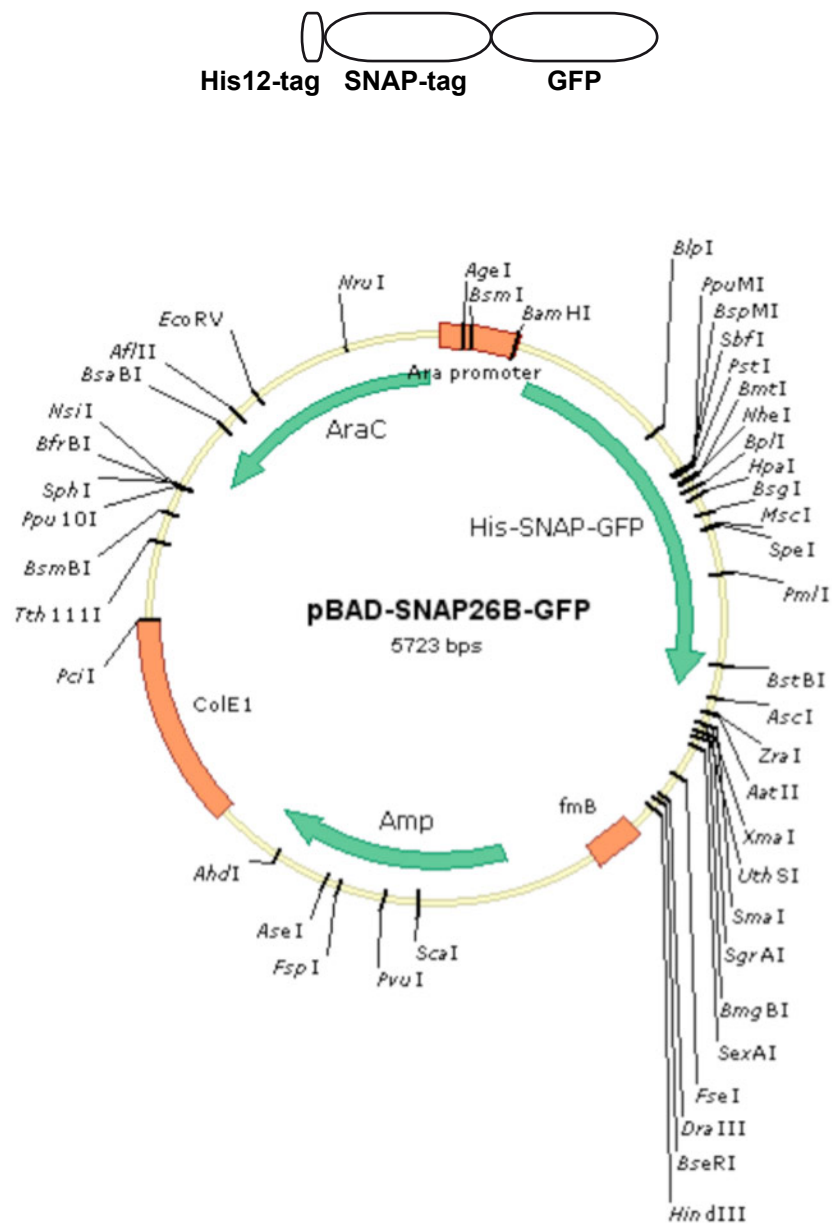
8.3 Vektorkarte für hsEcad1-5-SNAP



8.4 Vektorkarte für hsEcad1-5-SNAP-His12



8.5 Vektorkarte für His-SNAP-GFP



9 Literaturverzeichnis

- **Abe, K., Takeichi, M.** (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin-catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *PNAS* **105(1)**, 13-19.
- **Bain, C. D., Troughton, E. B., Tao, Y.-T., Evall, J., Whitesides, G. M., Nuzzo, R. G.** (1989). Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *The Journal of American Chemical Society* **111**, 321-335.
- **Bain, C. D., Whitesides, G. M.** (1989). Modeling organic surfaces with self-assembled monolayers. *Angewandte Chemie International Edition English* **28(4)**, 522-528.
- **Baumgartner, W., Hinterdorfer, P., Ness, W., Raab, W., Vestweber, D., Schindler, H., Drenckhahn, D.** (2000). Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *PNAS* **97(8)**, 4005-4010.
- **Bernard, A., Delamarche, E., Schmid, H., Michel, B., Bosshard, H. R., Biebuyck, H.** (1998). Printing patterns of proteins. *Langmuir* **14(9)**, 2225-2229.
- **Beulen, M. W. J., Huisman, B.-H., van der Heijden, P. A., van Veggel, F. C. J. M., Simons, M. G., Biemond, E. M. E. F., de Lange, P. J., Reinhout, D. N.** (1996). Evidence for nondestructive adsorption of dialkyl sulfides on gold. *Langmuir* **12**, 6170-6172.
- **Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., Shapiro, L.** (2002). C-Cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **293**, 1308-12.
- **Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Tagaki, S., Okumura, M., Fujinaga, F.** (2006). Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnology and Bioengineering* **93(6)**, 1152-1163.
- **Brieher, W. M., Yap, A. S., Gumbiner, B. M.** (1996). Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *The Journal of Cell Biology* **135(2)**, 487-496.

