

**Zelluläres Adhäsionsverhalten auf strukturierten und
biofunktionalisierten Oberflächen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von

Dagmar Fichtner

aus

Bretten

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Korreferent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2012

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie, am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Zeit von Mai 2008 bis Januar 2012 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie die wörtlich und inhaltlich übernommenen Stellen als diese kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Dagmar Fichtner, Februar 2012

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1	Zelladhäsion	1
1.1.1	Cadherine	1
1.1.1.1	Aufbau und Interaktion der klassischen Cadherine	2
1.1.1.2	E-Cadherin	5
1.2	Stammzellen	6
1.2.1	Embryonale Stammzellen	7
1.2.1.1	E-Cadherin in embryonalen Stammzellen	8
1.2.2	Stammzellen und ihre Nischen	9
1.3	Biofunktionalisierte Oberflächen	10
1.3.1	Microcontact Printing (μ CP)	11
1.3.2	SNAP-Tag Kopplung an SAMs	12
<u>2</u>	<u>Zielsetzung</u>	<u>14</u>
<u>3</u>	<u>Material</u>	<u>15</u>
3.1	Antikörper	15
3.1.1	Primärantikörper	15
3.1.2	Sekundärantikörper	16
3.1.3	Magnetbeads	16
3.2	Bakterien	17
3.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
3.4	Enzyme	19
3.5	Geräte	19
3.6	Kits	21
3.7	Oligonukleotide	22
3.8	Plasmide	22
3.9	Puffer und Lösungen	23
3.9.1	Molekularbiologie und Biochemie	23
3.9.2	Zellbiologie	25
3.10	Thiole	26

3.11	Zelllinien und Medien	27
4	Methoden	29
4.1	Molekularbiologische Methoden	29
4.1.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i>	29
4.1.2	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i>	29
4.1.2.1	Isolierung bakterieller Plasmid DNA im kleinen und mittleren Maßstab	29
4.1.3	Fällung der Nukleinsäuren	30
4.1.4	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	30
4.1.5	cDNA Synthese durch reverse Transkription	30
4.1.6	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR	31
4.1.7	Mutagenese PCR	32
4.1.8	Quantitative Real-time PCR	32
4.1.9	Restriktionsverdau der DNA	35
4.1.10	Dephosphorylierung der linearen DNA an den 5' Enden	35
4.1.11	Ligation der DNA	35
4.1.12	Analytische Flachbett-Gelelektrophorese	36
4.1.13	Präparative Extraktion der DNA aus dem Gel	37
4.1.14	Sequenzanalyse	37
4.2	Zellbiologische Methoden	37
4.2.1	Säugetierzelllinien	37
4.2.1.1	Kultivierung und Passagieren der Zellen	37
4.2.1.2	Transfektion verschiedener Zelllinien	37
4.2.1.3	Elektroporation	38
4.2.1.4	Herstellung stabiler Zelllinien	38
4.2.1.5	Bead-Aufreinigung der transfizierten Zellen	38
4.2.1.6	Proteingewinnung aus stabilen Zelllinien	39
4.2.1.7	Zellzahlbestimmung	39
4.2.1.8	Proteinextraktion durch nicht-ionisches Detergenz (NOP-Lysate)	40
4.2.1.9	RNA-Extraktion aus Zellen	40
4.2.1.10	μ CP-Adhäsionsassay	40
4.2.1.11	Einfrieren und Auftauen der Zellen	41
4.2.2	Murine embryonale Stammzellen (mES)	41
4.2.2.1	Kultivierung und Passagieren der W4 mES Zellen	41

4.2.2.2	Trennen der Stammzellen von den <i>Feederzellen</i> (Preplating)	42
4.2.2.3	Gewinnung und Kultivierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) und deren mitotische Inaktivierung	42
4.2.2.4	LIF Produktion	43
4.2.2.5	<i>Hanging-Drop</i> -Methode	43
4.2.2.6	Adhäsionsassay	44
4.2.2.7	Einfrieren von W4 mES Zellen	44
4.3	Proteinbiochemische und Immunologische Methoden	45
4.3.1	Vorbereiten der Proben für die Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie	45
4.3.2	Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie	45
4.3.2.1	Reinigung und Bepacken einer Ni ²⁺ -NTA Chromatographiesäule	45
4.3.2.2	Aufreinigung der Proteine über eine Ni ²⁺ -NTA Säule	46
4.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung über BCA-Assay	47
4.3.4	Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
4.3.5	Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung	49
4.3.6	Western-Blot Analyse	49
4.3.7	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	50
4.4	Funktionalisieren von Oberflächen	50
4.4.1	Polystyrol-Oberflächen	50
4.4.1.1	Herstellen von Polystyrol-Oberflächen durch UV-Lithographie	50
4.4.1.2	Adsorption von Gelatine	51
4.4.2	Microcontact Printing (μCP)	51
4.4.2.1	Reinigung der Deckgläser für die Goldbeschichtung	51
4.4.2.2	Goldbeschichtung der Deckgläser	51
4.4.2.3	Herstellung strukturierter Oberflächen durch Microcontact Printing	52
4.4.2.4	Kopplung von SNAP-Tag Proteinen	52
4.5	Mikroskopie und statistische Auswertung	53
4.5.1	Einzelzellkraftmessungen	53
4.5.2	Mikroskopie	53
4.5.3	Statistische Auswertung	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Proteinexpression und Aufreinigung	55
5.1.1	Herstellung der Fusionsproteine	55

5.1.1.1	Fusion der E-Cadherin-Konstrukte mit einem Histidin-Tag	55
5.1.1.2	Herstellung der N-Cadherin-Fusionskonstrukte	56
5.1.2	Proteinexpression und Aufreinigung	57
5.1.2.1	Aufreinigung des hECad-EC1-5-SNAP-12His	57
5.1.2.2	Aufreinigung des hECad-EC1-2-SNAP-12His	58
5.2	Charakterisierung verschiedener Zelllinien	60
5.2.1	Cadherin-Profil der L-Zellen	60
5.2.2	W4 – murine embryonale Stammzellen (W4 mES Zellen)	61
5.2.2.1	Differenzierung durch die <i>Hanging-Drop</i> -Methode	63
5.3	W4 mES Zellen auf strukturierten Polystyrol-Oberflächen	65
5.4	Funktionalitätstests der verschiedenen Fusionsproteine	68
5.4.1	Auswertungskriterien	68
5.4.2	Adhäsionsverhalten auf E15 Oberflächen	69
5.4.3	Adhäsionsverhalten auf E15 bei Langzeitkultivierung	73
5.4.3.1	β -Catenin Färbung	76
5.4.4	Einzelzellkraftmessungen	77
5.4.5	Verdünnungsreihe	78
5.4.6	Stempelmuster	81
5.4.7	Adhäsionsverhalten auf E12 Oberflächen	82
5.5	W4 mES Zellen auf E15 Oberflächen	84
<u>6</u>	<u>Diskussion</u>	<u>87</u>
6.1	Adhäsionsverhalten der W4 mES Zellen auf UV-strukturierten Polystyrol-Oberflächen	87
6.2	Funktionalitätstests der E-Cadherin-Fusionsproteine	90
6.3	Adhäsionsverhalten der W4 mES Zellen auf E15 funktionalisierten Oberflächen	99
<u>7</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>102</u>
<u>8</u>	<u>Literatur</u>	<u>104</u>
Anhang		114

Liste der verwendeten Abkürzungen	114
Danke	116
Publikationen	117
Lebenslauf	119
Begleit-CD	120

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsion

Die Zelladhäsionsmoleküle bilden im Zusammenspiel mit löslichen Faktoren wie beispielsweise Wnts, FGF, BMP und LIF und extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Laminin und Collagen, aber auch biophysikalischen Kräften wie Elastizität und Festigkeit die Mikroumgebung der Zellen. Sie ist für Gewebe- und Organbildung, aber auch Zellmigration und Differenzierung notwendig.

So bilden die Adhäsionsmoleküle Zell-Zellkontakte oder Zell-Matrixkontakte. Zell-Zell-Kanäle (*Gap Junctions*) sind Zell-Zellkontakte, die Kanäle zwischen den Zellen bilden, wodurch Substanzen zwischen den Zellen ausgetauscht werden können. 1963 beschrieben Farquhar et al. einen dreiteiligen Komplex in polaren Zellen, der aus der Zonula Occludens, der Zonula Adherens und der Macula Adherens besteht. Die Zonula Occludens (*Tight Junctions*) befindet sich immer in der apikalen Seite der Zellen, sie verbindet die Zellen sehr eng miteinander und verhindert dadurch die Diffusion. *Adherens Junctions* (Zonula Adherens) und Desmosomen (Macula Adherens) entstehen über Cadherinverbindungen und interagieren über ihre cytoplasmatische Domäne mit Aktin bzw. Intermediärfilamenten. Die Zell-Matrixkontakte werden vor allem über Integrine gebildet, bei denen sie mit den extrazellulären Matrixproteinen interagieren. Aber nicht nur die Verbindung der Zellen untereinander bzw. zu der Matrix, sondern auch die intrazelluläre Signaltransduktion kann durch die Bindung der Adhäsionsmoleküle verändert werden.

1.1.1 Cadherine

Cadherine sind calciumabhängige Adhäsionsmoleküle, die eine große Rolle in der Zell-Zelladhäsion spielen. Die Cadherine werden in klassische, desmosomale, atypische Cadherine, Protocadherine und Cadherin-verwandte Signalproteine unterteilt (Gumbiner, 2005). Am häufigsten wurden die klassischen Cadherine untersucht, die in zwei Gruppen unterteilt werden: Zu den Typ I Cadherinen gehören E- und N-Cadherin, zu Typ II Cadherinen VE-Cadherin und Cadherin-11. Typ I Cadherine besitzen ein HAV Motiv in der ersten EC Domäne, das den Typ II Cadherinen fehlt.

Benannt wurden sie nach dem Gewebe, in dem sie gefunden wurden. E-Cadherin, mit dem in der vorliegenden Arbeit gearbeitet wurde, kommt in Epithelzellen vor und

ist vor allem in *Adherens Junctions* (AJ) zu finden. AJs bestehen aus vielen Cadherinmolekülen, die lateral (von derselben Zelle stammend) und transversal (von der gegenüberliegenden Zelle stammend) mit anderen Cadherinmolekülen interagieren. Auch das Transmembranprotein Nectin, das über Afadin an Aktin bindet, ist in den *Adherens Junctions* enthalten (Takahashi et al., 1999). Die *Adherens Junctions* sind dynamische Verbindungen, bei denen es zu einem ständigen Einbau, Umbau, Abbau und Wiedereinbau der Cadherine kommt (Baum und Georgiou, 2011). Die AJs können eine Länge von 200-500 nm erreichen (Farquhar et al., 1963).

1.1.1.1 Aufbau und Interaktion der klassischen Cadherine

Alle klassischen Cadherine besitzen 5 extrazelluläre Cadherindomänen (EC Domänen), eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne. Die extrazellulären Cadherindomänen bestehen jeweils aus ca. 110 AA, zwischen die je drei Calciummoleküle eingelagert werden können (Boggon et al., 2002; Pokutta et al., 1994).

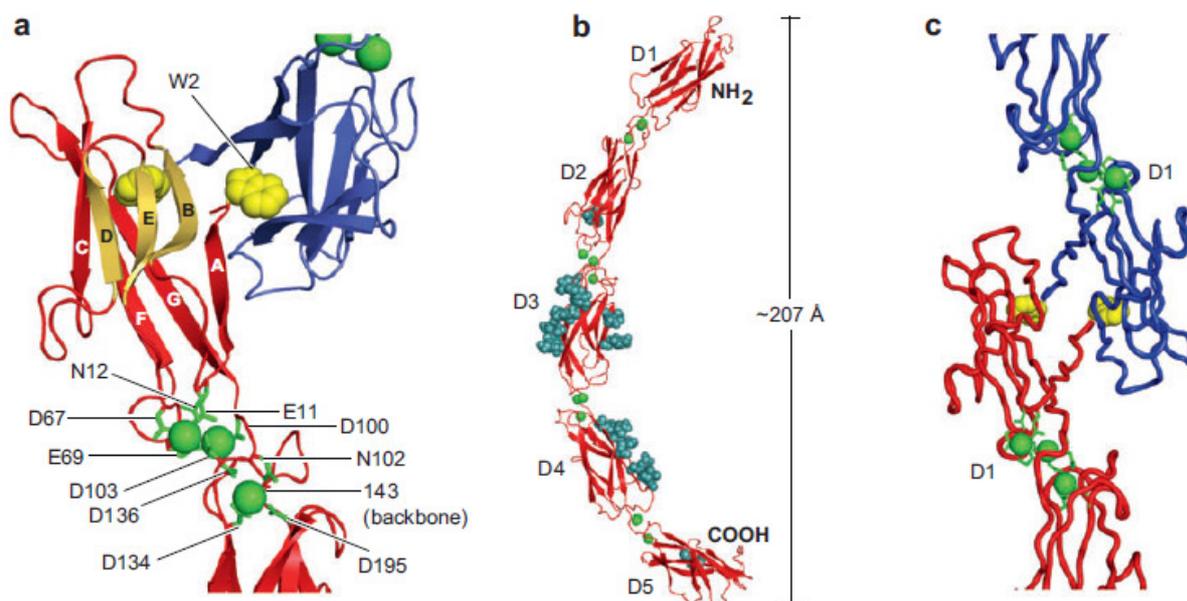


Abb. 1.1: Struktur der EC Domänen von C-Cadherin.

a: Dargestellt ist die erste EC Domäne, die eine β -Sandwich Struktur aus den β -Strängen A-G bildet. Grün: Ca^{2+} bindet in die Bereiche zwischen der ersten und zweiten EC Domäne.

b: 3D Struktur der gesamten Ektodomäne. In Blau sind die Glykosilierungen angezeigt.

c: Strangaustausch zwischen zwei benachbarten C-Cadherinen. In Gelb ist Tryptophan 2 (W2) dargestellt, das mit der hydrophoben Tasche der anderen EC Domäne interagiert.

(aus Pokutta und Weis, 2007, die die Ergebnisse von Boggon et al., 2002, aufbereitet haben).

Bei Calciumentzug werden die Cadherine destabilisiert, *trans*-Interaktionen sind nicht mehr möglich (Klingelhöfer et al., 2002), und die Spaltstelle (*cleavage site*) wird für Proteasen zugänglich (Pokutta et al., 1994). Erst ab einer Konzentration von 0,5-1

mM Calcium ist die extrazelluläre Domäne in ihrer leicht gekrümmten Form vorhanden und hat eine Länge von 20,7 nm (Abb. 1.1 b; Pertz et al., 1999; Boggon et al., 2002). Die erste EC Domäne ist aus 7 β -Strängen aufgebaut, die zusammen eine β -Sandwichstruktur bilden (Abb. 1.1 a; Shapiro et al., 1995). Die Auswirkungen der Glykosilierungen (Abb. 1.1 b, blau) sind noch weitgehend unerforscht. Einige Versuche zeigen, dass die Glykosilierung wichtig für die Stabilität von E-Cadherin ist. So zeigten Zhou et al. (2008), dass eine unterdrückte N-Glykosilierung an L-Asparagin-633 zu einer fehlerhaften Faltung, verhindertem Export aus dem endoplasmatischen Retikulum und einem Abbau des Proteins führt. Die Bedeutung der Glykosilierung wurde auch durch die Arbeit von Guo et al. (2003) bestätigt, die zeigten, dass die Expressionsmenge der N-Acetylglucosaminyltransferase entscheidend für die Zell-Zelladhäsion ist.

Homophile Interaktionen zwischen den Cadherinen als molekularer Mechanismus der Zelladhäsion wurden oftmals beschrieben, die Meinungen wie sie strukturell gestaltet sind, gehen deutlich auseinander. Es wurden *cis*-Interaktionen beschrieben, bei denen die Cadherine derselben Zelle miteinander interagieren und *trans*-Interaktionen, bei denen Cadherine gegenüberliegender Zellen miteinander interagieren. Harrison et al (2011) zeigten, dass in Kristallstrukturen die Cadherine sowohl in *cis* als auch in *trans* interagieren. Dabei bilden sich in *trans*-Stellung *Strand-Swap* Dimere, die schon von Boggon et al. (2002) beschrieben wurden. In Abb. 1.1 c ist dies dargestellt.

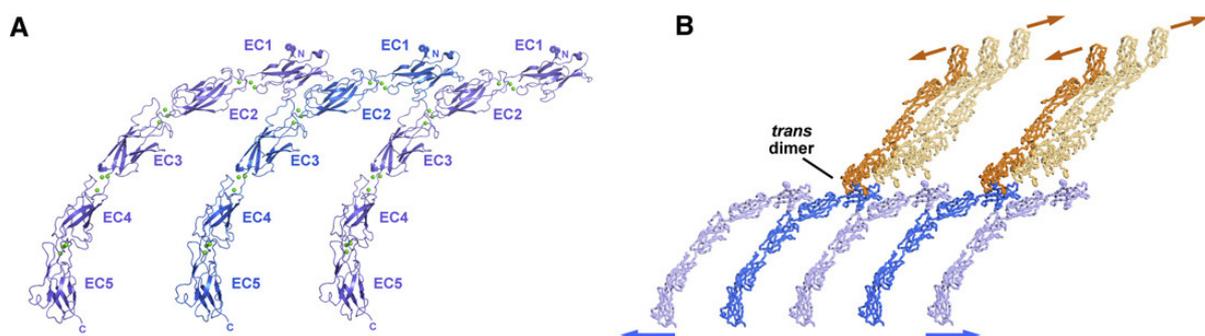


Abb. 1.2: Kristallstruktur der *cis*- und *trans*-Interaktionen.

A: Dargestellt sind die *cis*-Interaktionen.

B: *Cis*- und *trans*-Interaktionen sind dargestellt. Die Pfeile deuten die Richtung der Anlagerungen an (aus Harrison et al., 2011).

Dabei bindet das Tryptophan 2 (W2) aus der ersten EC Domäne des einen Cadherins in die hydrophobe Seitentasche des gegenüberliegenden Cadherins und umgekehrt. (Shapiro et al., 1995; Boggon et al., 2002; Häussinger et al., 2004). Harrison et al. (2011) zeigten in der Kristallstruktur von E-, C- und N-Cadherin auch

cis-Dimere (Abb. 1.2 A). Dabei interagiert die EC1 Domäne des einen mit der zweiten, dem Übergang der zweiten in die dritte und der beginnenden dritten EC Domäne des anderen Cadherins. In *Cis*-Mutanten konnten *trans*-Interaktionen nachgewiesen werden, d.h. *cis*-Interaktionen sind nicht Voraussetzung für eine *trans*-Interaktion. Allerdings scheinen beide Interaktionen notwendig, um stabile Verbindungen zu erzeugen (Harrison et al., 2011). Aber nicht nur *Strand-Swap* Dimere, sondern auch *X*-Dimere sind für *trans*-Dimere nachgewiesen worden (Harrison et al., 2010; Hong et al., 2011). Bei der *X*-Dimer Interaktion binden die zwei gegenüberliegenden Cadherine im Bereich der ersten Calcium-Bindestellen. Durch spezielle Mutanten (die jeweils eine Dimerformation unterbinden) konnte nachgewiesen werden, dass beide Dimere in Zell-Zellkontakten vorkommen. Aufgrund dieser Daten schließen Hong et al. (2011) auf *Strand-Swap* Dimere in stabilen Zell-Zellverbindungen. Erst wenn die Cadherine aus der Verbindung gelöst werden, kommt es zu *X*-Dimerbildung, wodurch auch die *cis*-Interaktionen unterbunden würden und Cadherine leichter aus der Verbindung gelöst werden könnten (Hong et al., 2011).

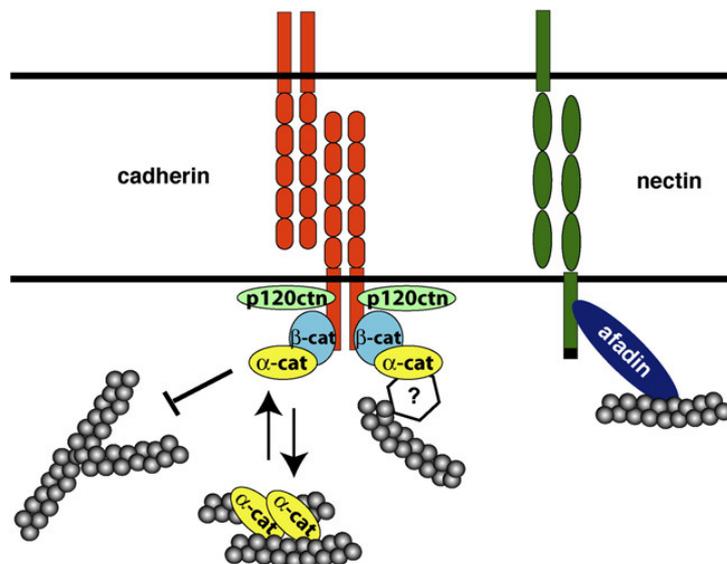


Abb. 1.3: Strukturen der Adhärenz Junctions.

Das klassische Cadherin besitzt 5 extrazelluläre Cadherin Domänen, eine Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Domäne. An die cytoplasmatische Domäne bindet p120 und β-Catenin. α-Catenin bindet an β-Catenin und verbindet diesen Komplex mit dem Aktinzytoskelett.

Nectin, das über Afadin mit dem Zytoskelett verbunden ist, befindet sich auch in den AJs.

(aus Niessen und Gottardi, 2008).

Die cytoplasmatische Domäne ist hoch konserviert unter den klassischen Cadherinen. Über sie interagieren klassische Cadherine mit p120 und β-Catenin. α-Catenin wiederum bindet an β-Catenin, dadurch ist der Komplex mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Abb. 1.3).

P120 bindet an eine membrannahe Region in der cytoplasmatischen Domäne. Dabei stabilisiert die Bindung von p120 das Cadherin (Ireton et al., 2002, Davis et al., 2003).

β -Catenin bindet schon im endoplasmatischen Retikulum an das Cadherin, wodurch beide zusammen an die Membran transportiert werden (Hinck et al., 1994). Durch die Bindung an Cadherin überdeckt β -Catenin ein spezielles Motiv und verhindert dadurch den Abbau über Proteosomen (Huber et al., 2001). β -Catenin hat aber auch noch eine andere Funktion in der Zelle. Es kann über die Bindung an die Transkriptionsfaktoren Lef/Tcf im kanonischen Wnt Signalweg die Transkription von Zielgenen steuern (Behrens et al., 1996; Graham et al., 2000).