- **Cavalanti-Adam, E. A., Volberg, T., Micoulet, A., Kessler, H., Geiger, B., Spatz, J. P.** (2007). Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophysical Journal* **92**, 2964-2974.
- **Chappius-Flament, S. Wong, E., Hicks, L. D., Kay, C. M., Gumbiner, B. M.** (2001). Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *The Journal of Cell Biology* **154(1)**, 231-243.
- **Chen S. C., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., Ingber, D. E.** (1998). Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnology Progress* **14**, 356-363.
- **Clevers, H.** (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-480.
- **Courjean, O., Chevreux, G., Perret, E., Morel, A., Sanglier, S., Potier, N., Engel, J., Van Dorsselaer, A., Feracci, H.** (2008). Modulation of E-cadherin Monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry* **47(8)**, 2339-49.
- **Davis, M. A., Ireton, R. C., Reynolds, A. B.** (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of Cell Biology* **163(3)**, 525-534.
- **Delamarche, E., Bernard, A., Schmid, H., Bietsch, A., Michel, B., Biebuyck, H.** (1998). Microfluidic networks for chemical patterning of substrates: design and application to bioassays. *The Journal of American Chemical Society* **120**, 500-508.
- **Du Roure, O., Buguin, A., Feracci, H., Silberzan, P.** (2006). Homophilic interactions between cadherin fragments at the single molecule level: an AFM-study. *Langmuir* **22**, 4680-4684.
- **Dietrich, C., Schmitt, L., Tampé, R.** (1995). Molecular organization of histidin-tagged biomolecules at self-assembled lipid interface using a novel class of chelator lipids. *PNAS* **92**, 9014-9018.
- **Dorn, I. T., Neumaier, K. R., Tampé, R.** (1998). Molecular recognition of Histidin-tagged molecules by metal-chelating lipids monitored by fluorescence energy transfer and correlation spectroscopy. *The Journal of American Chemical Society* **120**, 2753-2763.

- **Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., Weis, W. I.** (2005). α -Catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**, 903-915.
- **Duguay, D., Foty, R. A., Steinberg, M. S.** (2003). Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Developmental Biology* **253**, 309-323.
- **du Rour, O., Buguin, A., Feracci, H., Silberzan, P.** (2006). Homophilic interactions between cadherin fragments at the single molecule level: An AFM study. *Langmuir* **22**, 4680-4684.
- **Feng, C. L., Embrechts, A., Vancso, G. J., Schönherr, H.** (2006). Reactive μ CP on ultrathin block copolymer films: Localized chemistry for micro- and nano-scale biomolecular patterning. *European Polymer Journal* **42**, 1954-1965.
- **Fick, J., Wolfram, T., Belz, F., Roke, S.** (2010). Surface-specific interaction of the extracellular domain of protein L1 with nitrilotriacetic acid-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* **26(2)**, 1051-1056.
- **Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E. M., Behrens, J., Sommer, T., Birchmeier, W.** (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology* **4**, 222-231.
- **Gamsjäger, R., Wimmer, B., Kahr, K., Tinazli, A., Picuric, S., Lata, S., Tampé, R., Maulet, Y., Gruber, H. J., Hinterdorfer, P., Romanin, C.** (2004). Oriented binding of the His₆-tagged carboxyl-tail of the L-type Ca²⁺ channel α_1 -subunit to a new NTA-functionalized self-assembled monolayer. *Langmuir* **20**, 5885-5890.
- **Gavard, J., Lambert, M., Grosheva, I., Marthiens, V., Irinopoulou, T., Riou, J.-F., Bershadsky, A., Mège, R.-M.** (2004). Lamellipodium extension and cadherin adhesion : two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *Journal of Cell Science* **117(2)**, 257-270.
- **Green, K. J., Getsios, S., Troyanovsky, S., Godsel, L. M.** (2010). Intercellular Junction Assembly, Dynamics, and Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2(2)**, a000125.

-
- **Guo, H-B., Johnson, H., Randolph, M., Pierce, M.** (2009). Regulation of homophilic cell-cell adhesion by branched N-glycosylation of N-cadherin extracellular EC2-3 domains. *The Journal of Biological Chemistry* **284(50)**, 34986-97.
 - **Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G. M., Laibinis, P. F.** (1998). Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *The Journal of Physical Chemistry B* **102**, 426-436.
 - **Herrwerth, S., Rosendahl, T., Feng, C., Fick, J., Eck, W., Himmelhaus, M., Dahint, R., Grunze, M.** (2003). Covalent coupling of antibodies to self-assembled monolayers of carboxy-functionalized poly(ethylene glycol): protein resistance and specific binding of biomolecules. *Langmuir* **19**, 1880-1887.
 - **Hodneland, C. D., Lee, Y.-S., Min, D.-H., Mrksich, M.** (2002). Selective immobilization of proteins to self-assembled monolayers presenting active site-directed capture ligands. *PNAS* **99(8)**, 5048-5052.
 - **Hong, S., Zhu, J., Mirkin, C. A.** (1999). Multiple Ink Nanolithography: Toward a Multiple-Pen Nano-Plotter. *Science* **286**, 523-525.
 - **Horton, R. C., Herne, T. M., Myles, D. C.** (1997). Aldehyd-terminated self-assembled monolayers on gold: immobilization of amines onto gold surfaces. *The Journal of American Chemical Society* **119**, 12980-81.
 - **Hoshcuetzky, H., Aberle, H., Kemler, R.** (1994). β -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *The Journal of Cell Biology* **127(5)**, 1375-1380.
 - **Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., Iwasaki, H., Hembree, M., Yin, T., Nakamura, Y., Gomei, Y., Takubo, K., Shiama, H., Matsuoka, S., Li, L., Suda, T.** (2010). Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell* **6**, 194-198.
 - **Houseman, B. T., Gawalt, E. S., Mrksich, M.** (2003). Maleimid-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips. *Langmuir* **19**, 1522-1531.