α -Catenin liegt als Homodimer vor, das nach Bindung mit β -Catenin ein Heterodimer bildet. Während lange Zeit geglaubt wurde, dass dieser Komplex direkt mit Aktin interagiert, konnten Yamada et al. (2005) zeigen, dass α -Catenin als Homodimer mit Aktin interagiert, dann aber nicht gleichzeitig in einem Heterodimer mit β -Catenin vorliegt (Abb. 1.3). Wie das α -Catenin den Cadherinkomplex mit dem Aktinzytoskelett verbindet, ist noch weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass das Protein über andere Aktinbindepoteine wie Formin, Afadin, ZO-1, Vinculin, α -Actinin mit dem F-Aktin interagiert, mit denen eine α -Cateninbindung nachgewiesen wurde (zusammengefasst in Kobiela und Fuchs, 2004).

Es wurde gezeigt, dass Cadherine mit verschiedenen Signalwegen interagieren und diese dadurch regulieren können. N-Cadherin beispielsweise ist mit dem FGF Rezeptor in Tumorzellen verknüpft und verhindert dadurch den Abbau des Rezeptors, wodurch der FGF Signalweg aktiviert bleibt (Suyama et al., 2002). In Endothelzellen ist VE-Cadherin wichtig für die Regulation des TGF- β Signalwegs (Rudini et al., 2008). Pece et al. zeigten 2000, dass E-Cadherin durch den EGF Rezeptor den MAPK Signalweg beeinflussen kann. Die Interaktion mit den kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 beeinflusst die Cadherinstabilität, das Aktinzytoskelett und auch die Zellstruktur und die Motilität (Baum und Georgiou, 2011).

1.1.1.2 E-Cadherin

Das epitheliale Cadherin ist schon in der frühen Embryonalentwicklung präsent und spielt hierbei eine bedeutende Rolle. So konnten Larue et al. (1994) zeigen, dass Stammzellen, in denen E-Cadherin ausgeschaltet wurde, kein Trophektoderm bilden können. Es konnte dargestellt werden, dass E-Cadherin wichtig für eine korrekt gebildete Plazenta und deren Blutgefäße ist (Stemmler et al., 2010).

E-Cadherin wird bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) oder der Metastasierung herunterreguliert und stattdessen N-Cadherin exprimiert (Hatta und Takeichi, 1986; Li et al., 2001).

E-Cadherin spielt auch in der Stammzellforschung eine große Rolle. So wurde gezeigt, dass E-Cadherin in embryonalen Stammzellen exprimiert wird und in murinen embryonalen Stammzellen wichtig für den Erhalt der Stammzellen scheint, aber auch für die Herstellung von induzierten pluripotenten Stammzellen wichtig ist (Redmer et al., 2011; Xu et al., 2010).

1.2 Stammzellen

Stammzellen stehen spätestens seit der Isolierung humaner embryonaler Stammzellen (Thomson et al., 1998) im Fokus der Medizin. Diese Entwicklung ermöglicht neue Herangehensweisen in Bezug auf die Medikamentenentwicklung, Entwicklungsbiologie, Transplantationsbiologie, aber auch in der Krebsforschung.

Stammzellen sind Vorläuferzellen der sich im Körper befindenden Zellen. Man unterteilt sie nach ihrer Differenzierungsfähigkeit. So werden sie als toti-, pluri- und multipotente Stammzellen bezeichnet, wobei totipotente Stammzellen einen ganzen Embryo bilden können, inklusive des extraembryonalen Gewebes.

Die aus der inneren Zellmasse (ICM) des Blastozysten-Stadiums extrahierten Stammzellen sind pluripotente Zellen, die sich noch in die von den drei Keimschichten abgeleiteten Zellen differenzieren können (Abb. 1.4).

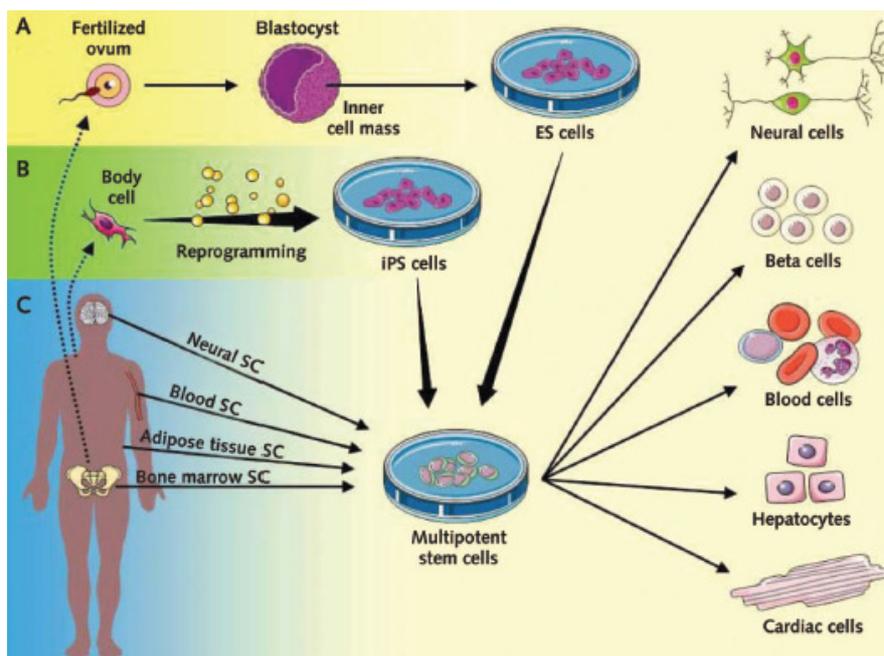


Abb. 1.4: Herkunft und Differenzierung humaner Stammzellen.

A: Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse gewonnen und sind pluripotent.

B: Induzierte Stammzellen können durch Reprogrammierung einer Körperzelle entstehen und sind pluripotent.

C: Adulte Stammzellen können aus der spezifischen Nische gewonnen werden. Hier sind beispielhaft neurale, mesenchymale, Fett- und hämatopoetische Stammzellen dargestellt.

Diese sind multipotent und können sich nur in spezielle Zelltypen differenzieren, (aus Power und Rasko, 2011).

Adulte Stammzellen, die in Stammzellnischen zu finden sind, haben bereits eine eingeschränkte Kompetenz und können sich nur noch in bestimmte Zellen entsprechend ihrem Typ differenzieren. So können sich beispielsweise aus den multipotenten hämatopoetischen Stammzellen nur Blutzellen entwickeln, während die Haarfollikelzellen Haare und Talgdrüsen bilden.

Neben den natürlich vorkommenden embryonalen und adulten Stammzellen ist es in den letzten Jahren gelungen, induzierte pluripotente Stammzellen herzustellen. Takahashi und Yamanaka (2006) verwendeten murine Fibroblasten, in die sie Oct4, Sox2, Klf4 and cMyc über Retroviren einbrachten und erhielten pluripotente Zellen, die sie induzierte pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) nannten. 2007 folgte dann die Generierung der ersten humanen iPS Zellen (Yu et al., 2007; Takahashi et al., 2007). 2009 generierten Zhou et al. iPS Zellen durch rekombinante Proteine. Dafür wurden Oct4, Sox2, Klf4 and cMyc mit einer Poly-Arginin Protein Transduktionsdomäne fusioniert, wodurch diese die Plasmamembran passierten und in die Zellen eindrangen.

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Pluripotente embryonale Stammzellen werden aus der ICM des Blastozystenstadiums extrahiert (Evans und Kaufmann, 1981). Sie können sich in alle Zellen des Körpers differenzieren und behalten dabei einen normalen Karyotyp. Bradley et al. (1994) injizierten murine embryonale Stammzellen (mES) in Blastozysten und erhielten Chimären und zeigten dadurch, dass die Zellen auch keimbahnfähig sind.

Um die Pluripotenz zu erhalten, werden mES auf Feederzellen und in Gegenwart von LIF (*leukemia inhibitory factor*) kultiviert. Smith et al. (1988) konnten LIF, als essentiellen Faktor für den Erhalt der Pluripotenz, aus dem bis dahin verwendeten Medium isolieren. Sie konnten auch zeigen, dass mES auf Gelatine zusammen mit LIF und FCS ihre Pluripotenz erhalten. LIF, ein Zytokin, reguliert die Selbsterneuerung über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Niwa et al., 1998). 2003 zeigten Ying et al., dass das FCS durch BMP4 ersetzt werden kann. In neuesten Ansätzen werden mES Zellen in dem 3i Medium kultiviert. Es besteht aus Inhibitoren, die GSK3 β , den FGF und den MAPK Signalweg inhibieren. Wird zusätzlich LIF zugegeben, ist die Effizienz deutlich erhöht (Ying et al., 2008).

Humane embryonale Stammzellen (hES) benötigen dagegen kein LIF, um die Selbsterneuerung zu erhalten. Anfänglich benutzten Thomson et al. (1998)

Feederzellen, um die Pluripotenz der hES Zellen zu erhalten. Da für therapeutische Zwecke mögliche Kontaminationen ausgeschlossen werden müssen, wurde versucht, auf *Feederzellen* zu verzichten. Xu et al. (2001) kultivierten hES Zellen ohne *Feederzellen*, aber auf Matrigel mit MEF konditioniertem Medium. 2005 wurde von Vallier schließlich gezeigt, dass FGF-2 und Activin/Nodal ausreichen, um die hES Zellen in ihrer Pluripotenz ohne *Feederzellen* und FCS zu erhalten (Vallier et al., 2005).

Trotz der verschiedenen Kultivierungsbedingungen der hES und mES Zellen haben sie auch einige Gemeinsamkeiten. So benötigen beide die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog, die auch als Pluripotenzmarker gelten (Keller, 2005). Mittlerweile gibt es für beide viele *in-vitro* Differenzierungsprotokolle (Keller, 2005; Vazin und Freed, 2010).

1.2.1.1 E-Cadherin in embryonalen Stammzellen

E-Cadherin wird im frühen embryonalen Gewebe und von embryonalen Stammzellen exprimiert (Vestweber et al., 1987; Larue et al., 1996). Während der beginnenden Differenzierung wird E-Cadherin herunterreguliert und stattdessen N-Cadherin exprimiert (Eastham et al., 2007; Spencer et al., 2007). mES Zellen, in denen E-Cadherin ausgeschaltet wurde, konnten durch ein LIF-unabhängiges Medium mit FGF-2 und Activin/Nodal ihre Pluripotenz erhalten. Die Autoren schließen daraus, dass diese mES Zellen in einer LIF-unabhängigen Pluripotenz resultieren (Soncin et al., 2009). Umgekehrt zeigten Xu et al. (2010) mit blockierenden Antikörpern, dass hES Zellen in mES Zellmedium (in Gegenwart von LIF, MEK-Inhibitor und MAPK-Inhibitor) E-Cadherin abhängig sind, während normal kultivierte hES Zellen (in Gegenwart von bFGF) abhängig von Integrinen sind (Xu et al., 2010). mES Zellen, die auf mit E-Cadherin-Fc-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden, behielten ihre Pluripotenz auch dann wenn die LIF Konzentration deutlich herabgesetzt wurde im Verhältnis zu normal kultivierten Zellen (Nagaoka et al., 2006). Redmer et al. (2011) zeigten, dass sich mES Zellen differenzieren, die mit einem blockierenden Antikörper gegen E-Cadherin oder E-Cadherin siRNA behandelt wurden. Bei der Reprogrammierung von MEFs durch virale Expression von Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc entstanden pluripotente Zellen, die auch E-Cadherin exprimierten. E-Cadherin negative MEFs konnten keine induzierten pluripotenten Stammzellen bilden. Wurde statt Oct-4 E-Cadherin viral exprimiert, konnten iPS Zellen erzeugt werden, die eine normale Oct4 Expression aufwiesen (Redmer et al., 2011).

1.2.2 Stammzellen und ihre Nischen

Die Mikroumgebung der Stammzelle bezeichnet man auch als ihre Nische. Dabei spielen Adhäsionsmoleküle wie auch lösliche Faktoren und biophysikalische Eigenschaften eine große Rolle, um die Selbsterneuerung, aber auch Differenzierung, die Apoptose und den Ruhezustand (Quiescence) der Stammzelle zu steuern.

Stammzellen können sich symmetrisch und asymmetrisch teilen. Kommt es bei der symmetrischen Teilung zur Bildung von exakten Kopien der Mutterzelle, so entstehen bei der asymmetrischen Teilung eine Kopie und eine Zelle, die aus der Nische auswandert.

Bei der asymmetrischen Teilung sind intrinsische und extrinsische Signale entscheidend für das unterschiedliche Zellschicksal (Abb. 1.5). Dabei sind Adhäsionsmoleküle sehr wichtig, die nicht nur die Polarität der Zelle steuern, sondern auch einen möglichst direkten Kontakt zu den Signalen vermitteln. In *Drosophila melanogaster*, in der die Mechanismen der Nischen am besten untersucht wurden, konnten beispielsweise Voog et al. (2008) zeigen, dass E-Cadherin essentiell für die Adhäsion der Keimbahnstammzellen an ihre Nische ist. Bei den weiblichen Follikelstammzellen wurden sowohl E-Cadherin als auch ein Integrin als essentielle Adhäsionsmoleküle nachgewiesen (O'Reilly et al., 2008; Song et al., 2002).

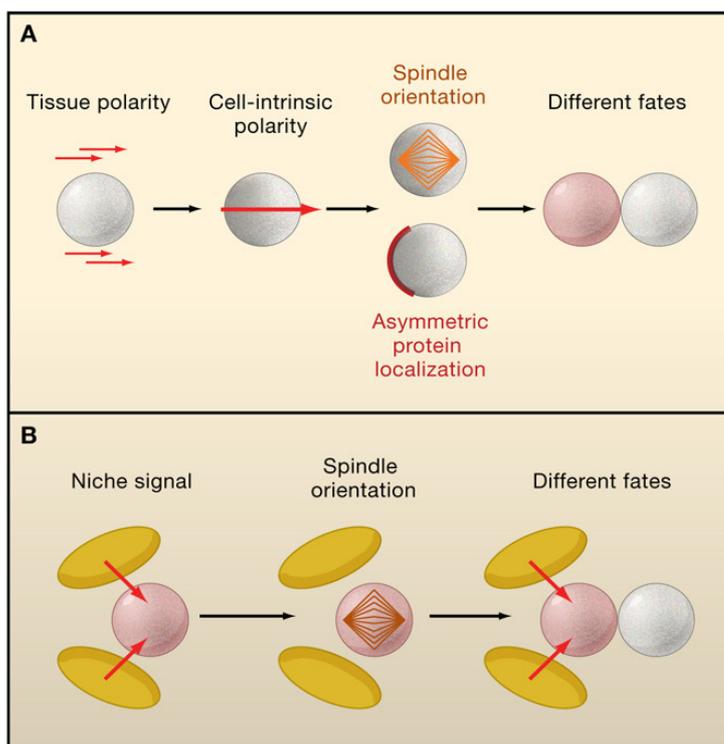


Abb. 1.5: Extrinsische und intrinsische Signale bei der asymmetrischen Zellteilung.

A: Intrinsische Faktoren: Durch die Orientierung der Spindel werden die Proteine asymmetrisch verteilt. Dadurch entstehen Tochterzellen mit unterschiedlichem Zellschicksal.

B: Extrinsische Faktoren: Durch senkrechte Ausrichtung der Spindel zu den Signalen in der Nische, die wichtig für ihre Selbsterneuerung sind, steuern sie das Zellschicksal der Tochterzellen (aus Knoblich, 2008).

Lechler und Fuchs (2005) untersuchten murine Epidermiszellen, in denen β 1-Integrin und α -Catenin ausgeschaltet wurden, und zeigten einen Polaritätsverlust und eine zufällige Anordnung der Spindel. Daraus wurde gefolgert, dass diese Adhäsionsmoleküle wichtig für die richtige Ausrichtung der Spindel sind. Dennoch kann man die Ergebnisse einzelner Nischen nicht verallgemeinern. So wurde in Muskelsatellitenzellen gezeigt, dass M-Cadherin und α 7 β 1 Integrin wichtig für die Verankerung der Zellen sind und neurale Stammzellen N-Cadherin und Par-3 besitzen, während in intestinalen Stammzellen APC wichtig für die richtige Spindelausrichtung ist (Yamashita, 2010).

Neben diesen Faktoren sind auch viele lösliche Faktoren beschrieben, die die Selbsterneuerung der Zelle unterstützen. Darunter stechen Wnt, BMP, FGF, SHH, CXCL12 deutlich hervor, da sie in mehreren Nischen benötigt werden (Voog und Jones, 2010).

1.3 Biofunktionalisierte Oberflächen

Die Biofunktionalisierung von Oberflächen ist eine mittlerweile etablierte Methode, um das Zellverhalten wie Adhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferation der Zelle zu untersuchen. Gerade in der Medikamentenforschung, aber auch in der Differenzierung und dem Erhalt der Stammzellen sind diese Oberflächen eine gute Möglichkeit, um die Auswirkungen verschiedener Bedingungen, wie Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, ECM Moleküle, aber auch Medikamenteneinfluß zu untersuchen. Hierfür können die Oberflächen durch ungerichtete oder gerichtete Adsorption gebildet werden, je nach Molekül und Versuch.

Bei der einfachsten Funktionalisierung durch Inkubation eines Moleküls auf die Oberfläche werden die Moleküle ungerichtet auf der Oberfläche adsorbiert, dabei kann die Dichte der Moleküle und deren Konformation variieren (Iuliano et al., 1993). Selbstorganisierte Monoschichten (SAM, self-assembled monolayer) entstehen durch die Adhäsion und Organisation von löslichen, amphiphilen Substanzen auf festen Substraten. Dabei ist ein Molekülende so konzipiert, dass es an die Oberfläche bindet, während das andere Ende die zu untersuchenden Moleküle bzw. einen Adaptor dafür enthält. Es entstehen eng gepackte Moleküle mit der gleichen Orientierung und Konformation (Schwartz, 2001). Die Bildung von SAMs wurde bereits 1983 von Nuzzo und Allara beschrieben. Sie verwendeten Disulfide, die auf

Gold adsorbierten und dadurch eine Monoschicht bildeten. 2002 zeigten Du und Hlady die Entstehung eines SAMs aus N-Hexadecanoyl-L-Alanin auf Silicium. Mittlerweile gibt es viele Varianten in der SAM Produktion: langkettige Alkohole auf Glas, langkettige Amine auf Platin, Alkyltrichlorsilane auf Silicium und langkettige Thiole, Thioester und Alkyldisulfide auf Gold (Samanta und Sarkar, 2011). Goldstrukturen werden sehr häufig zur Bildung der SAMs verwendet, da es ein inertes Metall ist, das sich leicht auftragen lässt und auf Zellen nicht toxisch wirkt (Love et al., 2005). Die Reaktion von Alkanthiolen mit Gold wird Chemisorption genannt. Dabei adsorbiert das Thiol an Gold und der Wasserstoff der Thiolgruppe wird abgespalten (Kankate et al., 2009).

Es gibt viele verschiedene Methoden, um strukturierte Oberflächen zu generieren. Bei der Photolithographie beispielsweise werden lichtsensitive Polymere durch Bestrahlung verändert, dabei werden Regionen durch eine Maske geschützt, wodurch eine Struktur entsteht (Matsuzawa et al., 1998). Dagegen werden bei der Softlithographie, wozu beispielsweise das Microcontact Printing gehört, durch Stempel Strukturen gebildet. Bei der Dip-Pen-Nanolithographie wird die Spitze des Cantilevers eines Rasterkraftmikroskops (AFM, *atomic force microscope*) verwendet, um die Moleküle direkt auf die Oberflächen zu überführen (Sekula et al., 2008).

1.3.1 Microcontact Printing (μ CP)

Das Microcontact Printing ist eine sehr einfache und kostengünstige Methode, um strukturierte Oberflächen zu generieren und dadurch das Zellverhalten zu untersuchen. Es kann für die ungerichtete und die gerichtete Immobilisierung von Molekülen verwendet werden. Renault et al. (2002) stempelten Immunglobulin G und konnten dies in der Antikörperfärbung nachweisen.

Bei der gerichteten Immobilisierung werden Alkanthiole verwendet, die an Gold adsorbieren und dadurch eine gerichtete und geordnete Immobilisierung der Moleküle ermöglichen. Die Kopfgruppe der Alkanthiole ist für die Funktionalisierung entscheidend.

Ein PDMS (Polydimethylsiloxan) Stempel wird mit einer Thiol-Lösung inkubiert (Abb. 1.6). Der Stempel wird getrocknet und auf die Goldoberfläche angedrückt. Nach dem Ablösen sind die Strukturen vorhanden. Um unspezifische Interaktionen zu verhindern, wird ein weiteres Thiol zur Passivierung verwendet. Nach dem Trocknen können die strukturierten Oberflächen mit dem Protein inkubiert werden, so dass eine gerichtete Funktionalisierung entsteht.

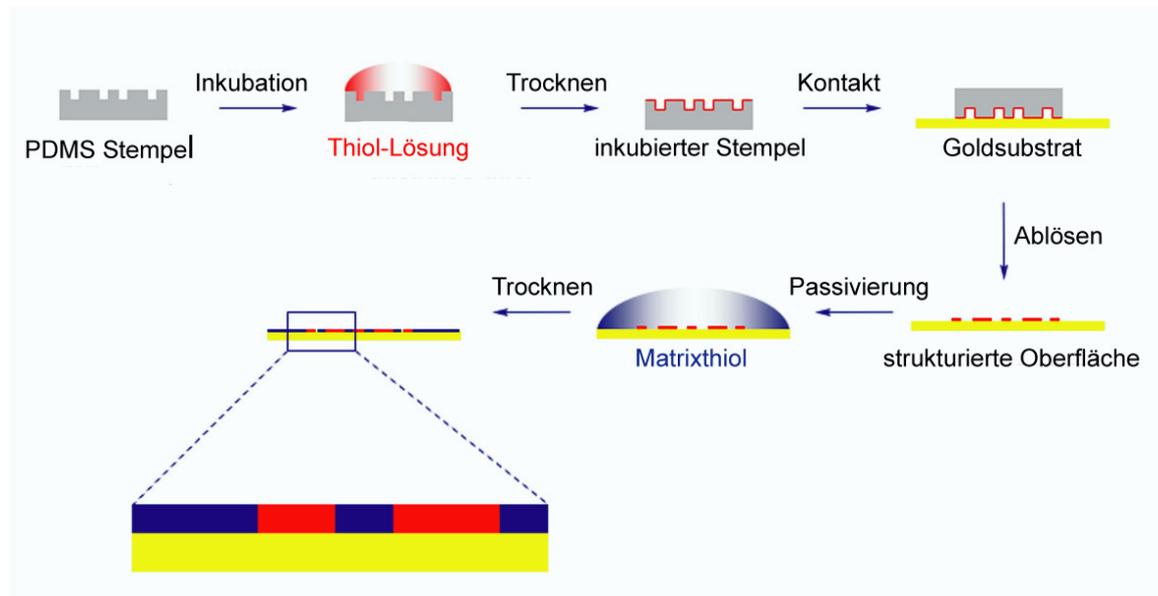


Abb. 1.6: Microcontact Printing am Beispiel der in vorliegender Arbeit verwendeten Reagenzien.
Verändert nach Engin et al., 2010.