- **Huber, W., Perspicace, S., Kohler, J., Müller, F., Schlatter, D.** (2004). SPR-based interaction studies with small molecular weight ligands using hAGT fusion proteins. *Analytical Biochemistry* **333**, 280-288.
- **Ireton, R. C., Davis, M. A., Van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., Gilbert, B., Van Roy, F., Reynolds, A. B.** (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of Cell Biology* **159(3)**, 465-476.
- **Joseph, Y., Besnard, I., Rosenberger, M., Guse, B., Nothofer, H.-G., Wessels, J. M., Wild, U., Knop-Gericke, A., Su, D., Schlögl, R., Yasuda, A., Vossmeier, T.** (2003). Self-assembled gold nanoparticle/alkanedithiol films: preparation, electron microscopy, XPS-analysis, charge transport, and vapor-sensing properties. *The Journal of Physical Chemistry B* **107**, 7406-7413.
- **Juillerat, A., Gronemeyer, T., Keppler, A., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, K.** (2003). Directed evolution of O⁶-alkylguanine-DANN alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Chemistry & Biology* **10**, 313-317.
- **Kankate, L., Turchanin, A., Golzhäuser, A.** (2009). On the release of hydrogen from the S-H groups in the formation of self-assembled monolayers of thiols. *Langmuir* **25(18)**, 10435-438.
- **Kato, K., Sato, H., Iwata, H.** (2005). Immobilization of histidine-tagged recombinant proteins onto micropatterned surfaces for cell-based functional assays. *Langmuir* **21**, 7071-7075.
- **Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, K.** (2003). A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature Biotechnology* **21**, 86-89.
- **Kindermann, M., George, N., Johnsson, N., Johnsson, K.** (2003). Covalent and selective immobilization of fusion proteins. *The Journal of American Chemical Society* **125**, 7810-7811.
- **Kim, P., Lee, S. E., Jung, H. S., Lee, H. Y., Kawai, T., Suh, K. Y.** (2006). Soft lithographic patterning of supported lipid bilayers onto a surface and inside microfluidic channels. *Lab on a Chip* **6**, 54-59.

- **Kitada, T., Miyoshi, E., Noda, K., Higashiyama, S., Ihara, H., Matsuura, N., Hayashi, N., Kawata, S., Matsuzwa, Y., Tanguchi, N.** (2001). The addition of bisecting N-acetylglucosamine residues to E-cadherin down-regulates the tyrosine phosphorylation of β -catenin. *The Journal of Biological Chemistry* **276(1)**, 475-480.
- **Koch, A. W., Pokutta, S., Lustig, A., Engel, J.** (1997). Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry* **36**, 7697-7705.
- **Koch, A. W., Bozic, D., Pertz, O., Engel, J.** (1999). Homophilic adhesion by cadherins. *Current Opinion in Structural Biology* **9(2)**, 275-281.
- **Köhn, M.** (2009). Immobilization strategies for small molecule, peptide and protein microarrays. *Journal of Peptide Science* **15**, 393-397.
- **Kufer, S. K., Dietz, H., Albrecht, C., Blank, K., Kardinal, A., Rief, M., Gaub, H. E.** (2005). Covalent immobilization of recombinant fusion proteins with hAGT for single molecule force spectroscopy. *European Biophysics Journal* **35**, 72-78.
- **Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Kaibuchi, K.** (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* **281**, 832-835.
- **Laitinen, O. H., Hytönen, V. P., Nordlund, H. R., Kulomaa, M. S.** (2006). Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 2992-3017.
- **Lambert, M., Padilla, F., Mège, R.-M.** (2000). Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals. *Journal of Cell Science* **113**, 2207-2219.
- **Lambert, M., Thoumine, O., Brevier, J., Choquet, D., Riveline, D., Mège, R.-M.** (2007). Nucleation and growth of cadherin adhesion. *Experimental Cell Research* **313(19)**, 4025-4040.
- **Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., Kemler, R.** (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *PNAS* **91**, 8263-8267.
- **Lata, S., Reichel, A., Brock, R., Tampé, R., Piehler, J.** (2005). High-affinity adaptors for switchable recognition of histidine-tagged proteins. *The Journal of American Chemical Society* **127**, 10205-10215.