1.3.2 SNAP-Tag Kopplung an SAMs

Die Kopfgruppe der Thiole auf den SAMs ist entscheidend für die Funktionalität der SAMs. So können Thiole verwendet werden, deren Kopfgruppe abweisende Eigenschaften besitzt, wie beispielsweise PEG (Polyethylenglycol), oder aber andere Kopfgruppen trägt, mit denen Proteine interagieren können. Lehnert et al. (2004) verwendeten ein hydrophobes Alkanthiol, an das Fibronectin bindet. Sekula et al. (2008) verwendeten die Dip-Pen-Nanolithographie, um Phospholipide mit Ni^{2+} -NTA und mit Biotin auf Oberflächen zu bringen, und konnten dadurch spezifisch zwei Proteine koppeln, His-GFP an Ni^{2+} -NTA und Streptavidin an die biotinylierten Phospholipide. Während die Biotin-Streptavidin Bindung zu einer wahllosen Adsorption des Proteins führt, bindet das His-GFP Protein gerichtet an das Ni^{2+} -NTA, indem der Histidin-Tag mit dem Nickel interagiert (Sekula et al., 2008).

Die gerichtete Immobilisierung des Proteins wird durch den SNAP-Tag gewährleistet. Der SNAP-Tag entstand durch eine Mutation des Reparaturproteins O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (hAGT). Die hAGT erkennt Alkylguanin und entfernt dieses, indem sie den Alkylrest irreversibel an eines ihrer Cysteine bindet. Die Mutante, der SNAP-Tag, erkennt spezifisch Benzylguanin (Kindermann et al., 2003; Keppler et al., 2003).

In Abb. 1.7 ist die kovalente Bindung eines Proteins an eine Oberfläche dargestellt. Der SNAP-Tag, der mit dem Protein fusioniert ist, erkennt Benzylguanin und entfernt die Benzylgruppe, indem es kovalent daran bindet. Ist das Benzylguanin an eine

Oberfläche gekoppelt, kommt es zur Immobilisierung des Proteins (Kindermann et al., 2003). Engin et al. (2010) zeigten dies mit dem Fusionsprotein His-SNAP-GFP, das über Benzylguanin-Thiol auf einer Goldoberfläche immobilisiert wurde. 2011 veröffentlichten Recker et al. einen mit Benzylguanin funktionalisierten Bead, an den sie über den SNAP-Tag Cytokine immobilisierten.

Der SNAP-Tag wird aber nicht nur für die Immobilisierung von Proteinen verwendet, sondern auch für die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen. Dazu erkennt das Fusionsprotein ein Benzylguanin, das über die Benzylgruppe an ein Fluorophor gekoppelt ist (Keppler et al., 2004).

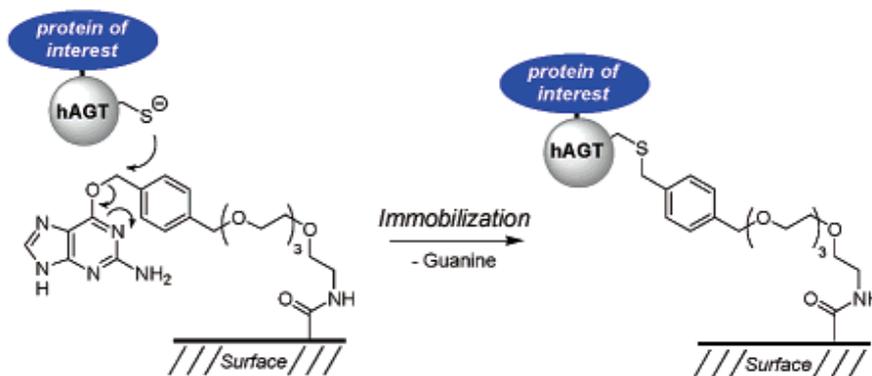


Abb. 1.7:
Immobilisierung eines Fusionsproteins durch den SNAP-Tag.

Ein Fusionsprotein, das aus dem zu immobilisierenden Protein und einem SNAP-tag besteht, kann durch die Reaktion mit Benzylguanin, das an eine Oberfläche gekoppelt ist, immobilisiert werden. (aus Kindermann et al., 2003).

Mittlerweile wurde eine zweite Mutante des hAGT Enzyms entwickelt, das spezifisch Benzylcytosin erkennt. Werden beide im gleichen Organismus verwendet, so zeigen sie eine Spezifität von 99% für ihr Substrat (Gautier et al., 2008).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, artifizielle, strukturierte Oberflächen zur Manipulation verschiedener Zelltypen zu nutzen. Zur Funktionalisierung sollen Gelatine und verschiedene extrazelluläre Bereiche von E-Cadherin, die die Adhäsion von Stammzellen fördern, zum Einsatz kommen.

Dies erfordert die Klonierung, Expression und Aufreinigung der entsprechenden Cadherinkonstrukte. Des Weiteren soll deren Funktionserhalt nach kovalenter Bindung an Oberflächen charakterisiert werden.

Nach erfolgreicher Überprüfung der Oberflächen sollen die entsprechenden funktionalisierten Oberflächen hinsichtlich ihrer Beeinflussung von Stammzellen untersucht werden.

3 Material

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

Tabelle 3.1: Verwendete primäre Antikörper und ihre Verdünnungen.

Name	Wirt	Verdünnung	Quelle
α -Actinin	Maus	1:200	Abcam, Cambridge, UK
α -Connexin 43	Kaninchen	1:400	Abcam, Cambridge, UK
α - β -Catenin	Maus	1:100	BD Transduction Laboratories, USA
α -E-Cadherin (H-108)	Kaninchen	1:250	Santa Cruz Biotechnology, USA
α -E-Cadherin (DECMA)	Ratte	1:500	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -E-cadherin (DECMA)	Zellkulturüberstand Ratte	unverdünnt	Rolf Kemler, MPI, Freiburg
α -E-Cadherin (GP-84)	Kaninchenserum	1:100	Rolf Kemler, MPI, Freiburg
α -E-Cadherin (N-20)	Ratte	1:500	Santa Cruz Biotechnology, USA
α -Nanog	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, UK
α -N-Cadherin	Kaninchen	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
α -Nestin (401)	Maus	1:35	Millipore, Darmstadt
α -Nkx2.5	Maus	1:200	Abcam, Cambridge, UK
α -Oct3/4 (C-10)	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology, USA

α -Smooth Muscle Actin	Maus	1:150	Abcam, Cambridge, UK
α -SNAP	Kaninchen	1:500	New England Biolabs GmbH, Deutschland
α -Sox2	Kaninchen	1:250	Abcam, Cambridge, UK
α -Troponin T	Maus	1:200	Abcam, Cambridge, UK
α -Tubulin (β III Isoform)	Maus	1:400	Millipore, Darmstadt

3.1.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.2: Verwendete sekundäre Antikörper und ihre Verdünnungen.

Name	Beschreibung	Verdünnung	Quelle
G α R-POD	Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:20000	Dianova, Hamburg
G α R-Cy2	Cy TM 2-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:200	Dianova, Hamburg
G α Rat-Cy2	Cy TM 2-konjugiertes Ziege-anti-Ratte IgG	1:200	Dianova, Hamburg
G α M-Cy2	Cy TM 2-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	1:200	Dianova, Hamburg
G α R-Cy3	Cy TM 3-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:200	Dianova, Hamburg
G α Rat-Cy3	Cy TM 3-konjugiertes Ziege-anti-Ratte IgG	1:200	Dianova, Hamburg
G α M-Cy3	Cy TM 3-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	1:200	Dianova, Hamburg

3.1.3 Magnetbeads

- sheep anti-rabbit IgG, Dynabeads

Dynal Biotech, Oslo, Norwegen

-
- sheep anti-rat IgG, Dynabeads Dynal Biotech, Oslo, Norwegen

3.2 Bakterien

- E. coli-JM 109 Promega GmbH, Mannheim
Genotyp: *endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17* (*r_k- m_k+ relA1 supE44 D*
(*lac-proAB*) [*F' traD36 proAB lac_qZDM15*]

3.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht explizit aufgeführten Reagenzien wurden über die folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

- Acrylamid, Bisacrylamid Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Agarose Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
- Ammoniumpersulfat Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- BM Purple AP Substrat Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) AppliChem, Darmstadt
- Complete, EDTA-freie Protease Inhibitor Cocktail Tabletten Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Concanavalin A Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
- DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) Merck KGaA, Darmstadt
- Desoxyribonucleotide Promega GmbH, Mannheim
- Dithiotreitol (DTT) Invitrogen, Karlsruhe
- DMEM High Glucose (4,5 g/l) Invitrogen, Karlsruhe
- DMEM High Glucose (4,5 g/l) PAA Laboratories GmbH, Pasching
- DMSO AppliChem, Darmstadt
- DNA Größenstandard 2-log New England Biolabs, Frankfurt/Main
- Ethidiumbromid AppliChem, Darmstadt
- Fetales Kälberserum (FCS) Biochrom AG, Berlin

-
- Fetales Kälberserum (FCS) für mES PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
 - Gelatine (Rind) Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
 - Geniticinsulfat (G418) Roth GmbH & Co., Karlsruhe
 - Kupfergitter Agar Scientific, Essex, UK
 - L-Glutamin Invitrogen, Karlsruhe
 - Magermilchpulver TSI GmbH & Co.KG, Zeven
 - 2-Mercaptoethanol Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
 - Mitomycin C Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
 - Natriumdodecylsulfat (SDS) Serva, Heidelberg
 - Non-Essential Amino Acids (NEAA) Invitrogen, Karlsruhe
 - PBS ohne Ca/Mg PAA Laboratories GmbH, Pasching
 - Penicillin/Streptomycin (100x) Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 - Pferdeserum Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 - Pluronic® Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
 - Polystyrol Polymer Standards Service GmbH, Mainz
 - Profinity™ IMAC Ni-Charged Resin Bio-Rad Laboratories GmbH, München
 - Proteingrößenstandard Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
 - Quarzglas Schott, Mainz
 - Random Hexamer Primer Promega GmbH, Mannheim
 - Rinderserumalbumin (BSA) AppliChem, Darmstadt
 - Select Agar Invitrogen, Karlsruhe
 - Silicium-Scheiben Wacker, München
 - SYBR® Green Supermix Bio-Rad Laboratories GmbH, München
 - TEMED Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
 - TransPass™ COS/HEK293 Reagenz New England Biolabs, Frankfurt/Main
 - Triton X100 AppliChem, Darmstadt
 - Trypsin/EDTA (1x) PAA Laboratories GmbH, Pasching
 - Tween 20 Serva, Heidelberg
 - Vivacell 250 Insert Sartorius, Göttingen

- Vivaspin15 Zentrifugalfiltereinheiten Sartorius, Göttingen

3.4 Enzyme

- M-MLV Reverse Transkriptase Promega GmbH, Mannheim
- *PfuTurbo* DNA Polymerase Agilent Technologies, Böblingen
- Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase New England Biolabs, Frankfurt/Main
- Restriktionsendonukleasen Promega GmbH, Mannheim
- *Shrimp Alkaline Phosphatase* Promega GmbH, Mannheim
- T4 DNA Ligase Promega GmbH, Mannheim

3.5 Geräte

- Blot-Apparatur Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Brutschrank, APT LineSerieBD/ED/FD Binder, Tuttlingen
- Brutschrank, CO₂ Inkubator Thermo Forma Novodirekt, Kehl
- Chromatographie-Säule Serie ECOplus (TAC15/125PE0-AB-1) KronLab Chromatographie Technology, Dinslaken
- Druckluftregulierer Fuchs, Karlsruhe
- Flachbettgelelektrophoresekammern Amersham, Freiburg
- Folienschweißgerät SEVERIN Folio SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
- FPLC-Anlage: BioLogic HR Chromatography System BioLogic Workstation, Fraction Collector Model 2128 und BioLogic HR System Software Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Gefrierbehälter Nalgene® Mr. Frosty Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
- Geldokumentationsanlagen
 - Diana II Raytest, Straubenhardt
 - Gel Max Intas, Göttingen
- Gene Pulser Bio-Rad Laboratories GmbH, München

-
- iCycler iQ™ Real-Time-PCR Detection System Bio-Rad Laboratories GmbH, München
 - Laborabzug Mc6 Waldner AG, Neuhaus, Schweiz
 - Mikroskope
 - AxioVert 200M Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Software: Axiovision Release 4.8
 - DM IRE 2 Leica Mikrosysteme, Bensheim
Elektronikbox Leica CTR MIC, Digitalkamera C4742-95-12 ERG (Hamamatsu, Herrsching), Software: OpenLab 5.5.0 (Openlab, Heidelberg)
 - CK 2 Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Inverses Lichtmikroskop
 - Nanowizard® II AFM JPK Instruments AG , Berlin
mit *CellHesion* Module, Axio Observer A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena), Cantilever (NP-0, Veeco Instruments), Software: JPK IP
 - Spinning Disk Mikroskop Cell Observer SD, inverses Mikroskop Axio Observer.Z1, konfokale Bildaufnahme YokogawaCSU-X1, Digitalkamera AxioCam MRm, externe Fluoreszenz-Lichtquelle HXP 120, Software: Axiovision Release 4.8.2
 - PAGE-Apparatur, Mini Protean II™, Blotapparatur, Mini Trans Blot Bio-Rad Laboratories GmbH, München
 - PCR Cycler, Personal Cycler und UNO II Biometra, Göttingen
 - PCR/UV Workstation, Cleanspot Coy, Michigan, USA
 - pH-Meter WTW, Weilheim
 - Photometer, Bio-Photometer Eppendorf, Hamburg
 - Plattformschüttler Unimax 2010 rotierend Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
 - Sartorius Analysenwaage BP 221S Sartorius AG, Göttingen
 - Sartorius Präzisionswaage PT 310 Sartorius AG, Göttingen
 - Schüttelinkubator, Orbital Shaker Thermo Forma, Marietta, USA
 - Sicherheitsschrank Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & Co. KG, Karlstein

-
- Spin Coater, Typ SCV-20 LOT-Oriel, Darmstadt
 - Sputteranlage: Leybold-Heraeus GmbH, Hürth
Leybold-Heraeus Z 400
 - Stickstofftank Thermo Cryotechnics Thermo Fisher Scientific Inc.,
Biorack 5400 Waltham, USA
 - Sterilbank Microflow2 NUNC, Roskilde, Dänemark
 - Tischschüttelinkubator, Forma Orbital Thermo Fisher Scientific Inc.,
Shaker Model 420 Waltham, USA
 - Ultra-Low Temperature New Brunswick Scientific, New
Gefrierschrank (-80°C) Jersey, USA
 - Ultraschallbad: Sonorex Bandlin, Mörfelden-Walldorf
 - UV/Visible Spektrophotometer GE Healthcare Europe GmbH,
Ultrospec™ 2100 pro Freiburg
 - UV-Lampe UV Technik Meyer GmbH,
MHL 570 Ortenberg
 - Vakuumpumpe Laboport N811KT.18 KNF Neuberger GmbH, Freiburg
 - Vivacell 250 Sartorius, Göttingen
 - Wasserbad Modell WNB 7 Memmert GmbH+Co.KG,
Schwabach
 - Wasserbad WB 12 PD-Industriegesellschaft mbH,
Dresden
 - Zentrifugen
 - Biofuge fresco Kendro, Langenselbold
 - Centrifuge 5415R Eppendorf AG, Hamburg
 - Eppendorf Tischzentrifuge Eppendorf AG, Hamburg
 - Heraeus® Fresco™ Thermo Fisher Scientific
Inc., Waltham,USA
 - Hettich Universal 32 R mit
Ausschwingrotor Andreas Hettich GmbH & Co.
KG, Tuttlingen
 - Multifuge® 3 S-R Kendro, Langenselbold

3.6 Kits

- BCA Protein Assay Kit Merck KGaA, Darmstadt
- ECL Plus™ Western Blotting Amersham GmbH, Freiburg

Detection System

- High Pure PCR Product Purification Kit Roche Applied Science, Mannheim
- High Pure Plasmid Isolation Kit Roche Applied Science, Mannheim
- High Pure RNA Isolation Kit Roche Applied Science, Mannheim
- Pure Yield™ Plasmid Midiprep System Promega GmbH, Mannheim

3.7 Oligonukleotide

- GAPDH_fwd 5' TGC GAC TTC AAC AGC AAC TC 3'
- GAPDH_rev 5' ATG TAG GCC ATG AGG TCC AC 3'
- His12_NotI_back 5' GAG CGG CCG CCT GAC GGG TAA AGC TCT CCT G 3'
- His12_XhoI_fwd 5' GAC TCG AGC AGG AGG AAT TAA CCA TGG CA 3'
- hNCad_fwd 5' GA GAT ATC ATG TGC CGG ATA GCG GGA GC 3'
- hNCad_EC1-2_rev 5' GA GAT ATC CTC ATT GTT GAT TGT AAA CAT GTT
GGG 3'
- hNCad_EC1-5_rev 5' GA GAT ATC AAG CCC CGC ACC CAC AAT CC 3'
- Muta_12His_Stop_back 5' GGT ACG TTT CAT TTC GCA ATC TTA ATC CAT AGA
TGC
AGG 3'
- Muta_12His_Stop_fwd 5' CCT GCA TCT ATG GAT TAA GAT TGC GAA ATG AAA
CGT
ACC 3'
- mECad_RT_fwd 5' AAA CTT GGG GAC AGC AAC ATC AG 3'
- mECad_RT_rev 5' TCT TTT GGT TTG CAG AGA CAG GG 3'
- mNCad_RT_fwd 5' AGC GCA GTC TTA CCG AAG G 3'
- mNCad_RT_rev 5' TCG CTG CTT TCA TAC TGA ACT TT 3'

3.8 Plasmide

- hECad-EC1-2-SNAP Jubin Kashef, Karlsruhe
- hECad-EC1-5-SNAP Jubin Kashef, Karlsruhe
- hECad-EC1-5-SNAP-12His vorliegende Arbeit
- hECad-EC1-2-SNAP-12His vorliegende Arbeit
- hE-Cadherin-EGFP Andre Menke, Ulm
- hNCad-EC1-2 in pGEMT Adam Kaczorowski, Karlsruhe
- hNCad-EC1-5 in pGEMT Adam Kaczorowski, Karlsruhe

-
- hNCad-EC1-2-SNAP-12His vorliegende Arbeit
 - hNCad-EC1-5-SNAP-12His vorliegende Arbeit
 - hN-Cadherin-EGFP Andre Menke, Ulm
 - N-Cadherin full-length in RZPD, Berlin
pBluescriptR
 - pBAD-SNAP26B-GFP Covalys Biosciences AG, Witterswil, Schweiz
 - pSEMS1-26m Covalys Biosciences AG, Witterswil, Schweiz
 - pSEMS1-26m-12His vorliegende Arbeit

3.9 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen werden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und Aqua bidest. bzw. DEPC-H₂O angesetzt. Bei der Verwendung nicht autoklavierbarer Chemikalien wie z.B. Methanol, Glucose, Triton-X-100 oder Tween 20 werden die Lösungen – wenn nötig – durch Sterilfiltration (Ø 0.2 µm) entkeimt.

3.9.1 Molekularbiologie und Biochemie

- Ampicillin-Stammlösung (1000x)
100 mg Ampicillin pro ml Aqua bidest., bei – 20° C lagern.
- Coomassie Brilliant Blue Entfärbelösung
45% MeOH und 10% Essigsäure in 1 Liter Aqua bidest.
- Coomassie Brilliant Blue Färbelösung
40g CBB in 100 ml Essigsäure und 450 MeOH auf 1 Liter mit Aqua bidest. auffüllen.
- Elektrophorese-Laufpuffer
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS.
- Elutionspuffer
10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH: 7,5 einstellen.
- Glycerinlösung
10% (v/v) Glycerin in Aqua bidest.
- HBS
10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH: 7,5 einstellen.
- 6x Ladepuffer für DNA-Auftrennung
0.25% (w/v) Orange G, 40% (w/v) Saccharose in Aqua bidest.

-
- LB_{AMP}-Agar-Platten
1.5% (w/v) Select Agar in LB-Medium lösen und autoklavieren. Nach Abkühlen auf 55° C 1 ml Ampicillin-Stammlösung pro Liter zugeben und in Petrischalen (Ø 9.4 cm) gießen. Die erkalteten Platten werden kopfüber bei 4° C gelagert.
 - LB_{AMP}-Medium
1 ml Ampicillinlösung pro Liter LB-Medium.
 - LB-Medium
10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l Wasser, pH 7.5.
 - 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS
 - 1x PBS
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.5.
 - PBST
0.1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS.
 - 5x SDS-Ladepuffer
0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptopropandiol, 0.1% (w/v) Bromphenolblau.
 - Startpuffer (FPLC)
10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH: 7,5 einstellen.
 - SOB-Medium
20 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 0.5 g NaCl, 2.5 g MgCl₂, ad 1l Aqua bidest.
 - SOC-Medium
20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.
 - TAE-Puffer
40 mM Tris/Acetat pH 8.3, 1 mM EDTA.
 - 10xTBS
0,5 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4 einstellen.
 - TBST
0.1% (v/v) Tween 20 in 1xTBS.
 - TFB1
30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl,
15% Glycerin, pH mit Essigsäure auf 5.8 einstellen, bei Raumtemperatur lagern.

- TFB2
100 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl und 15% Glycerin
pH mit 1 M KOH auf 6.5 einstellen, bei Raumtemperatur lagern.
- Transferpuffer
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol.

3.9.2 Zellbiologie

- Alzianblau Beschichtungslösung
1% (v/v) Alzianblau, 1% Essigsäure.
- Blockierungslösung
2,5% BSA in 1x PBS.
- Blockierungslösung für mES
10% Pferdeserum in 0,1% PBST.
- DAPI-Kernfärbelösung
Stammlösung: 1 mg/ml in 1x PBS.
Gebrauchslösung: 1:1000 in 1x PBS.
- Einfriermedium
40% Gebrauchsmedium + 40% hitzeinaktiviertes FCS + 20% DMSO.
- Einfriermedium für Stammzellen/ MEF
90% hitzeinaktiviertes FCS + 10% DMSO.
- Elektroporationspuffer
120 mM KCl, 10 mM K₂PO₄/ KH₂PO₄ pH 7.6, 2 mM MgCl₂, 25 mM HEPES pH
7.6, 0.5% Ficoll 400.
- G418
1 g in 10 ml DMEM High Glucose lösen, pH durch Zugabe von 1M NaOH
einstellen, steril filtrieren, aliquotieren, bei -20 °C lagern.
- 0,1 % Gelatine
0,1% Gelatine in 1x PBS lösen, autoklavieren.
- Hitzeinaktives FCS:
Das fetale Kälberserum wird durch 30 min Erhitzen auf 56° C inaktiviert.
- Magnetpuffer
50% DMEM + Zusätze + 50% PBS.
- Mitomycin

2 mg in 10 ml PBS lösen, steril filtrieren, bis zu 1 Monat haltbar, Lagerung bei 4°C.

- Mowiol/DABCO

0.6 g Glycin und 2.4 g Mowiol in 6 ml sterilen H₂O und 12 ml Tris/HCl (pH 7.8) gemäß Herstellerangaben lösen; 25 mg/ml DABCO hinzugeben, aliquotieren, Lagerung bei -20°C.

- NOP-Puffer

150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7.8), 1 mM MgCl₂, 0.75 mM CaCl₂, 2% (v/v) NP40.

- Paraformaldehyd Fixierlösung (4%)

10g PFA 150 ml Aqua bidest. und 0,5 ml 1M NaOH lösen und auf unter 60°C erhitzen. Durch einen Faltenfilter filtrieren und 25 ml 10x PBS zugeben, auf 250 ml mit Aqua bidest. Auffüllen, pH 7,4 einstellen, aliquotieren, Lagerung bei -20°C.

- 0,1% PBST

0,1% TritonX100 in 1x PBS.

- 0,5% PBST

0,5% TritonX100 in 1x PBS.

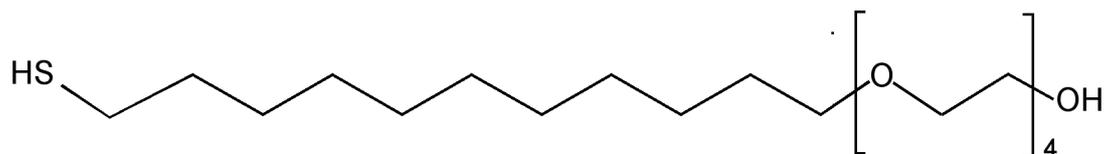
- Vereinzellungslösung

2% hitzeinaktiviertes Hühnerserum + 2 mM EDTA in 50 ml PBS, steril filtrieren.

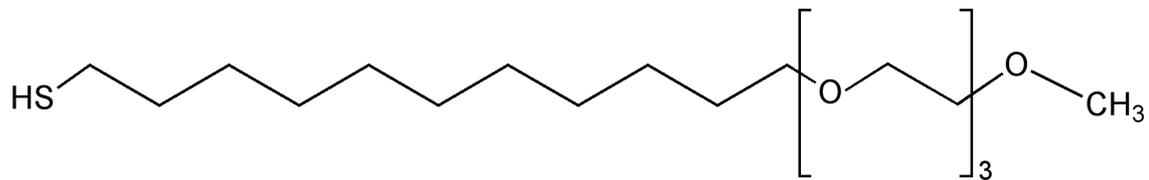
3.10 Thiole

- EG₄-Thiol: C₁₉H₄₀O₅S

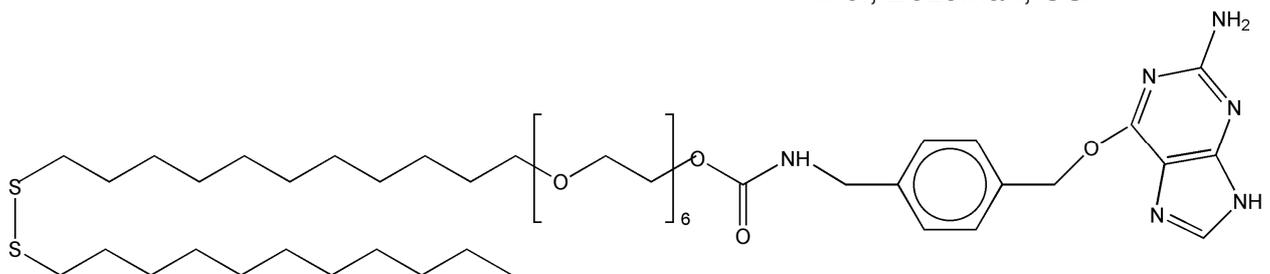
Asemblon, Redmond,
USA



- Methoxy-terminales (MeO)-EG₃-Thiol (C₁₈H₃₈O₄S) Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung, Dr. K. Rischka, Bremen



- Benzylguanin (BG)-Thiol (C₄₈H₈₂N₆O₉S₂) Senso Path Technologies, Inc., Bozeman, USA



3.11 Zelllinien und Medien

Tabelle 3.3 Beschreibung der verwendeten Zelllinien und ihre entsprechenden Medien.

Name	Zelltyp	Medium	Referenz
DECMA	Hybridomazellen	DMEM Vollmedium	Rolf Kemler, MPI, Freiburg
HEK 293	Humane Nierenepithelzellen	DMEM Vollmedium	ATCC: CRL-1573
LIF α 5	HEK293, die LIF exprimieren	MEM α Vollmedium	Erwin Wagner, Madrid, Spanien
L-Zellen	Murine Fibroblasten	DMEM Vollmedium	ATCC: CCL-1.3
MEF	Primäre murine Fibroblasten	Stammzellmedium	Präpariert am Campus Nord mit A. Rolletschek
W4 mES Zellen	Murine embryonale Stammzellen	Stammzellmedium + LIF	Auerbach et al., 2000

HEK/Ecad_EC1-5_SNAP_12His	Ursprungslinie HEK, ECad-EC1-5-SNAP-12His transfiziert	DMEM Vollmedium + 2 mg/ml G418	Sinem Engin, Karlsruhe
HEK/Ecad_EC1-2_SNAP_12His	Ursprungslinie HEK, ECad-EC1-2-SNAP-12His transfiziert	DMEM Vollmedium + 2 mg/ml G418	Vorliegende Arbeit
ECadEGFP/L-Zellen	Ursprungslinie L-Zellen, hECadEGFP transfiziert	DMEM Vollmedium + 2 mg/ml G418	Vorliegende Arbeit

- DMEM Vollmedium:
DMEM High Glucose (PAA) + 1% Penicillin/Streptomycin + 10 % hitzeinaktiviertes FCS.
- MEM α Vollmedium:
 α -MEM + 1% Penicillin/Streptomycin + 10 % hitzeinaktiviertes FCS + 1mM L-Glutamin.
- Stammzellmedium:
DMEM High Glucose (Gibco) + 15% hitzeinaktiviertes FCS + 1% Penicillin/Streptomycin + 1mM Sodumpyruvat + 2 mM L-Glutamin + 1x NEAA (100x) + 0,1 mM β -Mercaptoethanol.
- HD-Medium:
IMDM (Gibco), 20% hitzeinaktiviertes FCS + 2 mM L-Glutamin +1% Pen/Strep + 1x NEAA (100x) + 1,5 ml 1-Thioglycerol-Gemisch (13 μ l 1-Thioglycerol auf 1ml IMDM, steril filtriert).

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Um chemokompetente Bakterien herzustellen, werden JM109/*E.coli* auf einer antibiotikafreien LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2,5 ml antibiotikafreies LB-Medium wird mit einer einzelnen Kolonie von der LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wird in mit 20 mM MgSO₄ versetztem LB-Medium 1:100 verdünnt. Die Zellen werden in einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht hat. Die Bakterienkultur wird auf Eis gekühlt und anschließend für fünf Minuten bei 4 500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien werden in 100 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Anschließend werden sie erneut für fünf Minuten bei 4 500 x g und 4°C zentrifugiert und dann in 5 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden je 100 µl Bakteriensuspension aliquotiert und bei –80°C eingefroren.

4.1.2 Transformation chemokompetenter *E. coli*

Transformation ist das Einbringen von Fremd-DNA in prokaryotische Zellen. Dazu muss die Bakterienzelle zur Aufnahme angeregt werden. Dies erfolgt bei chemokompetenten Bakterien durch einen Hitzeschock.

Zu 50 µl chemokompetenten *E.coli*-Bakterien (JM 109) werden 2µl Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C über 45 Sekunden und 2 min auf Eis werden die Zellen zur Regeneration für eine Stunde in 450 µl SOC-Medium bei 37°C inkubiert.

100-500 µl der Bakteriensuspension werden ausplattiert auf einer LB-Platte, versehen mit der entsprechenden Antibiotikumresistenz. Diese wird zur Inkubation über Nacht bei 37°C bebrütet.

4.1.2.1 Isolierung bakterieller Plasmid DNA im kleinen und mittleren Maßstab

Mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kit“ von Roche für den kleinen und des „Pure Yield Midiprep System“ von Promega für den mittleren Maßstab wird die Isolierung nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Prinzipiell erfolgen die Aufreinigungen der Plasmid DNA nach dem gleichen Prinzip: Durch alkalische Lyse werden die Bakterien aufgeschlossen und die bakterielle DNA sehr effektiv entfernt. Die bakterielle DNA wird dann an eine Membran gebunden und nach mehreren Waschschritten wieder eluiert.

Für den kleinen Maßstab werden 3 ml und für den mittleren 100 ml des selektiven LB-Mediums mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 225 rpm und 37°C inkubiert.

4.1.3 Fällung der Nukleinsäuren

Für die Fällung wird das Nukleinsäurevolumen mit einem Zehntel 3M Natriumacetat und einem Zwanzigstel EDTA (0,5 M, pH 8,0) versetzt. Zusätzlich wird das 2,5 fache an 100%igem Ethanol zugegeben. 15 min auf Eis fördern das Ausfallen der Nukleinsäuren. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm über 15 min werden die Nukleinsäuren pelletiert. Um Salz- und Alkoholreste zu entfernen, werden die gefällten Nukleinsäuren in 70%igem Ethanol aufgenommen, erneut pelletiert und abschließend wird das Präzipitat bei Raumtemperatur kurz getrocknet. Die gefällten Nukleinsäuren werden je nach Bedarf in 20-50 µl Aqua bidest. aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.1.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm kann die Nukleinsäurekonzentration bestimmt werden. Per Multiplikation der OD_{260} mit dem Verdünnungsfaktor und dem spezifischen Multiplikationsfaktor wird die Konzentration errechnet. Der Multiplikationsfaktor beträgt für doppelsträngige DNA 50, für einzelsträngige DNA 33 und für RNA 40.

Eine Verunreinigung des Präparates durch Proteine kann durch das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleotide) zur optischen Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) festgestellt werden. Proteinfreie Nukleotidlösungen haben ein Verhältnis von 1,8-2,0.

4.1.5 cDNA Synthese durch reverse Transkription

Die cDNA (complementary DNA) Synthese erfolgt aus RNA durch reverse Transkription. Dabei wird die RNA in cDNA umgeschrieben.

Zu 150 ng RNA werden 2 µl Oligo(dT)18 Primer zugegeben und über 5 min bei 70° C inkubiert. Danach kommt der Ansatz sofort auf Eis. Es werden anschließend 9,5 µl

des Reaktionsansatzes zugegeben, der aus 4 µl 5x Puffer, 0,5 µl RNAsin, 1 µl 10 mM dNTPs und 4 µl sterilem H₂O besteht. Von jedem RNA-Ansatz gibt es einen positiven Ansatz, in den zusätzlich 0,5 µl (100 U) MMLV Reverse Transkriptase gegeben, und einen negativen Ansatz, der ohne Reverse Transkriptase inkubiert wird. Dieser Negativansatz dient dem Ausschluss von DNA-Kontaminationen.

Die cDNA-Synthese erfolgt zunächst bei 25°C über 5 min und anschließend bei 42°C über 60 min. Die cDNA wird bei -20°C gelagert.

4.1.6 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um DNA-Abschnitte zwischen zwei Oligonukleotid-Primern exponentiell zu amplifizieren. Als thermostabile DNA-Polymerase dient die Phusion-Polymerase (NEB), eine verbesserte *Pyrococcus furiosus* DNA Polymerase. Diese Polymerase ist besonders für das Vervielfältigen von Ligationsfragmenten geeignet, da sie eine verstärkte Korrekturlesefunktion besitzt und so Mutationen verhindert werden.

Der PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthält 1 µl cDNA, 10 µl HF Puffer, 1 µl 10 mM dNTPs, 1,5 µl DMSO, 0,5 µl Phusion Polymerase und je 1 µl der Primer.

Die Proben werden in einem Thermozykler inkubiert. Der erste Schritt ist eine Inkubation bei 95°C über 5 min, um die DNA zu denaturieren.

Danach folgen, abhängig vom Primerpaar, 25-36 Zyklen mit 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei der spezifischen Hybridisierungstemperatur für die Primer, meist zwischen 45°C und 60°C, und 30 Sekunden bei 72°C für die Neusynthese der DNA. Anschließend erfolgt eine Inkubation über 10 min bei 72°C und eine Abkühlung auf 4°C (Abb. 4.1).

Zyklus	Zeit	Temperatur	Beschreibung
1x	5 min	95°C	Denaturierung
25-36x	30 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	45-60°C	Annealing
	30 sec	72°C	Elongation
1x	10 min	72°C	Elongation
1x	∞	4°C	

Abb. 4.1: Standardprogramm im Thermozykler.

Nun können die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen oder bei -20°C gelagert werden. Die Amplifikation wird über ein analytisches Agarosegel dargestellt.

4.1.7 Mutagenese PCR

Um eine Mutation in eine Sequenz einzufügen, wird eine Mutagenese PCR durchgeführt. Dazu werden komplementäre Primer hergestellt, die 25-45 Basenpaare und die Mutationsstelle in ihrer Mitte besitzen. Die Schmelztemperatur der Primer sollte 78°C nicht unterschreiten, der GC Gehalt nicht weniger als 40% betragen. Der PCR-Ansatz hat ein Gesamtvolumen von $50\ \mu\text{l}$, darin sind $5\ \mu\text{l}$ 10x Puffer, 5-50 ng DNA, je $1\ \mu\text{l}$ Primer, dNTPs und der *PfuTurbo* DNA Polymerase enthalten. Die Zyklenanzahl ändert sich, je nachdem welche Mutation eingefügt werden soll: 12 Zyklen für eine Punktmutation, 16 Zyklen für einzelne Aminosäureänderungen und 18 Zyklen für multiple Aminosäureaustausche. Die Elongationszeit berechnet sich aus der Größe der ursprünglichen DNA (Abb. 4.2).

Zyklus	Zeit	Temperatur	Beschreibung
1x	30 sec	95°C	Denaturierung
12-18x	30 sec	95°C	Denaturierung
	1 min 2 min/kb	55°C 68°C	Annealing Elongation
1x	10 min	68°C	Elongation
1x	∞	4°C	

Abb. 4.2 : Parameter der Mutagenese-PCR.

Ein nachfolgender Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* zerstört die ursprüngliche DNA, da das Enzym nur methylierte DNA abbaut. Durch Zugabe von $1\ \mu\text{l}$ zu dem PCR Produkt und Inkubation über 1 Stunde bei 37°C bleibt ausschließlich die neu-synthetisierte und mutierte DNA zurück. Als Kontrolle kann ein Kontroll-Restriktionsverdau dienen, aber erst die Sequenzierung zeigt, ob die Mutation vollständig geglückt ist.

4.1.8 Quantitative Real-time PCR

Die quantitative real-time PCR verändert das Prinzip der Standard PCR dahingehend, dass zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I gearbeitet. Dieser bindet an doppelständige DNA und markiert diese

dadurch. Da die Fluoreszenz proportional mit den DNA-Amplifikaten zunimmt, können diese durch die Intensitätszunahme im iCycler verfolgt werden.

Da nur die exponentielle Phase der PCR Aufschluss über die Quantität liefern kann, wird ein Schwellenwert Ct (Threshold Cycle) angezeigt, der den ersten Zyklus zeigt, in dem die Fluoreszenz deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt.

Die Zyklenzahl n entspricht dabei dem Schwellenwert Ct und N der Anzahl der Amplikon-Moleküle am Schwellenwert.

$$N = N_0 \cdot 2^{Ct}$$

Zur Normierung der eingesetzten DNA-Menge wurde in der vorliegenden Arbeit das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

Zur relativen Quantifizierung berechnet sich die Änderung der DNA-Menge des Zielgens (T) relativ zu dem Haushaltsgen GAPDH (R):

$$N_T = N_{T0} \cdot 2^{Ct_T}$$

$$N_R = N_{R0} \cdot 2^{Ct_R}$$

Es wird eine Normierung auf das Haushaltsgen durchgeführt. Das Verhältnis zwischen dem Zielgen (T) und dem Haushaltsgen (R) ist:

$$\begin{aligned} \frac{N_T}{N_R} &= \frac{N_{T0} \cdot 2^{Ct_T}}{N_{R0} \cdot 2^{Ct_R}} \\ &= \frac{N_{T0}}{N_{R0}} \cdot 2^{Ct_T - Ct_R} \\ &= \frac{N_{T0}}{N_{R0}} \cdot 2^{\Delta Ct} \end{aligned}$$

Dadurch ergibt sich die Formel für das Ausgangsverhältnis von Zielgen (T) und Haushaltsgen (R):

$$\frac{N_{T0}}{N_{R0}} = \frac{N_T}{N_R} \cdot 2^{-\Delta Ct}$$

Eine Probe wird als Kontrolle festgelegt. Alle anderen Proben werden als Testproben definiert. Um das Verhältnis der Kontrolle zu den anderen Werten zu berechnen, nutzt man folgende Formeln:

$$\frac{\frac{N_{T0(test)}}{N_{R0(test)}}}{\frac{N_{T0(control)}}{N_{R0(control)}}} = \frac{\frac{N_{T(test)}}{N_{R(test)}} \cdot 2^{-\Delta Ct(test)}}{\frac{N_{T(control)}}{N_{R(control)}} \cdot 2^{-\Delta Ct(control)}}$$

$$= \frac{2^{-\Delta Ct(test)}}{2^{-\Delta Ct(control)}}$$

$$= 2^{\Delta Ct(control) - \Delta Ct(test)} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

mit $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(test) - \Delta Ct(control)$

weil $N_{T(test)} = N_{R(test)} = N_{T(control)} = N_{R(control)}$

und damit
$$\frac{N_{T(test)}}{N_{R(test)}} = \frac{N_{T(control)}}{N_{R(control)}} = 1$$

$2^{-\Delta \Delta Ct}$ zeigt den Unterschied zwischen der festgelegten Kontrolle und der Testprobe an.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Beschreibung
3x	30 sec	95°C	Denaturierung
1x	5 min	95°C	Denaturierung
40x	30 sec	95°C	Denaturierung
	30sec	60/62°C	Annealing
	30 sec	72°C	Elongation
80x	10 sec	60°C	
1x	∞	4°C	

Abb. 4.3: Parameter der real-time PCR.
E-Cadherin: 62°C, N-Cadherin: 60°C Annealing Temperatur.

Jedes DNA-Fragment hat eine spezifische Schmelztemperatur, die in einer Schmelzkurve dargestellt ist. Anhand dieser lässt sich eine ungefähre Aussage über die Amplifikatsmenge geben. Schmelzkurven mit geringeren Temperaturen weisen meist auf Primerdimere hin.

Der Reaktionsmix besteht pro Probe aus 20 μl , darin enthalten sind 2 μl cDNA, 10 μl iQ SYBR Green Supermix, 1 μl Primer-Mix (10 mM) und 7 μl H₂O.

In Abb. 4.3 sind die Parameter der real-time PCR dargestellt. Die Primer wurden bereits zuvor im Rahmen einer Diplomarbeit (N. Traub, 2012) verwendet und die optimale Annealing Temperatur ermittelt.

4.1.9 Restriktionsverdau der DNA

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an einer spezifischen Erkennungssequenz. Diese Sequenz ist meist palindromisch. Je nach Endonuklease werden die DNA-Stränge glatt oder an versetzten Stellen geschnitten.

Der Restriktionsansatz besteht bei einem Gesamtvolumen von 20 μl aus 1 μg DNA, 2 μl 10x Puffer und 2 bis 3 Einheiten der Restriktionsendonuklease.

Der Ansatz wird bei der entsprechenden Optimaltemperatur, die meist bei 37° C liegt, über 2 Stunden oder über Nacht inkubiert.

4.1.10 Dephosphorylierung der linearen DNA an den 5' Enden

Um eine Religation linearer Plasmidstränge zu verhindern, werden die 5' Enden dephosphoryliert. Dazu werden 41 μl des linearisierten Plasmids mit 5 μl des 10x Puffers und 2 μl der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, Promega) über 30 min bei 37°C inkubiert. Zugabe von weiteren 2 μl der SAP und eine 30 min Inkubation bei 37°C vervollständigen die Dephosphorylierung. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt bei 65°C über 15 min. Zur Kontrolle erfolgt eine Transformation in *E.coli* und ein Ausstreichen auf einer antibiotikumresistenten LB-Platte.

4.1.11 Ligation der DNA

Für die Ligation werden DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden zu der Plasmid-DNA in das Plasmid ligiert, in der vorliegenden Arbeit in pSEMS.

Die Ligation in pSEMS erfolgt mit linearisierten DNA-Fragmenten und dem durch die gleichen Endonukleasen linearisierten Plasmid. Der Ligationsansatz hat ein Gesamtvolumen von 10 μl : 1 μl 10x Ligationspuffer und 1 μl T4 DNA Ligase. Plasmid

und Insert werden im Verhältnis 1:1 oder 1:3 eingesetzt und über Nacht bei 4°C ligiert.

4.1.12 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

Negativ geladene Nukleinsäuren können in einem Agarosegel entsprechend ihrer Größe durch Anlegen einer Spannung aufgetrennt werden. Nukleinsäuren tragen in jeder Monomereinheit eine negative Ladung und wandern deshalb auf die Anode zu. Die Geschwindigkeit, mit der die Nukleinsäuren durch das Gel wandern, ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe, d.h. je kleiner das Molekül ist, desto schneller wandert es durch das Agarosegel.

Die Konzentration des Agarosegels richtet sich nach der Größe der Fragmente. Fragmente bis zu einer Größe von 500 bp lassen sich gut in einem 2% Agarosegel auftrennen, für größere Fragmente wird ein 1% Agarosegel verwendet.

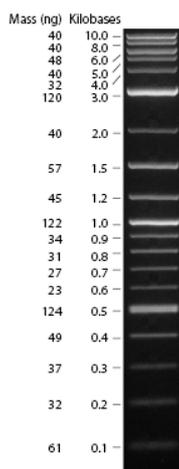


Abb. 4.4: Verwendeter DNA Größenstandard: 2-log DNA-Marker (NEB).

Als Größenvergleich dienen DNA-Größenstandards, die neben den Proben auf das Gel aufgetragen werden (Abb. 4.4). Durch den Vergleich der Laufstrecke der Marker mit der Laufstrecke der DNA-Fragmente ist die Größe bestimmbar. Der Vergleich zwischen der Intensität der DNA-Banden des Größenstandards und der des Fragments kann zur Abschätzung der Nukleotid-Konzentration verwendet werden.