-
- **Latour, R. A.** (2006). Thermodynamic perspectives on the molecular mechanisms providing protein adsorption resistance that include protein-surface interactions. *Journal of Biomedical Materials Research* **78A**, 843-854.
 - **Lehnert, D., Wehrle-Haller, B., David, C., Weiland, U., Ballerstrem, C., Imhof, B. A., Bastmeyer, M.** (2004). Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *Journal of Cell Science* **117**, 41-52.
 - **Lenhert, S., Sun, P., Wang, Y., Fuchs, H., Mirkin, C. A.** (2007). Massively Parallel Dip-Pen Nanolithography of Heterogeneous Supported Phospholipid Multilayer Patterns. *Small* **3**, 71-75.
 - **Li, Z., Li, L.** (2006). Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends in Biochemical Sciences* **31(10)**, 589-595.
 - **Liwosz, A., Lei, T., Kukuruzinska, M. A.** (2006). N-glycosylation affects the molecular organization and stability of E-cadherin junctions. *The Journal of Biological Chemistry* **281(32)**, 23138-49.
 - **Lopez, G., Castner, D. G., Ratner, B. D.** (1991). XPS O 1s binding energies for polymers containing hydroxyl, ether, ketone and ester groups. *Surface and Interface Analysis* **17**, 267-272.
 - **Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., Whitesides, G. M.** (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews* **105**, 1103-1169.
 - **Metallo, C. M., Mohr, J. C., Detzel, C. J., De Pablo, J. J., Van Wie, B. J., Palecek, S. P.** (2007). Engineering the Stem Cell Microenvironment. *Biotechnol. Prog.* **23**, 18-23.
 - **Mossmann, K. D., Campi, G., Groves, J. T., Dustin, M. L.** (2005). Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science* **310**, 1191-1193.
 - **Mrksich, M., Sigal, G. B., Whitesides, G. M.** (1995). Surface plasmon resonance permit in situ measurement of protein adsorption on self-assembled monolayers of alkanthiolates on gold. *Langmuir* **11**, 4383-4385.

- **Mrksich, M., Dike, L. E., Tien, J., Ingber, D. E., Whitesides, G. M.** (1997). Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanthiolates on transparent films of gold and silver. *Experimental Cell Research* **235**, 305-313.
- **Nelson, K. E., Gamble, L., Jung, L. S., Böckl, M. S., Naeemi, E., Golledge, S. L., Sasaki, T., Castner, D. G., Campbell, C. T., Stayton, P. S.** (2001). Surface characterization of mixed self-assembled monolayers designed for streptavidin immobilization. *Langmuir* **17**, 2807-2816.
- **Nuzzo, R. G., Allara, D. L.** (1989). Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *The Journal of American Chemical Society* **105**, 4481-4483.
- **Osumi, D., Takahashi, M., Miyoshi, E., Yokoe, S., Lee, S. H., Noda, K., Nakamori, S., Gu, J., Ikeda, Y., Kuroki, Y., Sengoku, K., Ishikawa, M., Taniguchi, N.** (2009). Core fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells. *Cancer Sci*, 1-8.
- **Ozawa, M., Kemler, R.** (1990). Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *The Journal of Cell Biology* **111**, 1645-1650.
- **Ozawa, M.** (2002). Lateral dimerization of the E-cadherin extracellular domain is necessary but not sufficient for adhesive activity. *The Journal of Biological Chemistry* **277(22)**, 19600-608.
- **Patel, N., Davies, M. C., Hartshorne, M., Heaton, R. J., Roberts, C. J., Tendler, S. J. B., Williams, P. M.** (1997). Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* **13**, 6485-6490.
- **Parry, K. L., Shard, A. G., Short, R. D., White, R. G., Whittle, J. D., Wright, A.** (2006). ARXPS characterisation of plasma polymerised surface chemical gradient. *Surface and Interface Analysis* **38(11)**, 1497-1504.
- **Pece, S., Gutkind, J. S.** (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathways by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptor upon cell-cell contact formation. *The Journal of Biological Chemistry* **275(52)**, 41227-233.