Die Agarose wird durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst; anschließend lässt man sie abkühlen und gibt Ethidiumbromid im Verhältnis 1:10 000 zu. Die auf ca. 50°C abgekühlte Suspension wird in eine Gelform gegossen und erhärtet. In der Gelform befindet sich ein Kamm, der Taschen im Agarosegel ausspart, in welche die mit sechsfach Ladepuffer versetzten Proben gegeben werden. Es wird eine Spannung zwischen 60 und 120 V angelegt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA-Fragmente, was durch UV-Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 312 \text{ nm}$ oder $\lambda = 254 \text{ nm}$ angeregt wird.

4.1.13 Präparative Extraktion der DNA aus dem Gel

Nach der Auftrennung durch die Gelelektrophorese können die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten werden. Mittels „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) kann die DNA entsprechend den Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert werden.

4.1.14 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgt nach der Sanger-Sequenzierung (Sanger et al., 1977) und wird durchgeführt von der Firma GATC, Biotech AG (Konstanz).

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Säugetierzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK und L-Zellen verwendet. Die genauen Beschreibungen der Zelllinien und ihrer Medien sind in Abschnitt 3.11 dargelegt.

4.2.1.1 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Die Zellen werden bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Konfluente Zellen werden durch Zugabe von Trypsin/EDTA und kurze Inkubation bei 37°C von der Gewebekulturflasche abgelöst. Das Trypsin spaltet die extrazellulären Proteine und löst dadurch die Verankerung der Zellen zu der Oberfläche. Sobald die Zellen vereinzelt vorliegen, wird das Komplettmedium zugegeben, um die enzymatische Wirkung des Trypsins zu neutralisieren. Die Zellen werden mit einer Verdünnung von 1:5 bis 1:20, je nach Bedarf und Zelltyp, in neue Gewebekulturflaschen ausgesät.

4.2.1.2 Transfektion verschiedener Zelllinien

Transfektion ist das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies mit Hilfe des Transfektionsreagenz TransPassTM Cos7/HEK293 (NEB) durchgeführt. Das Reagenz besteht aus nicht-lipidischen kationischen Polymeren, die mit der DNA einen Komplex bilden und von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden können.

Für die Transfektion wird ein Transfektionsgemisch hergestellt, das aus serumfreiem Medium, dem Transfektionsreagenz und der DNA besteht. Nach einer halbstündigen Inkubation wird dieses Gemisch auf die Zellen getropft. Je nach eingebrachter DNA

kann die Transfektionseffizienz im Western-Blot oder in der Immunfärbung nachgewiesen werden.

4.2.1.3 Elektroporation

Die Elektroporation wurde von Dr. Clemens Franz am CFN (KIT) durchgeführt. Dazu werden L-Zellen in einer 15 cm Gewebekulturschale kultiviert, bis sie eine 95%ige Konfluenz erreichen. Diese werden ein Tag vor der Transfektion 1:2 gesplittet. Am nächsten Tag werden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und in Elektroporationspuffer aufgenommen. Durch den Elektroporator GenePulser (250 V, 960 mF) wird 10 µg Plasmid-DNA in 2×10^7 Zellen eingebracht. Die Zellen werden über 24 h im Inkubator kultiviert und können anschließend für die Einzelzellkraftmessungen eingesetzt werden.

4.2.1.4 Herstellung stabiler Zelllinien

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Formen der Transfektion, die transiente und die stabile Transfektion. Bei der stabilen Transfektion wird die eingefügte DNA in die Wirts-DNA ein- und nicht mehr abgebaut. Dies wird durch die Selektion positiver Zellen über mehrere Generationen erreicht. Als Selektionsmarker wird in der vorliegenden Arbeit Genitocinsulfat (G418) verwendet, dessen Resistenz auf den eingebrachten Plasmiden liegt.

Dazu wird jeden zweiten Tag das Medium gewechselt und zusätzlich 2 mg/ml G418 zugegeben. In der Selektionsphase sterben die Zellen ab, die nicht transfiziert wurden bzw. deren eingebrachte DNA wieder abgebaut wurde (transiente Transfektion). Es bleiben einzelne Kolonien zurück, welche die fremde DNA in ihr Genom eingebaut haben.

4.2.1.5 Bead-Aufreinigung der transfizierten Zellen

Da die Selektion mit G418 nicht immer ausreicht, eine homogene Population an stabilen Zelllinien zu bekommen, werden die Zellen, die mit den verschiedenen Cadherin-EGFP Konstrukten transfiziert wurden, durch Bead-Aufreinigung zusätzlich selektiert.

Je zwei 25 cm² Gewebekulturflaschen mit konfluenten Zellen werden für einen Ansatz zusammengeführt. Zum Ablösen der Zellen wird hier Vereinzlungslösung verwendet, welche die Zellen ablöst, ohne die extrazellulären Matrixproteine zu zerstören. Antikörper, die an die extrazellulären Domänen des entsprechenden

Cadherins binden, werden über 45 min mit den Zellen in Magnetpuffer rotierend bei 4°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Zellen mit dem Magnetpuffer über Zentrifugationsschritte bei 900 rpm und 6 min werden antikörpergekoppelte magnetische Beads, die gegen den Wirt der primären Antikörper gerichtet sind, für eine Stunde rotierend bei 4°C inkubiert. Schließlich werden die transfizierten Zellen nach weiteren Waschschritten mit dem Magnetpuffer über einen Magneten selektiert, in Kompletmedium ausgesät und über Nacht kultiviert. Tote Zellen und nicht-gebundene Magnetbeads werden am nächsten Tag entfernt und neues Medium mit G418 wird hinzugegeben.

Tab. 4.5: Verwendete primäre Antikörper und magnetische Beads.

Zelllinie	Primärer Antikörper	Magnetische Beads
ECadEGFP/L-Zellen	2 µl DECMA-1 (Sigma-Aldrich)	20 µl sheep anti-rat IgG
NCadEGFP/L-Zellen	6 µl N-Cadherin (Santa-Cruz)	30 µl sheep anti-rabbit IgG

4.2.1.6 Proteingewinnung aus stabilen Zelllinien

Stabile Zelllinien, mit Ecad-EC1-5-SNAP-12His oder Ecad-EC1-2-SNAP-12His transfiziert, werden in 25 cm² Gewebekulturflaschen zur Selektion mit G418 kultiviert. Die Zellen exprimieren das gewünschte Protein und sekretieren es.

Um ausreichend Protein zu erhalten, werden diese Zellen in 175 cm² Gewebekulturflaschen ausgesät. Jeden 2. bis 3. Tag (bis zur Konfluenz der Zellen) werden die Überstände abgenommen, in denen sich das Protein befindet. Durch Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C über 10 min werden tote Zellen und Zelltrümmer entfernt. Bis zur Aufreinigung kann der Überstand bei 4°C gelagert werden zusammen mit Proteaseinhibitoren, die den Abbau der Proteine verhindern.

4.2.1.7 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung werden die Zellen vereinzelt und abhängig von der Zelldichte verdünnt. In die Neubauer-Zählkammer wird die Zellsuspension eingefügt, und die Zellen können ausgezählt werden.

Je 4 Gruppenquadrate, die sich an den Ecken befinden, werden ausgezählt. Die Gruppenquadrate umfassen je 16 Großquadrate; nur Zellen, die sich innerhalb dieser Großquadrate befinden, werden ausgezählt; befinden sich Zellen auf der Grenzlinie, werden nur die auf der linken und unteren Linie ausgezählt.

Der Mittelwert der 4 Gruppenquadrate wird gebildet, mit 10⁴ und gegebenenfalls einem Verdünnungsfaktor multipliziert. Dies ergibt die Zellzahl pro ml.

4.2.1.8 Proteinextraktion durch nicht-ionisches Detergenz (NOP-Lysate)

Membrangebundene Proteine, wie die hier extrahierten Cadherine, müssen aus der Membran herausgelöst werden, um sie mittels SDS-PAGE aufzutrennen (Abschnitt 4.3.4). Dies geschieht mithilfe von Detergenzien, die sich mit ihren hydrophoben Resten an die transmembranen Bereiche der Proteine anlagern, dadurch die Lipoproteine verdrängen und das Protein aus der Membran solubilisieren.

Die konfluenten Zellen werden mehrmals mit 1x PBS gewaschen. Danach werden sie mit einem Zellschaber abgelöst, in 1,5 ml 1x PBS überführt und bei 1000 rpm und 4°C über 5 min zentrifugiert. Die Zellen werden in 300 µl NOP-Puffer, der das nicht-ionische Detergenz Nonidet® P40 enthält, und Proteaseinhibitoren resuspendiert. Durch die Scherkräfte des Auf- und Abziehens durch eine Kanüle werden die Zellen aufgeschlossen. Eine Stunde Rotation bei 4°C solubilisiert die Membranproteine. Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C über 10 min befinden sich die Proteine in der oberen wässrigen Phase und können für die Proteinanalyse verwendet werden.

4.2.1.9 RNA-Extraktion aus Zellen

Für die quantitative real-time PCR ist es erforderlich RNA aus Zellen zu extrahieren. Diese wird dann mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, und die Expression kann ermittelt werden. Um Kontaminationen zu vermeiden, muss steril gearbeitet werden.

Zellen, semikonfluent gewachsen in einer 25 cm² Flasche, werden mehrmals mit 1x PBS gewaschen. 1,5 ml 1x PBS werden zugegeben, und die Zellen werden mittels Zellschaber abgelöst. Die Zellen werden 10 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, und die RNA wird mittels „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben isoliert. Dabei werden die Zellen zunächst lysiert, und die Nukleinsäuren werden an eine Membran gebunden. Die DNA wird durch einen DNase Verdau abgebaut. Nach mehreren Waschschrritten wird die RNA schließlich eluiert und bei -80°C gelagert.

4.2.1.10 µCP-Adhäsionsassay

L-Zellen bzw. EcadEGFP/L-Zellen werden für das µCP-Experiment mit Vereinzelungslösung vereinzelt, in Medium ohne FCS aufgenommen und bei 900 rpm und 4°C über 5 min abzentrifugiert. Die Zellzahl wird in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und 1,1 x 10⁵ Zellen pro ml werden in eine 3,5 cm Petrischale

ausgesät, in der bis zu zwei Goldplättchen Platz finden. Nach 2 Stunden bzw. nach über Nacht Inkubation werden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd über 10 min fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung bei 4°C in 1x PBS gelagert. Das Medium der Zellen, die über Nacht kultiviert werden, wird nach 3 Stunden durch Vollmedium ersetzt.

4.2.1.11 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um Zellen einzufrieren, werden diese mehrmals mit 1x PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vereinzelt und bei 900 rpm und 4°C über 5 min sedimentiert. Die Zellen werden in 1 ml Vollmedium aufgenommen, und es wird langsam 1 ml Einfriermedium zugegeben, in dem sich das Gefrierschutzmittel befindet. Die Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen überführt.

Für eine langsame Anpassung an die tiefen Temperaturen werden die Zellen für 2-3 Wochen bei -80°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Um Zellen aufzutauen, wird das Kryoröhrchen im Wasserbad erwärmt, und die Zellen werden in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit Medium überführt. Das Abzentrifugieren bei 900 rpm und 4°C über 5 min entfernt das Gefrierschutzmittel, und die Zellen können, je nach Zelldichte, in ein oder zwei 25 cm² Gewebekulturflaschen ausgesät werden. Spätestens am nächsten Tag sollten tote Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt werden.

4.2.2 Murine embryonale Stammzellen (mES)

4.2.2.1 Kultivierung und Passagieren der W4 mES Zellen

W4 murine embryonale Stammzellen werden bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Um eine Differenzierung zu vermeiden, werden die Stammzellen auf mitotisch-inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (*Feederzellen*) und mit 0,1% Gelatine-beschichteten Gewebekulturschalen kultiviert. Zusätzlich wird das Stammzellmedium mit einem hundertstel Leukemia Inhibitory Faktor (LIF) versetzt.

Die mES Zellen werden alle ein bis zwei Tage passagiert. Sie werden dafür mit 1x PBS gewaschen, danach werden sie in 1 ml Trypsin/EDTA für 5-7 min bei 37°C inkubiert. Sind die Zellen abgelöst, werden sie in Medium aufgenommen, ausführlich resuspendiert und bei 1000 rpm und 4°C über 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in der gewünschten Verdünnung aufgenommen, und die Zellen werden auf *Feederzellen* ausgesät.

4.2.2.2 Trennen der Stammzellen von den *Feederzellen* (Preplating)

Für einige Versuche ist es erforderlich, die Stammzellen alleine zu verwenden. Dazu müssen die *Feederzellen* von den Stammzellen getrennt werden. Wie in Abschnitt 4.2.2.1 beschrieben, werden die Zellen abgelöst und vereinzelt. Nach der Zentrifugation werden sie in neue, unbeschichtete Gewebekulturschalen ausgesät. Stammzellen benötigen eine Gelatine-beschichtete Unterlage. Ist diese nicht vorhanden, setzen sie sich nur sehr langsam ab. Dies macht man sich hier zunutze: Die *Feederzellen* setzen sich sehr schnell ab, während sich die Stammzellen noch im Überstand befinden. Nach 30 Minuten wird der Überstand aus der Schale auf eine neue Gelatine-beschichtete Gewebekulturschale gegeben.

4.2.2.3 Gewinnung und Kultivierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) und deren mitotische Inaktivierung

Die Präparation der MEFs erfolgte am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG 1, KIT) unter Anleitung von Dr. Alexandra Rolletschek. Dazu werden tragende Weibchen (E15.5 bis E16.5) durch zervikale Dislokation getötet. Der Uterus wird herauspräpariert und in eine Petrischale überführt, gefüllt mit sterilem 1x PBS. Alle weiteren Schritte erfolgen unter der Sterilbank. Die Embryonen werden von der Plazenta und Fruchtblase abgetrennt und nach Abtrennen des Kopfes in eine neue Petrischale mit sterilem 1x PBS überführt. Nach dem Entfernen der inneren Organe werden die Embryonen in 0,2% Trypsin mit Pinzette und Skalpell zerkleinert. Zusätzlich werden die Gewebestücke durch Glaskügelchen in einem Becherglas mit Magnetührstab auf einem Magnetrührer über 20-45 min mechanisch zerkleinert. Danach wird die Gewebesuspension in 15 ml Medium aufgenommen und durch ein Zellsieb gepresst.

Die Zellsuspension wird anschließend bei 1100 rpm und 4°C über 4 min zentrifugiert. Die gelartige, obere Phase des Zellsediments wird, je nach Größe, in zwei bis vier 10 cm Gewebekulturschalen überführt und 6 Stunden im Inkubator kultiviert. Anschließend wird das Medium gewechselt, und größere Gewebereste werden entfernt.

Die gewonnen MEFs können in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Für den täglichen Gebrauch werden MEFs in der dritten Passage mit Mitomycin C mitotisch inaktiviert. Mitomycin C ist ein Zytostatikum, das DNA Stränge miteinander vernetzt und dadurch den Zellzyklus und die Zellteilung stoppt.

Zur mitotischen Inaktivierung werden die konfluenten MEFs mit 6 ml frischem Medium und 300 µl Mitomycin C (0,2 mg/ml) versetzt und über 2-3 Stunden (je nach Alter des Mitomycins) im Inkubator inkubiert. Danach werden die *Feederzellen* in 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und auf 3-5, mit 0,1% Gelatine beschichteten, 6 cm Gewebekulturschalen ausgesät. Nun können die Stammzellen darauf ausgesät werden. Es wird empfohlen, die *Feederzellen* für den weiteren Gebrauch erst nach 24 bis maximal 72 Stunden zu verwenden.

4.2.2.4 LIF Produktion

LIF α 5 Zellen werden nach dem Trypsinieren in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt, und 1×10^6 Zellen/ml werden in einer 25 cm² Gewebekulturflasche ausgesät. Nach 48 h Kultivierung wird der Überstand abgenommen, steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C für den weiteren Gebrauch eingefroren.

Für mES auf Feederzellen benötigt man die Zugabe von 1:100, bei mES auf Gelatine 1:50 des gewonnenen LIFs.

4.2.2.5 Hanging-Drop-Methode

Murine embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die sich in Zellen aller Zellschichten differenzieren können. Um Differenzierung *in vitro* zu induzieren, wird die *Hanging-Drop* (HD)-Methode angewandt (Keller, 1995). Dafür werden die Zellen in einen hängenden Tropfen gegeben, in welchem sie sich aneinanderlagern. Die entstandenen Aggregate werden Embryoidkörperchen (*embryoid bodies*) genannt. Diese werden auf Gelatine ausplattiert, und ihre Differenzierung kann untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei HD-Methoden (Tab. 4.6) auf ihre Differenzierungseffizienz getestet.

Die murinen embryonalen Stammzellen werden dazu 2 Tage zuvor durch *Preplating* von den *Feederzellen* getrennt und auf Gelatine-beschichteten Gewebekulturschalen in Anwesenheit von LIF kultiviert.

Die mES Zellen werden vereinzelt, in dem entsprechenden Medium aufgenommen und ausgezählt. Je 20 µl der Zellsuspension, die durch Verdünnen die Zellzahl enthalten, werden auf den Deckel einer 10 cm Gewebekulturschale getropft. Um ein feuchtes Medium zu schaffen, wird in die Schale PBS gegeben. Die Zellen werden über 2 Tage kultiviert. Die gebildeten Embryoidkörperchen (EB) werden in eine bakteriologische Petrischale gespült und über 3 Tage kultiviert. Anschließend werden

die EBs auf Gelatine-beschichtete Oberflächen überführt und kultiviert. Zur morphologischen Auswertung wird je 1 EB in 1 Well einer Gelatine-beschichteten 24 Well Schale gegeben; für Immunfärbungen werden mehrere EBs auf Gelatine-beschichteten Deckgläsern ausgesät.

Tab. 4.6: Abweichende Parameter der unterschiedlichen Hanging-Drop Protokolle.

	HD Methode 1	HD Methode 2
Protokoll erhalten von	R. Kemler, MPI Freiburg	A. Rolletschek, KIT, Campus Süd
Medium	Stammzell-medium	HD-Medium
Zellzahl pro Tropfen	300 Zellen	600 Zellen

Zur morphologischen Auswertung werden die Zellen alle 2 bis 3 Tage unter dem Mikroskop untersucht, und die Ergebnisse werden dokumentiert.

4.2.2.6 Adhäsionsassay

Für beide Versuche, die Polystyrol-Oberflächen (Abschnitt 4.4.1) und das μ CP-Experiment (Abschnitt 4.4.2), werden die W4 mES Zellen trypsiniert und abzentrifugiert. Zur Vermeidung unspezifischer Adhäsion über Matrixproteine, die sich im FCS befinden, werden die Zellen für das μ CP-Experiment in Medium ohne FCS aufgenommen und ausgezählt. Für die PS-Oberflächen werden 5×10^4 Zellen pro ml, für das μ CP-Experiment 3×10^5 Zellen/ml ausgesät.

Für den μ CP Versuchsansatz wird das Medium nach einer Stunde durch Vollmedium ersetzt. Frühestens nach weiteren 3 Stunden werden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz bei 4°C in 1x PBS gelagert.

4.2.2.7 Einfrieren von W4 mES Zellen

Die W4 mES Zellen werden vereinzelt und abzentrifugiert. Die Zellen werden direkt in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und über den Gefrierbehälter Mr. Frosty bei -80°C eingefroren. Nach 4 Stunden werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

4.3 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden

4.3.1 Vorbereiten der Proben für die Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie

Da sich die Cadherin-Konstrukte im Zellkulturüberstand (Abschnitt 4.2.1.6) befinden, muss lediglich das Volumen des Rohextraktes vermindert werden. Über einen Druckluftbehälter mit integriertem Vivacell-Filter, der alle Proteine zurückhält, die größer als 30 kDa sind, werden je nach Bedarf 250-500 ml des Zellkulturüberstandes bis auf 10 ml eingengt und dadurch überschüssiges Volumen entsorgt.

Der gewonnene Rohextrakt wird mit HBS dialysiert, durch einen Filter mit 0,2 µm-Porengröße filtriert und kann danach über eine Ni²⁺-NTA Säule aufgereinigt werden.

4.3.2 Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie, die in der vorliegenden Arbeit ausschließlich zur Proteinaufreinigung verwendet wurde, bindet rekombinant exprimierte Fusionsproteine spezifisch über ihre Affinitätsmarkierung an eine Matrix und trennt sie dadurch von den anderen Proteinen. Durch einen späteren Elutionsschritt werden diese dann möglichst rein abgelöst.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle rekombinant exprimierten Proteine, die Histidin-Reste besitzen, an eine Ni²⁺-Chelat Säule gebunden. Das Histidin besitzt einen Imidazolring, der an Ni²⁺ bindet. Nach längerem Waschen der Säule, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, werden die rekombinant exprimierten Proteine durch Zugabe von Imidazol im Überschuss kompetitiv verdrängt.

4.3.2.1 Reinigung und Bepacken einer Ni²⁺-NTA Chromatographiesäule

Um Kontaminationen zu vermeiden, wird jedes Protein über eine eigene Ni²⁺-NTA Säule aufgereinigt. Nach 6 bis 8 Aufreinigungsvorgängen sollte die Säule mit neuen Ni²⁺-NTA Beads bepackt werden.

Eine FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) Säule besteht aus einem Säulenglaskörper, zwei Stempeln mit Fritte, Konterschrauben und Kontermuttern. Zum Reinigen werden die einzelnen Teile auseinander gebaut, mit Aqua bidest. gesäubert und bis auf Stempel und Fritte in 0,1 M NaOH über Nacht inkubiert. Über 30 min werden schließlich Stempel und Fritte in 0,1 M NaOH inkubiert. Anschließend werden die Säulenteile mit Aqua bidest. gespült. Zum Befüllen der Säule wird ein Stempel mit Fritte über eine Konterschraube und -mutter mit dem Säulenglaskörper

verbunden. Ni²⁺-NTA Beads werden zugegeben, einmal mit Aqua bidest. und zweimal mit dem entsprechenden Puffer gespült. Der zweite Stempel mit Fritte wird vorsichtig, ohne Luftblasen zu bilden und einzuschließen, über die Konterschraube und -mutter befestigt. Anschließend wird die Säule an die FPLC-Anlage angeschlossen und mit Startpuffer über 30 Minuten gespült. Dabei muss vor allem darauf geachtet werden, dass die Anschlüsse der Säule dicht sind und es zu keinen großen Druckschwankungen kommt.

4.3.2.2 Aufreinigung der Proteine über eine Ni²⁺-NTA Säule

Die Aufreinigung erfolgt durch ein Reinigungsprogramm (Abb. 4.7), das die FPLC-Anlage steuert, an welche die Ni²⁺-Chelat Säule angeschlossen ist. Ein Fraktionssammler, der an die Anlage angekoppelt ist, sammelt in ml-Einheiten das Eluat. Über ein Chromatogramm, das die UV-Absorption bei 280 nm misst, wird der Verlauf der Aufreinigung dargestellt.

Beschreibung			
1	Sammeln von 1 ml-Fractionen über den gesamten Verlauf		
2	Position der Pre-Säule		
3	Position der Post-Säule		
4	Beladen der Säule	A2 Rohextrakt + Startpuffer	Rohextraktvolumen + 5ml Flussrate: 0,5 ml/min
5	Isokratischer Fluss	A1 Startpuffer	Volumen: 15 ml Flussrate: 0,5 ml/min
6	Linearer Gradient	A1 Startpuffer 100% → 0% B Elutionspuffer 0% → 100%	Volumen: 30 ml Flussrate: 0,5 ml/min
7	Isokratischer Fluss	B Elutionspuffer	Volumen: 15 ml Flussrate: 0,5 ml/min
8	Isokratischer Fluss	A1 Startpuffer	Volumen: 15 ml Flussrate: 0,5 ml/min
9	UV Lampe wird ausgeschaltet		

Abb. 4.7: Reinigungsprogramm für die in der vorliegenden Arbeit aufgereinigten Proteine.
A1: Pumpe A, Schlauch 1; A2: Pumpe A, Schlauch 2; B: Pumpe B

Der Rohextrakt der aufzureinigenden Proteine wird auf die Ni²⁺-Chelat Säule geladen, zusätzlich wird danach manuell Startpuffer nachgelegt, um das komplette Protein aus dem Schlauch auf die Säule zu laden. Durch mehrere Waschstufen werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Dann wird das gewünschte

Protein eluiert in einem Gradienten, bestehend aus Startpuffer und Elutionspuffer, der 500 mM Imidazol enthält. Anschließend wird die Ni²⁺-Chelat Säule nochmals mit Startpuffer gereinigt. Der im Chromatogramm dargestellte Volumenanstieg nach der Elution enthält das aufgereinigte Protein. Von diesen Fraktionen werden Proben für den Nachweis über SDS-PAGE und Western Blot Analyse abgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C aufgekocht. Die über den Western Blot ermittelten, positiven Fraktionen werden mithilfe eines VivaSpin15-Filters konzentriert, mit 1mM DTT versetzt, und die Gesamtproteinkonzentration wird über den BCA-Assay ermittelt.

4.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung über BCA-Assay

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wird das Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) Kit von Novagen verwendet. Cu²⁺-Ionen werden durch Proteine in alkalischer Lösung zu Cu⁺ reduziert. Die Bicinchoninsäure bildet einen Komplex mit dem reduzierten Cu⁺ und wird violett. Diese Komplexverbindung hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm.

Die Bicinchoninsäure-Lösung wird in einem Verhältnis von 50:1 mit 4% Kupfersulfat vermischt und 1 ml auf je 25 µl der zu untersuchenden Proteinlösung gegeben. Bei 37°C werden die Proben über 30 min inkubiert. Hiernach wird die Absorption bei 562 nm im Photometer gemessen. Die gewonnenen Werte werden mittels einer Eichgerade in die Proteinkonzentrationen umgerechnet.

4.3.4 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

In der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden denaturierte Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts elektrophoretisch getrennt.

Die Proteine werden durch β-Mercaptoethanol und SDS, welche sich in dem 5x SDS Probenpuffer befinden, und durch Aufkochen denaturiert, d.h. ihre Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen gehen verloren. Das Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) bindet an Proteine und lädt sie negativ. Da die Menge des gebundenen SDS proportional zur Größe der Proteine ist, ist die Ladungsdichte gleich, und die Auftrennung in dem Polyacrylamidgel hängt allein von der Größe der Proteine ab. Die Mobilität des SDS-Protein-Komplexes ist linear vom Logarithmus des Molekulargewichts abhängig. Die negativ geladenen Proteine wandern zur Anode, wobei die kleineren Proteine schneller wandern als die größeren.

Tab. 4.8: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.

	8% Trenngel 5 ml	10% Trenngel 5 ml	5% Sammelgel 2 ml
H ₂ O	2,3 ml	1,9 ml	1,4 ml
30% Acryl-Bisacrylamid Mix	1,3 ml	1,7 ml	0,33 ml
1,5 mM Tris/HCl, pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	--
0,5 mM Tris/HCl, pH 6,8	--	--	0,25 ml
10% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
10% APS	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,003 ml	0,002 ml	0,002 ml

Das Polyacrylamidgel wird durch Polymerisation von Acrylamid hergestellt; dabei dient Ammoniumpersulfat (APS) als Initiator und TEMED als Mediator. Das Acrylamidgel wirkt als Sieb, das abhängig von seiner Porengröße die Proteine retardiert. Für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 120 kDa ist ein 8%, für solche mit 20-70 kDa ein 10%, für Proteine mit 20-60 kDa ein 12% und für Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-40 kDa ein 15% Polyacrylamidgel optimal (Tab. 4.8). Das Sammelgel enthält 5% Acrylamid, hat somit große Poren und einen pH-Wert von 6.8, weshalb sich die Proteine an der Grenzschicht zum Trenngel aufkonzentrieren.

Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen. Das Trenngel wird, sofort nach dem Mischen, bis ca. 1 cm unter dem späteren Kamm in die Kammer gefüllt und vorsichtig mit Aqua bidest. übergossen. Nach einer Polymerisationsdauer von ungefähr einer halben Stunde kann das Wasser abgeschüttet, das Sammelgel darüber gegossen und der Kamm für die Probestaschen eingesetzt werden. Nachdem das Sammelgel ausgehärtet ist, wird der Kamm vorsichtig gezogen, und die Glasplatten werden in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Kammern werden mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Nun können die Proteinproben in die Probestaschen geladen werden. Zusätzlich wird ein Größenstandard mit Proteinen aufgetragen, deren Molekulargewicht bekannt ist. Zum Passieren des Sammelgels wird eine Spannung von 60V angelegt, bei Eintritt der Proteine in das Trenngel auf 120V erhöht. Wenn die Lauffront das Gelende erreicht hat, wird die Elektrophorese gestoppt. Das Trenngel wird von den Glasplatten genommen und für die Proteinanalyse mittels Western Blot bzw. Coomassie Brilliant Blue Färbung verwendet.

4.3.5 Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung

CBB bindet an Proteine und färbt diese blau, die Nachweisgrenze liegt bei etwa 50-100 ng pro Bande. Dabei werden Proteine, die sich auf dem Gel befinden, durch die Anlagerung des Farbstoffes an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren angefärbt.

Sind die einzelnen Banden gut zu erkennen, wird die Hintergrundfärbung durch die CBB-Entfärbelösung entfernt. Abschließend wird das Gel für 5 min in Aqua bidest. eingelegt und zum Trocknen zwischen zwei feuchten Folien aufgespannt.

4.3.6 Western-Blot Analyse

Die durch das SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Blotting erfolgt im elektrischen Feld. Anschließend wird die Membran mit einem Antikörper inkubiert, der gegen die entsprechenden Proteine bzw. ihre Markierung gerichtet ist. Gegen diesen Antikörper wird ein sekundärer Antikörper verwendet, der an Peroxidase gekoppelt ist. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen. Dabei entsteht eine Lichtemission, die man mit einer CCD-Kamera aufnehmen kann. Für den Blot, d.h. die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran, werden die einzelnen Komponenten wie folgt in die Blotapparatur eingelegt (von unten nach oben): 3x Filterpapier, Membran, SDS-Gel und 3x Filterpapier. Die einzelnen Komponenten werden in Transferpuffer äquilibriert. Nun kann das Sandwich aufgebaut werden, wobei darauf zu achten ist, dass der Aufbau blasenfrei vonstatten geht. Das Blotting erfolgt über 100 Minuten bei 0,5 Ampere pro Membran. Anschließend wird die Membran 30 min mit 5% Magermilch blockiert. Danach wird dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgt über Nacht bei 4°C. Dafür wird die Membran in eine Plastiktüte eingeschweißt.

Nach der Antikörper-Inkubation wird der Antikörper abgenommen und für weitere Verwendung bei -20°C eingefroren, die Membran wird dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper ist gegen das Wirtstier des ersten Antikörpers gerichtet und wird 1:20000 verdünnt. Die Membran wird darin über 2 Stunden inkubiert. Anschließend wird sie dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Nun wird die „Enhanced Chemolumineszenz“-Lösung (ECL) auf die Membran aufgetragen. Peroxidase, die an den Sekundär-Antikörper gekoppelt ist, katalysiert die Oxidation

des in der Lösung vorhandenen Luminols. Die Chemolumineszenz wird durch eine CCD-Kamera dokumentiert.

4.3.7 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung werden Proteine durch Antikörperkopplung hervorgehoben. Dazu binden primäre Antikörper an das darzustellende Protein. Ein sekundärer Antikörper, der gegen den Wirt des primären gerichtet und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, visualisiert durch Bindung an den primären Antikörper das Protein im Fluoreszenzmikroskop.

Zellen auf Deckgläsern oder auf den verschiedenen Oberflächen werden über 10 min mit 4% PFA-Lösung vernetzt. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wird bei intrazellulären Proteinen die Membran mit 0,1% TritonX100 in 1x PBS permeabilisiert und weitere Waschschriffe mit 1x PBS folgen. Eine dreißigminütige Inkubation mit Blockierungslösung soll unspezifische Antikörperbindung verhindern. Die primären Antikörper werden, wie in Tab. 3.1 dargestellt, in Blockierungslösung gelöst und über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dreimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt nicht gebundene Antikörper. Der sekundäre Antikörper wird, wie in Tab. 3.2 erwähnt, in Blockierungslösung verdünnt und über 30 min bei 37°C inkubiert. Die ungebundenen Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt. Um die Zellkerne anzufärben, werden die Zellen über 5 min mit einer DAPI-Lösung bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit 1x PBS gewaschen. Mit Mowiol werden die Oberflächen auf den Objektträgern eingebettet und bis zur Analyse am Mikroskop im Dunkeln gelagert.

Das Protokoll für die Immunfärbung der Stammzellen zeigt einige Abweichungen: Als Waschmedium wird 0,1% PBST verwendet, 0,5% PBST über 15 min permeabilisiert die Membranen und als Blockierungslösung wird 10% Pferdeserum verwendet.

4.4 Funktionalisieren von Oberflächen

4.4.1 Polystyrol-Oberflächen

4.4.1.1 Herstellen von Polystyrol-Oberflächen durch UV-Lithographie

Die Herstellung der Polystyrol-Oberflächen (PS-OF) wurde von Andre Petershans (A. Petershans, Dissertation) durchgeführt.

Dafür wird eine frisch gereinigte Silicium-Scheibe durch die *Spin Coating* Technik mit 20 µl Polystyrol (25 mg gelöst in 1 ml Toluol) beschichtet. Bei 1800 rpm über 30 s entsteht eine Schichtdicke von 140 nm. Anschließend wird ein Kupfergitter auf die homogene Polystyrol-Oberfläche gelegt. Dieses Gitter bildet ca. 120 µm x 120 µm große Quadrate mit einem Abstand von jeweils 45 µm. Um das Gitter zu fixieren wird zusätzlich ein Quarzglas aufgelegt.

Die 6-minütige UV-Belichtung der Probe trägt den Polystyrolfilm um 30 nm ab und liefert in dem bestrahlten Bereich hydrophile Quadrate und in dem durch das Kupfergitter abgedeckten, unbestrahlten Bereich hydrophobe Stege.

4.4.1.2 Adsorption von Gelatine

Um die mES auf den strukturierten PS-Oberflächen kultivieren zu können, werden diese mit Gelatine inkubiert. Eine vermehrte Adsorption der Gelatine auf den hydrophilen Bereichen wird erwartet. Um zu untersuchen, ob der Gebrauch von Pluronic® die hydrophoben Bereiche passiviert und es dort dadurch zu keiner Gelatine-Adsorption kommt, werden die Oberflächen über 20 min mit 5% Pluronic® oder, als Kontrolle, Aqua bidest. inkubiert. Anschließend werden die PS-Oberflächen über 30 min mit 0,1% Gelatine inkubiert. Nun können die mES darauf ausgesät werden (Abschnitt 4.2.2.6).

4.4.2 Microcontact Printing (µCP)

4.4.2.1 Reinigung der Deckgläser für die Goldbeschichtung

Die Deckgläser werden über 20 min in einer Reinigungslösung aufgekocht, bestehend aus 5:1:1 Aqua bidest., Ammoniak und Wasserstoffperoxid. Nach fünfmaligem Waschen mit Aqua bidest. werden sie nochmals in der Reinigungslösung über 20 min aufgekocht. Nach zehnmalem Waschen mit Aqua bidest. werden die Plättchen unter Stickstoff getrocknet.

4.4.2.2 Goldbeschichtung der Deckgläser

Die Goldbeschichtung erfolgt am IAM-WPT am Campus Nord und wird von Vanessa Hermann und Udo Geckle durchgeführt.

Der Probenhalter wird mit den Deckgläsern bestückt und anschließend in die Sputteranlage Z400 eingelegt. Bei einem Druck von 2×10^{-3} mbar werden 20 nm

Chrom (entspricht einer Sputterzeit von 60 sec) als Haftvermittler und 150 nm Gold (entspricht einer Sputterzeit von 129 sec) auf die Deckgläser aufgebracht.

4.4.2.3 Herstellung strukturierter Oberflächen durch Microcontact Printing

Die Goldplättchen werden vor Gebrauch mit Isopropanol gereinigt und unter Stickstoff getrocknet. Der PDMS-Stempel wird mit einer Thiol-Lösung (Tab. 4.9) über 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Thiol-Lösung besteht aus einem Gemisch aus BG- und MeO-EG₃-Thiol (Abschnitt 3.10), das in Isopropanol gelöst ist.

Nach der Inkubation wird das überschüssige Thiol unter Stickstoff entfernt, der Stempel auf die Oberfläche gedrückt und für 2 min inkubiert. Dabei bilden die Thiole eine starke Bindung mit dem Gold.

Tab. 4.9: Verdünnungen der Thiol-Lösungen.

Als Standard wurde die 1:100 Verdünnung verwendet.

Verdünnungen der Thiol-Lösung	Konzentration BG:MeO-EG ₃ Thiol
1:100	1 µM BG : 100 µM MeO-EG ₃
1:200	0,5 µM BG : 100 µM MeO-EG ₃
1:500	0,2 µM BG : 100 µM MeO-EG ₃
1:1000	0,1 µM BG : 100 µM MeO-EG ₃
1:10000	0,01 µM BG : 100 µM MeO-EG ₃
1:100000	0,001 µM BG : 100 µM MeO-EG ₃

Durch Anhauchen des Plättchens kann das Stempeln nachgewiesen werden. Die Oberfläche wird mit Isopropanol gereinigt und unter Stickstoff getrocknet. Die ungestempelte Fläche wird durch Inkubation über 45 min mit einer 100 µM EG₄-Thiol-Lösung passiviert. Nach abschließender Isopropanolreinigung wird das Goldplättchen unter Stickstoff getrocknet, und die SNAP-getaggt Proteine können darauf inkubiert werden.

4.4.2.4 Kopplung von SNAP-Tag Proteinen

Die µCP-Oberflächen werden zunächst dreimal mit HBS äquilibriert. Anschließend werden die SNAP-Tag Proteine für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Danach wird dreimal mit Medium ohne FCS gewaschen, und die Zellen können darauf ausgesät werden (Abschnitt 4.2.1.10 und 4.2.2.6). Es muss besonders darauf geachtet werden, dass die mit dem Protein funktionalisierten Oberflächen während des ganzen Vorgangs nicht trocken fallen.

4.5 Mikroskopie und statistische Auswertung

4.5.1 Einzelzellkraftmessungen

Die Einzelzellkraftmessungen wurden in einer Kooperation mit Dr. Clemens Franz (KIT) durchgeführt. Dazu werden zunächst homogene SAMs auf Goldoberflächen generiert, indem entsprechende Thiole über Nacht auf Gold-beschichteten Deckgläschen in einem Wägeschälchen inkubiert werden. Abhängig von den verschiedenen Versuchsanordnungen werden entweder 100 μM Matrixthiol (EG₄-Thiol) oder eine 1 μM :100 μM BG:MeO-Thiolmischung in Isopropanol verwendet. Nach dem Reinigen mit Isopropanol und dem anschließenden Trocknen unter Stickstoff wird das ECad-EC1-5-SNAP-12His Protein auf diesen Oberflächen für 2h inkubiert.

Für die Einzelzellmessungen wird ein JPK *Nanowizard* II AFM (JPK Instruments) verwendet, das auf einem inversen Mikroskop (Zeiss Axio Observer A1) angebracht ist. Als Kraftsensor werden V-förmige Cantilever mit einer Federkonstante von 0,06 N/m (NP-0, Veeco Instruments) verwendet. Vor der Funktionalisierung mit Concanavalin A zur besseren Zellanheftung werden die Cantilever durch Plasmareinigung gesäubert. Die durch Elektroporation transient transfizierten oder untransfizierten L-Zellen werden in Vereinzelungslösung separiert und anschließend in die auf 37°C temperierte AFM Probenkammer überführt. Eine einzelne Zelle wird dann durch kurzen Kontakt (500 pN, 3 sec) mit dem Cantilever aufgenommen und für 5 min zur Verstärkung der Anbindung an den Cantilever inkubiert. Anschließend wird die Zelle mit der beschichteten Oberfläche mit einer Kraft von 1500 pN in Kontakt gebracht. Nach unterschiedlichen Kontaktzeiten (5-300 sec) wird der Cantilever mit einer Geschwindigkeit von 5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ zurückgezogen. Aus der gleichzeitig aufgezeichneten Kraftkurve kann die Abrisskraft der Zelle vom Substrat bestimmt werden. In der Regel werden pro Zelle und Kontaktzeit 2-5 Kraftkurven aufgenommen. Zwischen den einzelnen Kraftmessungen ruhen die Zellen für 2-3 min.

Für jede Zell/Substratkombination wurden mindestens zehn Zellen gemessen.

4.5.2 Mikroskopie

Die Fluoreszenzaufnahmen der mit den E-Cadherin-Fusionsproteinen funktionalisierten Oberflächen wurden mit dem Spinning Disc Mikroskop Cell Observer SD durchgeführt. Dazu wurden optische Schnitte im Abstand von 0,1-0,5

µm aufgenommen, die durch das *Extended Focus* Modul eine maximale *Z-Stack* Projektion bildeten. Mit dem *Smooth* Modul wurde gegebenenfalls das Rauschen des Bildes reduziert und dadurch geglättet. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden ausschließlich durch die Axiovision Release Software 4.8.2 und Adobe Photoshop bearbeitet.

Weitere Fluoreszenzaufnahmen wurden mit den Fluoreszenzmikroskopen DM IRE 2 (Leica) und AxioVert 200M (Zeiss) gemacht. Diese wurden ausschließlich mit der entsprechenden Software Openlab 5.5.0 bzw. Axiovision Release 4.8.2 und Adobe Photoshop bearbeitet.

4.5.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Zelladhäsion auf den Oberflächen wurde durch Auszählen der Zellen nach der indirekten Immunfluoreszenzfärbung am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Dazu wurden die Zellzahlen auf den entsprechenden Bereichen und deren relative Häufigkeit ermittelt. Die Mittelwerte wurden in den Diagrammen angezeigt. Mittels Microsoft Excel wurden die Standardabweichung und der Standardfehler ermittelt.

Die Signifikanz wurde über einen einseitigen, ungepaarten T-Test der einzelnen Mittelwerte errechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Proteinexpression und Aufreinigung

5.1.1 Herstellung der Fusionsproteine

5.1.1.1 Fusion der E-Cadherin-Konstrukte mit einem Histidin-Tag

Um funktionalisierte Oberflächen mit den extrazellulären Cadherin (EC) Domänen von E-Cadherin herzustellen, wurden verschiedene Konstrukte erzeugt, bestehend aus mehreren EC Domänen, einem SNAP-Tag und einem Histidin-Tag, aus 12 Histidinen (Abb. 5.1 A und C).

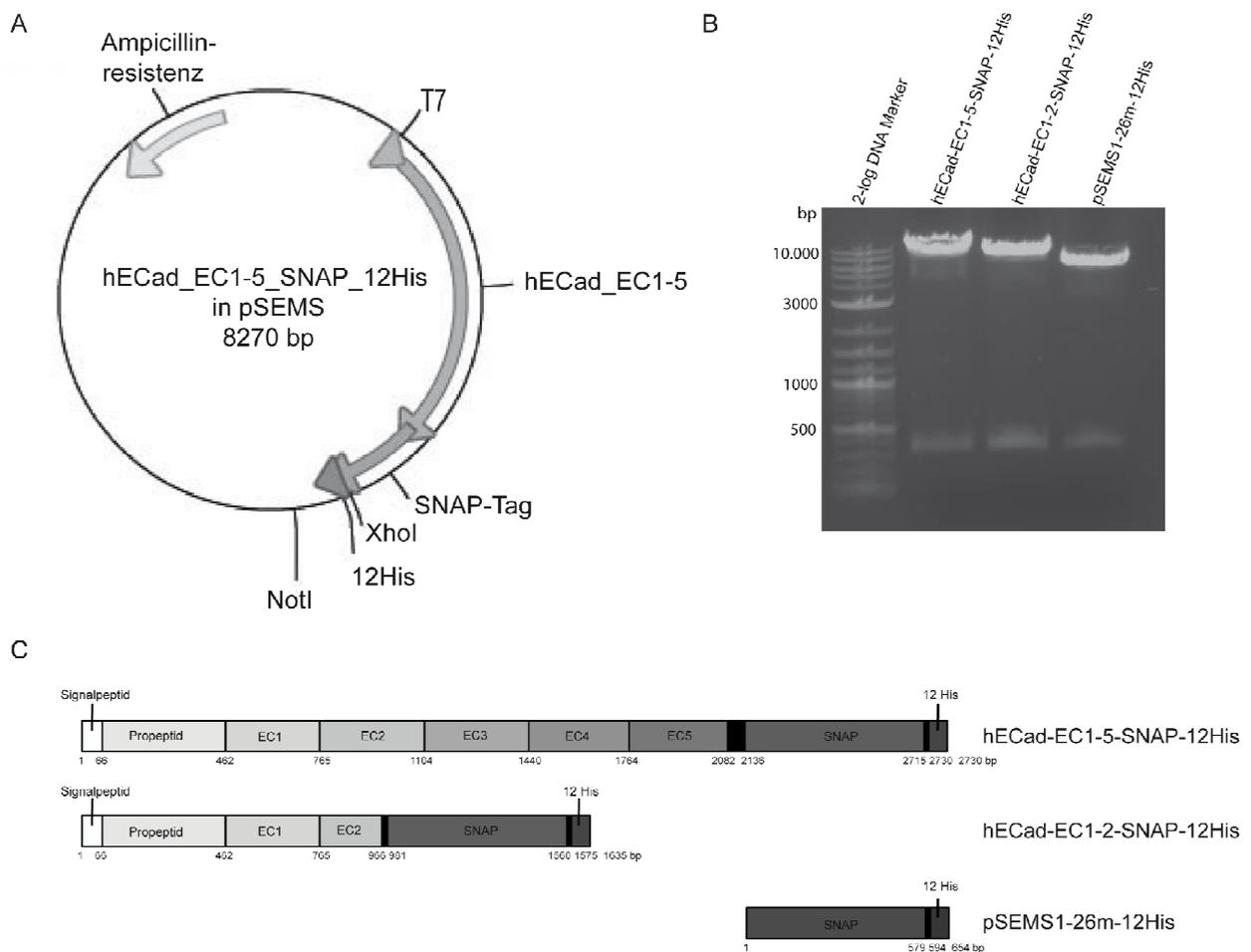


Abb. 5.1: E-Cadherin-Fusionskonstrukte und Leervektor wurden mit einem His-Tag fusioniert.