- **Perez, T. D., Nelson, W. J., Boxer, S. G., Boxer, S. G., Kam, L.** (2005). E-Cadherin tethered to micropatterned supported lipid bilayers as a model for cell adhesion. *Langmuir* **21**, 11963-968.
- **Peri, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., Christofori, G.** (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **392**, 190-193.
- **Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A., Engel, J.** (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *The EMBO Journal* **18(7)**, 1738-47.
- **Piner, R. D., Zhu, J., Xu, F., Hong, S., Mirkin, C. A.** (1999). Dip-Pen Nanolithography. *Science* **283**, 661-663.
- **Prakasam, K., Maruthamuthu, V., Leckband, D. E.** (2006). Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion. *PNAS* **103(42)**, 15434-439.
- **Prime, K. L., Whitesides, G. M.** (1993). Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *The Journal of American Chemical Society* **115(23)**, 10714-10721.
- **Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R., Engel, J.** (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *European Journal of Biochemistry* **223**, 1019-1026.
- **Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., Chidsey, C. E. D.** (1987). Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of *n*-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *The Journal of American Chemical Society* **109**, 3559-3568.
- **Radice, G. L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K. A., Takeichi, M., Hynes, R. O.** (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Developmental Biology* **181**, 64-78.
- **Rouxhet, P. G., Misselyn-Baudine, A. M., Ahimou, F., Genet, M. J., Adriaensen, Y., Desille, T., Bodson, P., Deroanne, C.** (2008). XPS analysis of food products: toward chemical functions and molecular compounds. *Surface and Interface Analysis* **40**, 718-724.

-
- **Shapiro, L., Kwong, P. D., Fannon, A. M., Colman, D. R., Hendrickson, W. A.** (1995). Consideration on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *PNAS* **92**, 6793-6797.
 - **Shin, H.** (2007). Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* **28**, 126-133.
 - **Sigal, G. B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., Whitesides, G. M.** (1996). A self-assembled monolayer for the binding and study of histidin-tagged proteins by surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry* **68**, 490-497.
 - **Silin, V., Weetall, H., Vanderah, D. J.** (1997). SPR studies of the nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by self-assembled monolayers (SAMs). *Journal of Colloids and Interface Science* **185**, 94-103.
 - **Silvestre, J., Kenis, P. J. A., Leckband, D. E.** (2009). Cadherin and integrin regulation of epithelial cell migration. *Langmuir* **25(17)**, 10092-99.
 - **Smith, G. C., Livesey, A. K.** (1992). Maximum entropy: A new approach to non-destructive deconvolution of depth profiles from angle-dependent XPS. *Surface and Interface Analysis* **19**, 175-180.
 - **Spinke, J., Liley, M., Guder, H.-J., Angermaier, L., Knoll, W.** (1993). Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers. *Langmuir* **9**, 1821-1825.
 - **Steinberg, M. S., Takeichi, M.** (1994). Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *PNAS* **91**, 206-209.
 - **Stemmler, M.** (2008). Cadherins in development and cancer. *Molecular BioSystems* **4**, 835-850.
 - **Takai, Y., Nakanishi, H.** (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *Journal of Cell Science* **116(1)**, 17-27.
 - **Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireston, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K., Reynolds, A. B.** (2000). Selective uncoupling of p120^{ctn} from E-cadherin disrupts strong adhesion. *The Journal of Cell Biology* **148(1)**, 189-201.