A: Vektorkarte, beispielhaft hECad-EC1-5-SNAP-12His. Der Histidinanhang wurde durch XhoI und NotI in die verschiedenen Konstrukte eingefügt. **B:** Restriktionsverdau mit XhoI und NotI zur Ligationskontrolle, das Fragment besitzt eine Größe von 360 bp. **C:** Schematische Darstellung der einzelnen Konstrukte. hECad-EC1-5-SNAP-12His besitzt alle EC Domänen von E-Cadherin und hat eine Gesamtgröße von 2730 bp. hECad-EC1-2-SNAP-12His besitzt nur die erste und teilweise die zweite EC Domäne und hat eine Gesamtgröße von 1635 bp. Der Leervektor pSEMS1-26m-12His besitzt den SNAP- und den His-Tag.

Die Konstrukte hECad-EC1-5 und hECad-EC1-2 wurden von Jubin Kashef in den pSEMS1-26m Vektor eingebracht, der einen SNAP-Tag besitzt. Zur Aufreinigung wurde ein His-Tag eingefügt, bestehend aus 12 aufeinanderfolgenden Histidinen. Dafür wurden die Histidine durch PCR des pBAD-SNAP26b-GFP Vektors vervielfältigt, wobei durch die Oligonukleotide im 5' Bereich eine XhoI- und im 3' Bereich eine NotI-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde. Nach der Aufreinigung des Amplifikats wurde dieses mit XhoI und NotI enzymatisch geschnitten und danach in die einzelnen Konstrukte ligiert (siehe Abb. 5.1 B). Ein Stopcodon wurde durch Mutagenese-PCR eingefügt, die Fehlerfreiheit und Vollständigkeit aller Konstrukte durch Sequenzanalysen bestätigt (durchgeführt von der Firma GATC, Konstanz).

5.1.1.2 Herstellung der N-Cadherin-Fusionskonstrukte

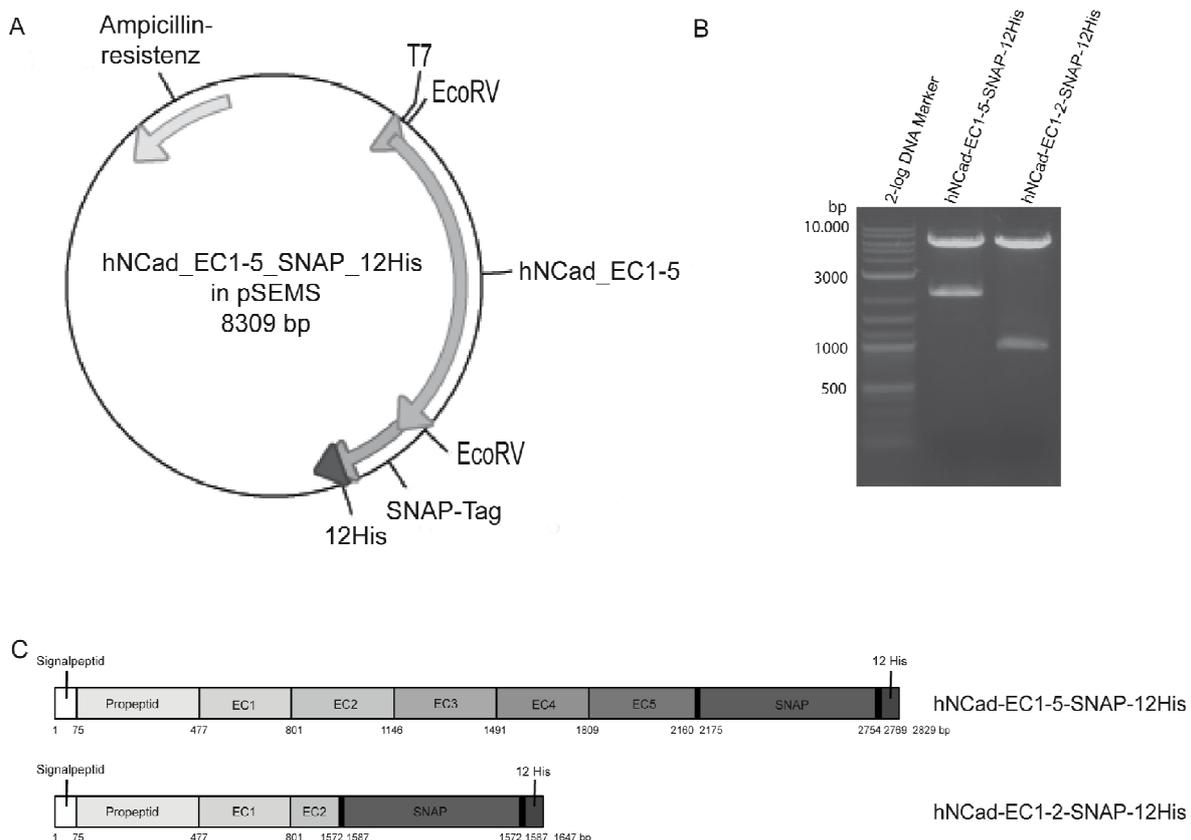


Abb 5.2 : N-Cadherin-Fusionskonstrukte.

A: Vektorkarte, beispielhaft hNCad-EC1-5-SNAP-12His. Die N-Cadherin-Konstrukte wurden über die EcoRV Restriktionsschnittstelle in den pSEMS1-26m-12His Vektor eingebracht. **B:** Restriktionsverdau mit EcoRV zur Ligationskontrolle. hNCad-EC1-5 hat eine Größe von 2160 bp, hNCad-EC1-2 eine Größe von 1572 bp. **C:** Schematische Darstellung der verschiedenen Konstrukte: hNCad-EC1-5-SNAP-12His besitzt alle EC Domänen von N-Cadherin und hat eine Gesamtgröße von 2829 bp, hNCad-EC1-2-SNAP-12His besitzt die erste und teilweise die zweite EC Domäne und hat eine Größe von 1647 bp.

Die extrazellulären Domänen des humanen N-Cadherins wurden in den pSEMS1-26m-12His Vektor eingebracht.

Dafür wurde auf zwei N-Cadherin-Konstrukte zurückgegriffen, die im Rahmen einer Diplomarbeit (A. Kaczorowski, 2009) ähnlich den E-Cadherin-Konstrukten (Abb 5.1 C) erstellt und in den pGEMT Vektor ligiert wurden: hNCad-EC1-5 und hNCad-EC1-2 (siehe Abb. 5.2).

Die N-Cadherin-Konstrukte wurden durch einen Restriktionsverdau mit EcoRV aus pGEMT ausgeschnitten und in den pSEMS1-26m-12His Vektor ligiert. Die nachfolgende Sequenzierung (durchgeführt von der Firma GATC, Konstanz) bestätigte die fehlerfreie und richtige Insertion.

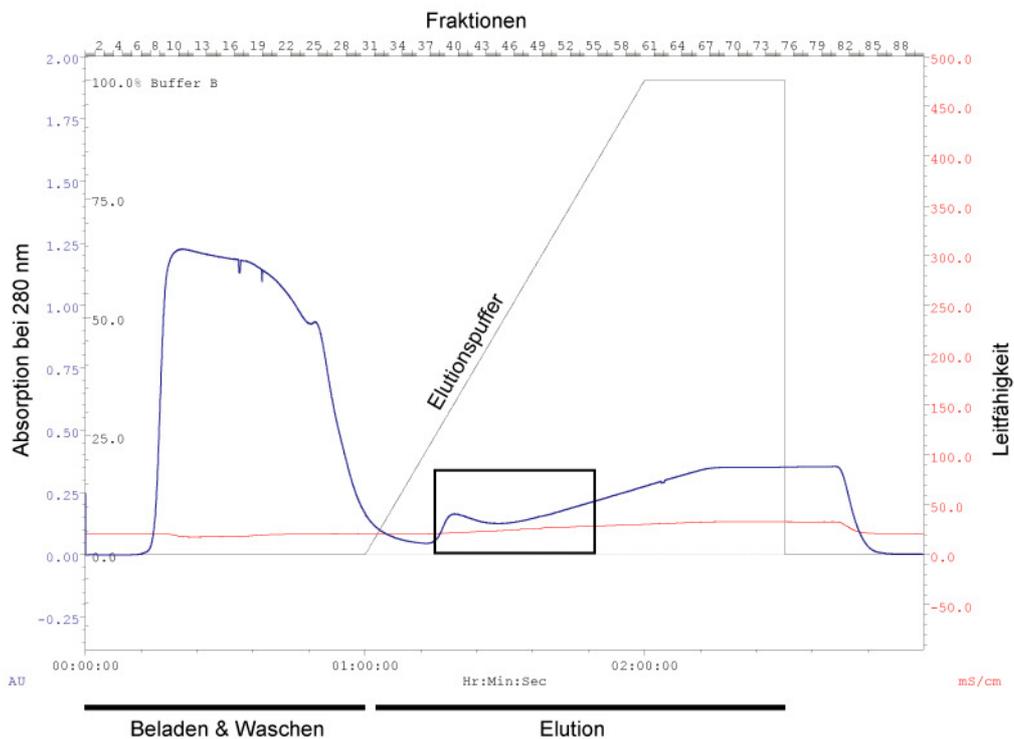
5.1.2 Proteinexpression und Aufreinigung

Die in Abschnitt 5.1.1.1 dargestellten E-Cadherin-Fusionskonstrukte sollten nun durch eukaryotische Expression gewonnen werden. Das hECad-EC1-5-SNAP-12His (E15), das zusätzlich zu dem SNAP- und His-Tag die gesamte Ektodomäne von E-Cadherin aufweist und das hECad-EC1-2-SNAP-12His (E12), das zusätzlich nur die erste und Teile der zweiten EC Domäne von E-Cadherin besitzt, wurden in HEK 293 Zellen rekombinant exprimiert. Diese wurden stabil mit E15 oder E12 transfiziert. Aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne wird das rekombinante Fusionsprotein nicht in die Zellmembran eingebaut, sondern gelangt in den Zellkulturüberstand. Dieser wurde gesammelt und aufkonzentriert. Die Fusionsproteine konnten über die Bindung des His-Tags an die Ni²⁺-NTA Affinitätssäule und die nachfolgende Eluierung mittels Imidazol aufgereinigt werden. In der folgenden Western-Blot Analyse waren diese darzustellen.

5.1.2.1 Aufreinigung des hECad-EC1-5-SNAP-12His

Bei der Aufreinigung von E15, in Abb. 5.3 A beispielhaft illustriert, zeigte sich im UV-Chromatogramm nach Zugabe des imidazolhaltigen Elutionspuffers ein deutlicher Anstieg, der die Eluierung des Proteins anzeigte. Die Fraktionen dieses Bereichs wurden in der Western-Blot Analyse untersucht (Abb. 5.3 B) und ließen (angefärbt mit dem SNAP Antikörper) eine spezifische Bande bei 120 kDa erkennen. Eine weitere Bande bei ca. 30 kDa zeigte wahrscheinliche Degradationsprodukte des Fusionsproteins. Die positiven Fraktionen des Western-Blots, in diesem Beispiel die Fraktionen 39 bis 48, wurden aufkonzentriert und die Proteinkonzentration bestimmt. In diesem Fall wurde eine Gesamtproteinkonzentration von 1,17 mg/ml berechnet.

A



B

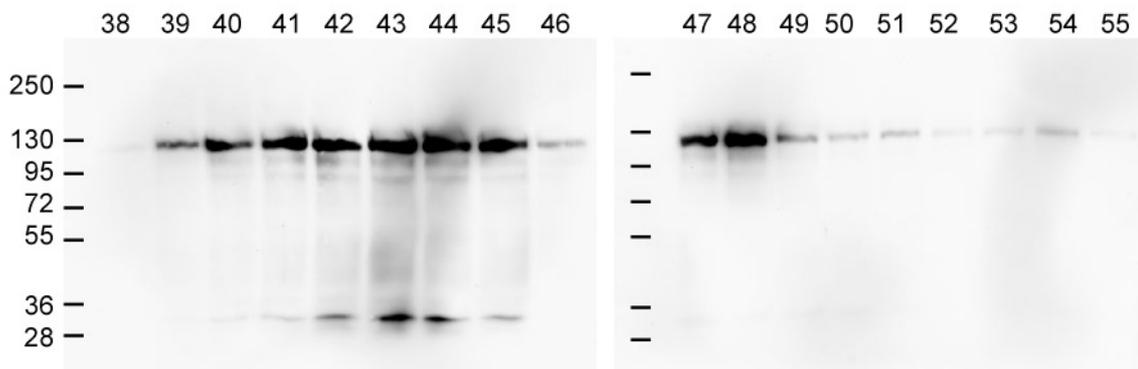


Abb. 5.3: Aufreinigung des hECad-EC1-5-SNAP-12His.

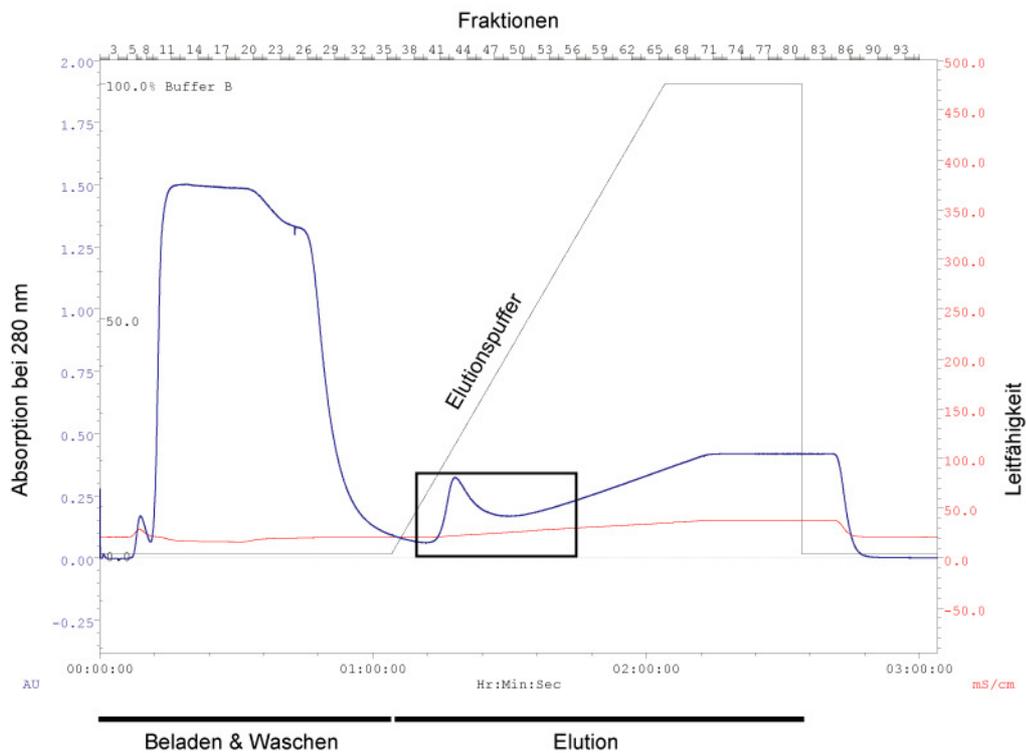
A: Chromatogramm der Aufreinigung über eine Ni²⁺-NTA-Säule an der FPLC Anlage. Der Rohextrakt wurde aufgetragen, und unspezifisch gebundene Proteine wurden durch den Startpuffer abgespült (Beladen und Waschen). Erst durch den Elutionspuffer, der Imidazol im Überschuss liefert, wurde das Protein eluiert, und es war ein kleinerer, aber prominenter Ausschlag im UV-Chromatogramm zu erkennen. Von diesen Fraktionen wurden Proben für die Western-Blot Analyse genommen (Rechteck).

B: Western-Blot Analyse. Mit dem α -SNAP Antikörper wurde die Membran inkubiert und zeigte eine spezifische Bande bei 120 kDa.

5.1.2.2 Aufreinigung des hECad-EC1-2-SNAP-12His

Die Aufreinigung von E12, in Abb. 5.4 illustriert, zeigte im UV-Chromatogramm einen prominenten Ausschlag nach Zugabe des Elutionspuffers. Die positiven Fraktionen wurden in der Western-Blot Analyse untersucht und ließen in der SNAP-Antikörperfärbung eine deutliche Bande bei 55 kDa erkennen.

A



B

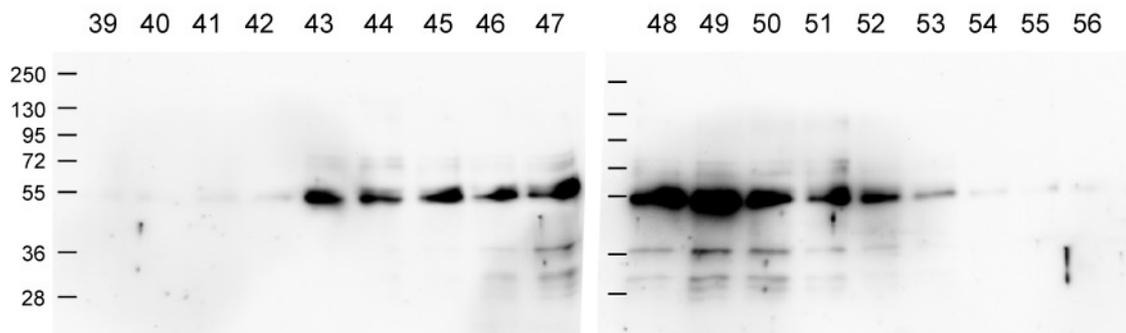


Abb. 5.4: Aufreinigung des hECad-EC1-2-SNAP-12His.

A: Chromatogramm der Aufreinigung über eine Ni²⁺-NTA-Säule an der FPLC Anlage. Der Rohextrakt wurde aufgetragen, und unspezifisch gebundene Proteine wurden durch den Startpuffer ab gespült (Beladen und Waschen). Erst durch den Elutionspuffer, der Imidazol im Überschuss liefert, wurde das Protein eluiert, und es war ein kleinerer, aber prominenter Ausschlag im UV-Chromatogramm zu erkennen. Von diesen Fraktionen wurden Proben für die Western-Blot Analyse genommen (Rechteck).

B: Western-Blot Analyse. Mit dem α -SNAP Antikörper wurde die Membran inkubiert und zeigte eine spezifische Bande bei 55 kDa.

Kleinere Degradationsbanden waren zu erkennen. Die positiven Fraktionen wurden aufkonzentriert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration betrug in diesem Fall 1,3 mg/ml.

5.2 Charakterisierung verschiedener Zelllinien

5.2.1 Cadherin-Profil der L-Zellen

L-Zellen sind murine Fibroblasten, die sich sehr gut zur Transfektion eignen. In der Western-Blot Analyse konnte keine Expression von E- oder N-Cadherin nachgewiesen werden (Abb. 5.5 A).

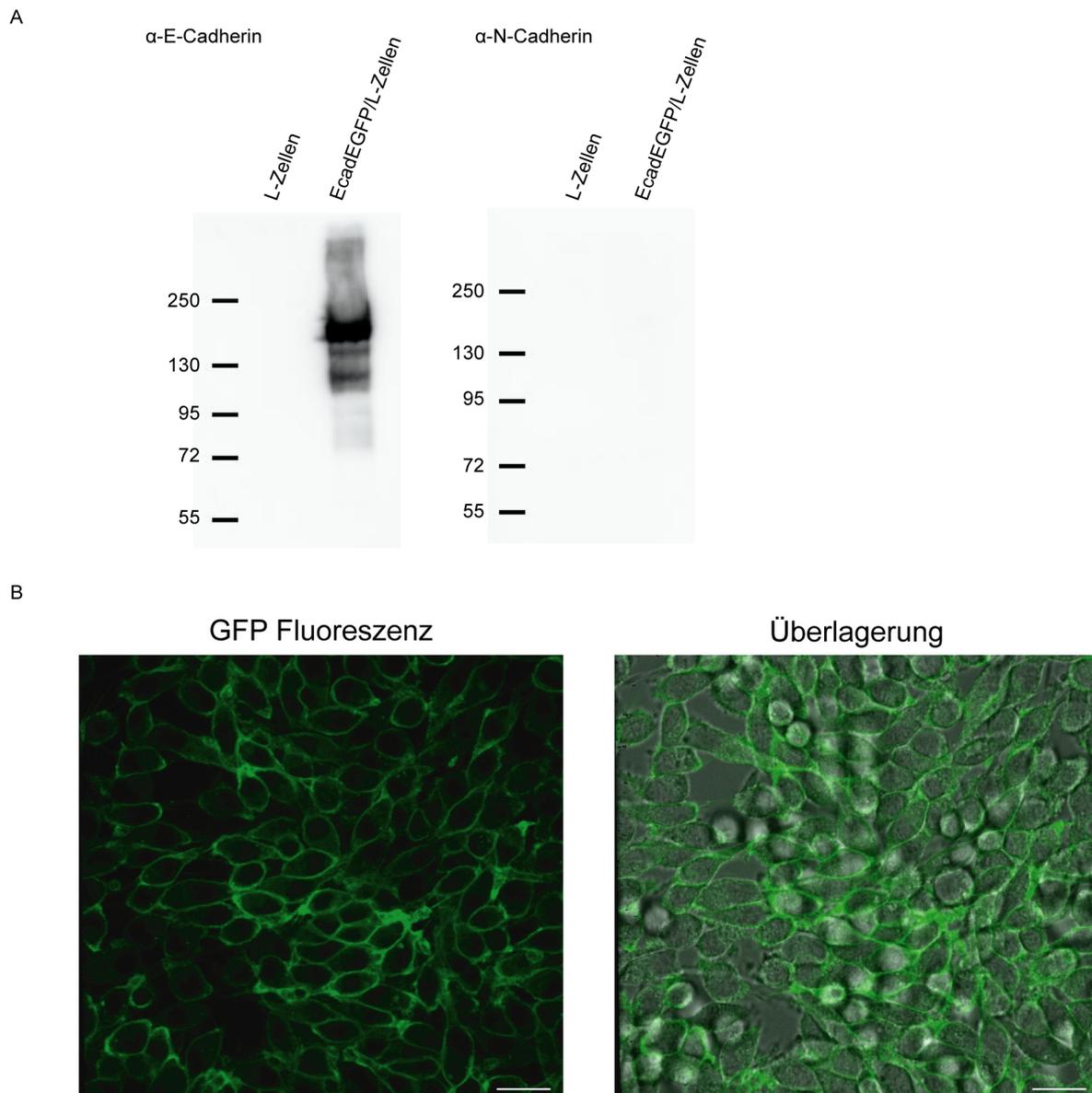


Abb. 5.5: Cadherin-Profil der L-Zellen.