- **Tinazli, A., Tang, J., Valiokas, R., Picuric, S., Lata, S., Piehler, J., Liedberg, B., Tampé, R.** (2005). High-affinity chelator thiols for switchable and oriented immobilization of histidin-tagged proteins: a generic platform for protein chip technologies. *Chemistry A European Journal* **11**, 5249-5259.
- **Tomschy, A., Fauser, C., Landwehr, R., Engel J.** (1996). Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *The EMBO Journal* **15(14)**, 3507-3514.
- **Tugulu, S., Arnold, A., Sielaff, I., Johnsson, K., Klok, H.-A.** (2005). Protein-functionalized polymer brushes. *Biomacromolecules* **6**, 1602-1607.
- **Valiokas, R., Klenkar, G., Tinazli, A., Reichel, A., Tampé, R., Piehler, J., Liedberg, B.** (2008). Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid groups: characterization and application. *Langmuir* **24**, 4959-4967.
- **Valiokas, R., Svehem, S., Svensson, S. C. T., Liedberg, B.** (1999). Self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol)-terminated and amide group containing alkanethiolates on gold. *Langmuir* **15**, 3390-3394.
- **Vanderah, D. J., La, H., Naff, J., Silin, V., Rubinson, K., A.** (2004). Control of protein adsorption: molecular level structure and spatial variables. *The Journal of American Chemical Society* **126**, 13639-641.
- **Vodyanik, M. A., Bork, J. A., Thomson, J. A., Slukvin, I. I.** (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* **105(2)**, 617-626.
- **Von Gersdorff, K., Sanders, N. N., Vandenbroucke, R, De Smedt, S. C., Wagner, E., Ogris, M.,** (2006). The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Molecular Therapy* **14(5)**, 745-753.
- **Woodruff, D. P.** (2008). The interface of n-alkylthiolate self-assembled monolayers on coinage metal surfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics* **10**, 7211-7221.

- **Wu, M., Holowka, D., Craighead, H. G., Baird, B.** (2004). Visualization of plasma membrane compartmentalization with patterned lipid bilayers. *PNAS* **101(38)**, 13798-803.
- **Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., Nelson, W. J.** (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin-complex. *Cell* **123**, 889-901.
- **Yap, A. S., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M.** (1998). The juxtamembrane region of the cadherin tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120^{ctn}. *The Journal of Cell Biology* **141(3)**, 779-789.
- **Yoshimura, M, Iharat, Y., Matsuzawa, Y., Taniguchi, N.** (1996). Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis. *The Journal of Biological Chemistry* **271(23)**, 13811-815.
- **Zhang, Y., Sivasanker, S., Nelson, W. J., Chu, S.** (2009). Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *PNAS* **106**, 109-114.
- **Zhao, H., Liang, Y., Xu, Z., Wang, L., Zhou, F., Li, Z., Jin, J., Yang, Y., Fang, Z., Hu, Y., Zhang, L., Su, J., Zha, X.** (2008). N-glycosylation affects the adhesive function of E-cadherin through modifying the composition of adherens junctions (AJ) in human breast carcinoma cell line MDA-MB-435. *Journal of Cellular Biochemistry* **104**, 162-175.
- **Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J., Taniguchi, N.** (2008). Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *The FEBS Journal* **275**, 1939-1948.
- **Zhou, F., Su, J., Fu, L., Yang, Y., Zhang, L., Wang, L., Zhao, H., Zhang, D., Li, Z., Zha, X.** (2008). Unglycosylation at Asn-633 made extracellular domain of E-cadherin folded incorrectly and arrested in endoplasmic reticulum, then sequentially degraded by ERAD. *Glycoconjugate Journal* **25(8)**, 727-740.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Wedlich dafür bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gab, die Welt der Biologie, in einem sehr interessantem und zukunftsorientiertem Projekt zu erforschen. Die letzten Jahre in diesem Institut haben mir bestätigt, dass die Biologie eine faszinierende, überwältigende und sehr lebendige Wissenschaft ist.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die bei dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei den Mitgliedern des Instituts für Materialforschung III bedanken: Dr. Michael Bruns, Vanessa Trouillet, Udo Geckle und Vanessa Hermann. Ich habe es jedes Mal genossen, wenn ich bei Euch im Institut war. Ohne Euch hätte es diese Arbeit nicht gegeben! Danke für die Goldbeschichtungen, XPS-Messungen und allem was dazu gehört. Es hat sehr viel Spaß gemacht mit Euch zusammen zu arbeiten!

Bei Dr. Alexander Welle bedanke ich mich herzlich für die QCM-D-Messungen und bei Dr. Clemens Franz für die AFM-Messungen an den nicht so immer einfachen SAM-Proben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des Zoologischen Instituts II. Ganz besonders erwähnen möchte ich dabei Dagmar Fichtner, Christina Deichmann, Martina Schneider, Barbara Jung, Andre Petershans, Bianca Kraft, Susanne Brentle und Claudia Winter. Danke für die fachlichen und insbesondere außerfachlichen, therapeutisch wertvollen Gespräche!!! Das Paccchy-Lab hat mein Leben bereichert!

Mein spezieller und besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Bruder. Egal was passiert, auf Euch kann ich immer zählen. Ihr seid die wichtigsten Menschen in meinem Leben und Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Publikationen

Veröffentlichung

- **Engin, S.**, Trouillet, V., Franz, C. M., Welle, A., Bruns, M., Wedlich, D. (2010). Benzylguanine thiol self-assembled monolayers for the immobilization of SNAP-tag proteins on microcontact-printed surface structures. *Langmuir* **26(9)**, 6097-6101.

Posterbeiträge

- **2nd International Symposium Interface Biology of Implants, 2006**, Rostock-Warnemünde
Fabrication of Adhesive Surfaces by Protein Coating.
Kastilan, C., **Engin, S.**, Stope, M. B., Wedlich, D.
- **CFN Summer School on Nano-Biology, 2007**, Bad Herrenalb
Nanostructured templates with specific adhesive properties.
Kalinina, S., **Engin, S.**, Gliemann, H., Schimmel, T., López-García, M., Kessler, H., Wedlich, D.
- **Frontiers Research Meeting, 2008**, Heraklion, Griechenland
Functionalization of structured surfaces with adhesive properties to study cell behaviour.
Engin, S., Kashef, J., Wedlich, D.
- **CFN Summer School on Nano-Biology, 2009**, Bad Herrenalb

Replication of cellular microenvironment.

Engin, S., Fichtner, D., Petershans, A., Kaczorowski, A., Sekula, S., Lenhert, S., Gliemann, H., Wedlich, D.

Vorträge

- **Frontiers Research Meeting, 2008**, Heraklion, Griechenland
Fabrication of structured surfaces with adhesive properties to study cell behaviour.
- **3rd International Symposium Interface Biology of Implants, 2009**, Rostock-Warnemünde
Fabrication of structured surfaces with adhesive properties to study cell behaviour

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sinem Engin
Geburtsdatum: 18.08.1976
Geburtsort: Bremen
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982-1986 Grundschule am Halmerweg, Bremen
1986-1988 Orientierungsstufe an der Pestalozzischule, Bremen
1988-1992 Sekundarstufe I an der Pestalozzischule, Bremen
1992-1995 Sekundarstufe II am Rübekamp, Bremen

Hochschulausbildung

10/1995-10/2004 Chemiestudium an der Universität Bremen
Nebenfach: Biochemie

10/2004-07/2005 Diplomarbeit: „Wechselwirkung zwischen
Liposomen und Zellen“ (Gesamtnote „gut“)

Promotion

Seit 01/2006 Zoologisches Institut II, Abteilung Zell- und Entwicklungs-
biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Sonstige berufliche Erfahrungen

- | | |
|-----------------|---|
| 03/2001-10/2003 | Landesuntersuchungsamt für Chemie, Hygiene und Veterinärmedizin in Bremen, Laborhilfskraft |
| 11/2003-06/2004 | Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit – Veterinärinstitut Oldenburg, Laborhilfskraft |
| 07/2005-12/2005 | Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und Materialforschung in Bremen, Laborhilfskraft |