A: Western-Blot Analyse. Links: Der Antikörper, gegen E-Cadherin gerichtet (α -H108), zeigt bei den mit EcadEGFP stabil transfizierten L-Zellen eine Bande bei ca. 150 kDa. Rechts: Der N-Cadherin Antikörper zeigt keine positiven Banden.

B: Dargestellt ist die Fluoreszenzaufnahme der stabil transfizierten EcadEGFP/L-Zellen. Links: GFP-Fluoreszenz, rechts: Überlagerung DIC-Bild und GFP-Fluoreszenz.

E-Cadherin: 120 kDa, GFP: 26 kDa, N-Cadherin: 130 kDa. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Die real-time PCR von L-Zellen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden für E- und N-Cadherin durchgeführt. Es konnte keine überzeugende Expression der beiden Cadherine nachgewiesen werden. E-Cadherin zeigte einen geringen Ausschlag in der Schmelzkurve, jedoch erst bei sehr hohen Ct Werten (30-32). Für N-Cadherin wurden keine bzw. deutlich höhere Ct-Werte (34-36) angezeigt.

Die stabile Transfektion der L-Zellen mit hE-Cadherin-EGFP (ECadEGFP) zeigte positive Zellen in der Fluoreszenzaufnahme (Abb. 5.5 B). In den Zellmembranen war ein deutliches GFP-Signal zu erkennen. In der Western-Blot Analyse (Abb. 5.5 A) war eine Bande bei ca. 150 kDa festzustellen, die auf das Fusionsprotein schließen lässt, bestehend aus hE-Cadherin, 120 kDa, und GFP, 26 kDa.

5.2.2 W4 – murine embryonale Stammzellen (W4 mES Zellen)

Um ihre Pluripotenz zu erhalten, werden W4 mES Zellen auf *Feederzellen* kultiviert (Abb. 5.6 A), zusätzlich benötigen sie LIF und FCS.

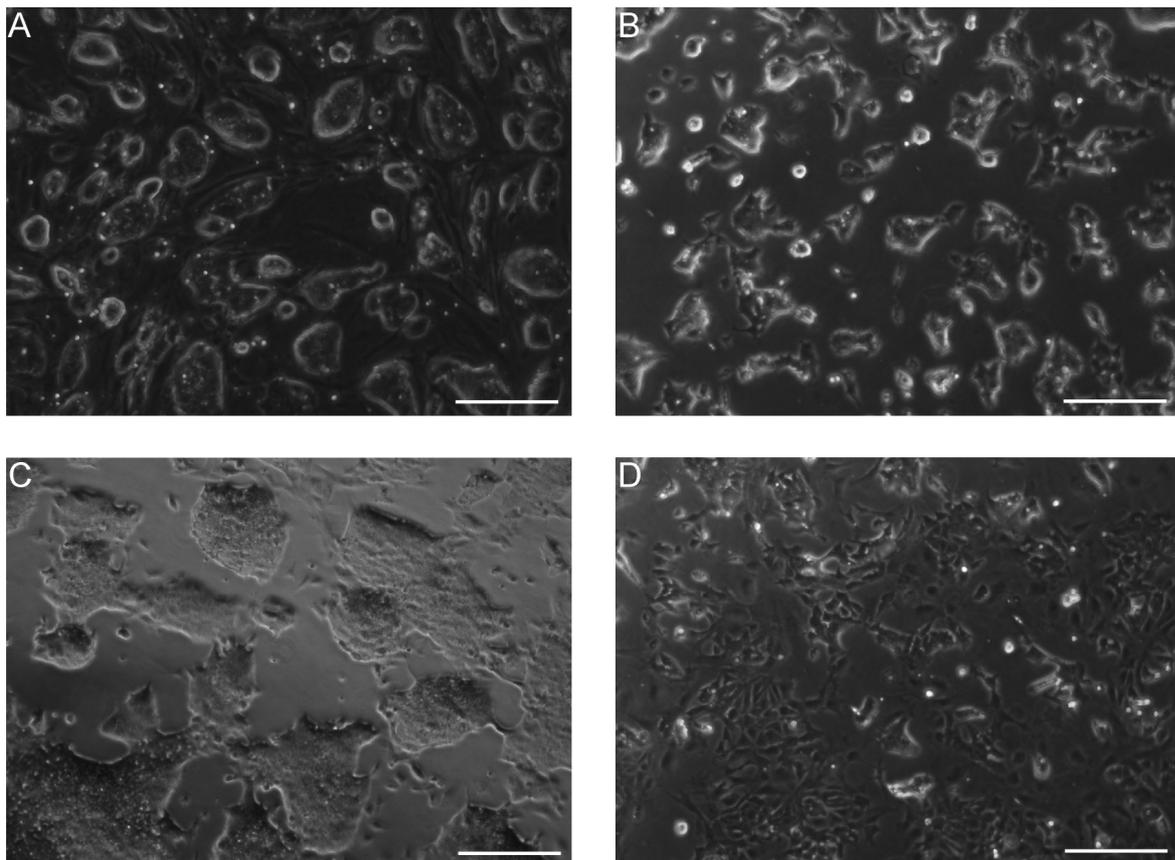


Abb. 5.6: DIC-Bilder der W4 murinen embryonalen Stammzellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen.

A: W4 mES Zellen auf *Feederzellen*. **B:** W4 mES Zellen auf 0,1% Gelatine, mit LIF, 1 Tag kultiviert. **C:** W4 mES Zellen auf 0,1% Gelatine, mit LIF, 3 Tage kultiviert. **D:** W4 mES Zellen auf 0,1% Gelatine, ohne LIF kultiviert.

Maßstabsbalken: 200 µm.

Auch eine Kultivierung auf 0,1% Gelatine ist möglich, jedoch zeigten die Stammzellen dabei schon erste Veränderungen in ihrer Morphologie.

Die mES Zellen saßen auf *Feederzellen* sehr eng in Kolonien beieinander. Die Kolonien bestanden aus nebeneinander und übereinander liegenden mES Zellen und bildeten eine runde und abgegrenzte Struktur (Abb. 5.6 A). Auf Gelatine kultiviert, saßen die mES Zellen ebenfalls in Kolonien. Diese waren nicht mehr vollständig rund sondern fransig, und einzelne Zellen wanderten aus diesen aus (Abb. 5.6 B).

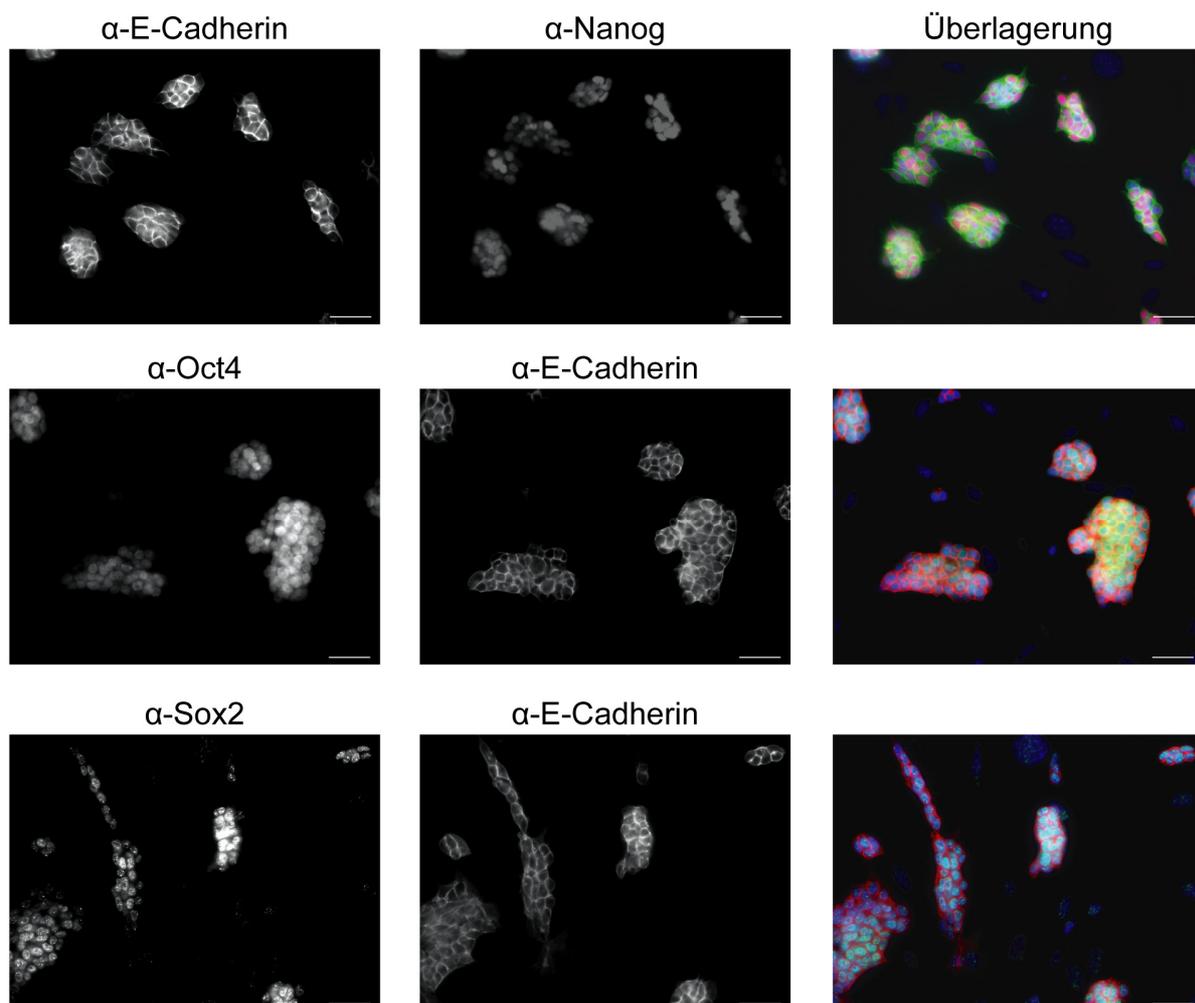


Abb. 5.7: Fluoreszenzaufnahmen der W4 mES Zellen auf *Feederzellen* kultiviert.

Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen der W4 mES Zellen, die auf Feederzellen kultiviert wurden.

Oben: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin (grün, links) und Nanog (rot, Mitte).

Mitte: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen Oct4 (grün, links) und E-Cadherin (rot, Mitte).

Unten: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen Sox2 (grün, links) und E-Cadherin (rot, Mitte).

Rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau).

Maßstabsbalken: 20 µm.

Dies wurde mit Dauer der Kultivierung noch verstärkt: Nach 3 Tagen auf Gelatine waren deutlich abgeflachte, fransige Kolonien zu erkennen, zum Teil vereinigten sie sich zu großen Kolonien. Zudem waren die mES Zellen teilweise vereinzelt (Abb. 5.6

C). Die Kultivierung ohne LIF zeigte die größten Veränderungen: Die Zellen waren größtenteils vereinzelt, nur noch selten waren Kolonien zu erkennen, und die Zellen zeigten eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie (Abb. 5.6 D).

Nicht nur in der Morphologie, sondern auch in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung kann man die pluripotenten W4 mES Zellen von den differenzierten unterscheiden. Pluripotente W4 mES Zellen exprimieren E-Cadherin und die Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2. Die Pluripotenz der W4 mES Zellen wurde in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung durch diese Marker bestätigt (Abb. 5.7).

5.2.2.1 Differenzierung durch die *Hanging-Drop*-Methode

Um mES Zellen *in-vitro* zu differenzieren, werden ihnen Faktoren entzogen, die sie in ihrem undifferenzierten Zustand erhalten. Dazu wurde die *Hanging-Drop* (HD)-Methode angewandt, in der die Zellen in Aggregaten ohne *Feederzellen* und LIF kultiviert werden. Die Embryoidkörperchen, die sich nach zweitägiger Kultivierung bildeten, wurden abgespült und nach weiteren 3 Tagen ausplattiert (Tag 5).

Unterschiedliche Protokolle der HD-Methode wurden untersucht. Diese unterschieden sich vor allem in der Zellzahl, die eingesetzt und in dem Medium, das verwendet wurde (siehe Tab. 4.6 in Abschnitt 4.2.2.5).

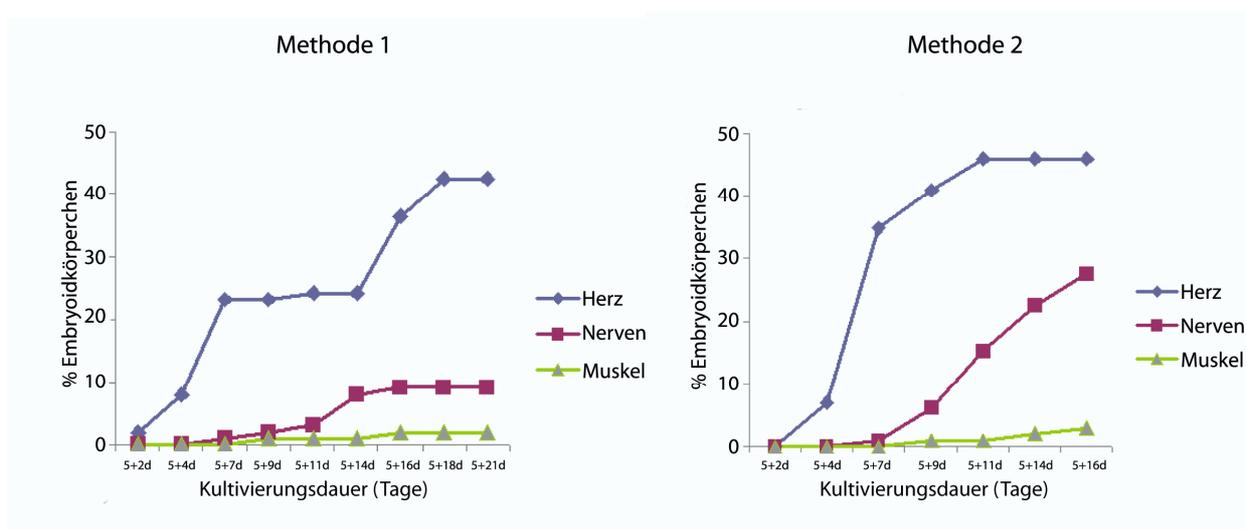


Abb. 5.8: Vergleich der verschiedenen HD-Methoden durch die morphologische Auswertung.

Prozentuale Darstellung der Bildung von mES Zell-abgeleiteten Herzmuskel-, Nerven- und Skelettmuskelzellen. Je 4 Ansätze wurden ausgezählt und morphologisch ausgewertet.

Methode 2 zeigte eine höhere Effizienz in der Ausbildung von mES Zell-abgeleiteten Herzmuskel-, Nerven- und Skelettmuskelzellen.

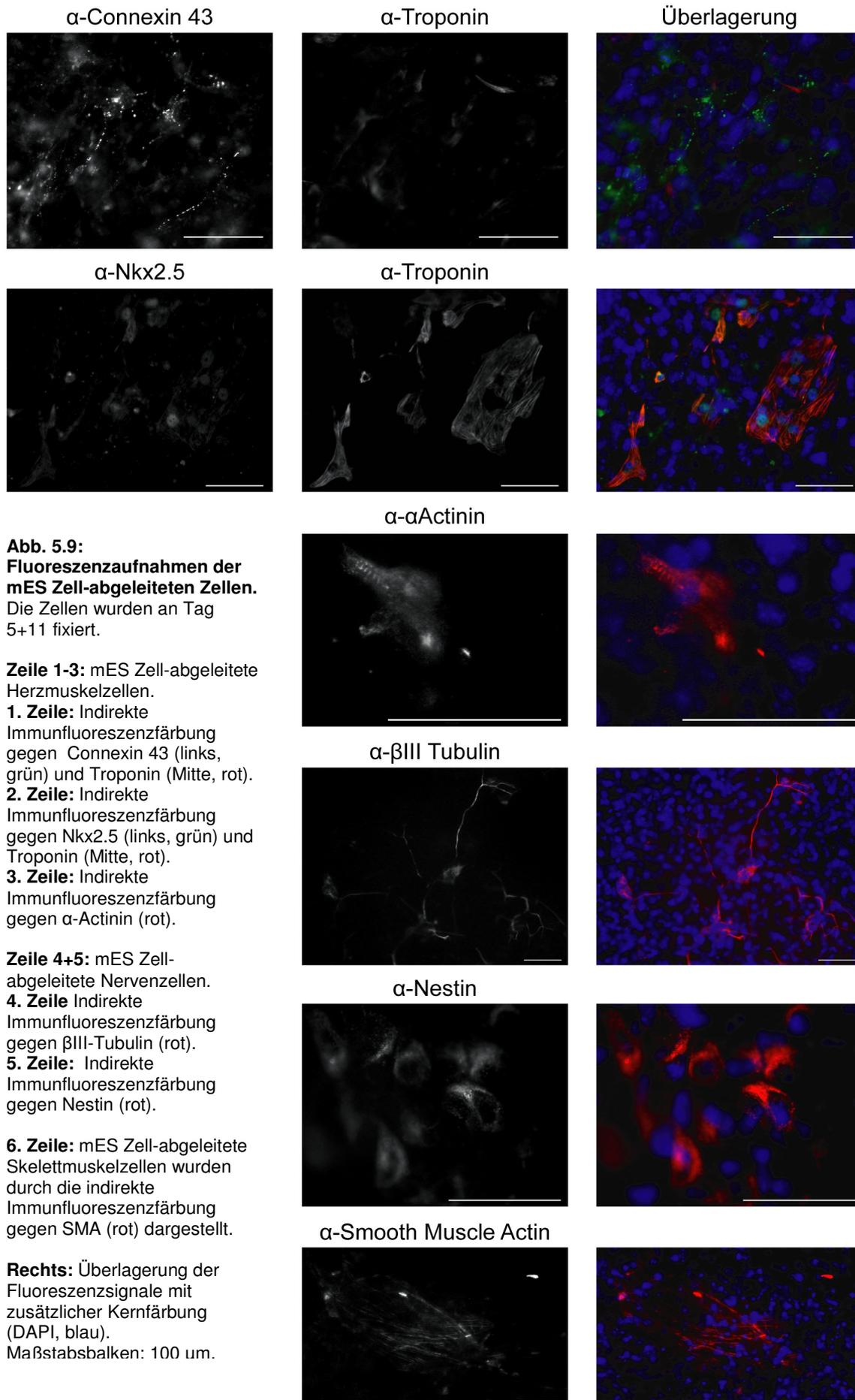


Abb. 5.9:
Fluoreszenzaufnahmen der
mES Zell-abgeleiteten Zellen.
 Die Zellen wurden an Tag
 5+11 fixiert.

Zeile 1-3: mES Zell-abgeleitete
 Herzmuskelzellen.

- 1. Zeile:** Indirekte
 Immunfluoreszenzfärbung
 gegen Connexin 43 (links,
 grün) und Troponin (Mitte, rot).
2. Zeile: Indirekte
 Immunfluoreszenzfärbung
 gegen Nkx2.5 (links, grün) und
 Troponin (Mitte, rot).
3. Zeile: Indirekte
 Immunfluoreszenzfärbung
 gegen α -Actinin (rot).

Zeile 4+5: mES Zell-
 abgeleitete Nervenzellen.

- 4. Zeile** Indirekte
 Immunfluoreszenzfärbung
 gegen β III-Tubulin (rot).
5. Zeile: Indirekte
 Immunfluoreszenzfärbung
 gegen Nestin (rot).

6. Zeile: mES Zell-abgeleitete
 Skelettmuskelzellen wurden
 durch die indirekte
 Immunfluoreszenzfärbung
 gegen SMA (rot) dargestellt.

Rechts: Überlagerung der
 Fluoreszenzsignale mit
 zusätzlicher Kernfärbung
 (DAPI, blau).
 Maßstabsbalken: 100 μ m.

Die beiden Methoden wurden miteinander verglichen durch eine morphologische Auswertung, bei der jeden 2. bis 3. Tag die ausplattierten Embryoidkörperchen auf mES Zell-abgeleitete kardiale Myozyten, mES Zell-abgeleitete Skelettmuskelzellen und mES Zell-abgeleitete Nervenzellen untersucht wurden (Abb. 5.8). Methode 2, bei der 600 Zellen eingesetzt wurden und ein spezielles Differenzierungsmedium verwendet wurde, zeigte eine höhere Effizienz als Methode 1. So förderte Methode 2 das frühere Ausbilden von mES Zell-abgeleiteten Herzmuskelzellen. Schon ab Tag 5+11 waren 45% erreicht, während Methode 1 erst ab Tag 5+21 42% erreichte. Auch wurden deutlich mehr mES Zell-abgeleitete Nervenzellen gebildet: waren es bei Methode zwei 27%, so erreichte Methode eins 9%. Die Bildung von mES Zell-abgeleiteten Skelettmuskelzellen schien bei beiden Protokollen ähnlich zu verlaufen und lag bei 2% (Methode 1) und 3% (Methode 2).

Die Embryoidkörperchen wurden für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf Glasoberflächen ausplattiert. Aufgrund ihrer Morphologie wurden sie vorsortiert und die entsprechenden spezifischen Antikörper gewählt (Abb. 5.9).

Die mES Zell-abgeleiteten Herzmuskelzellen wurden mit Connexin 43, Troponin T, Nkx2.5 und α -Actinin angefärbt. Connexin 43 ist ein Transmembranprotein, das in den *Gap-Junctions* von Herzmuskelvorläuferzellen zu finden ist. Auch Troponin T ist schon sehr früh in der Herzmuskulatur zu finden. Nkx2.5 ist ein Transkriptionsfaktor, der während der frühen Herzentwicklung exprimiert wird. α -Actinin ist ein Protein, das an Actin bindet. Bei den mES Zell-abgeleiteten Nervenzellen wurden Nestin und β III-Tubulin angefärbt. Nestin ist ein Intermediärfilament, das als neuronaler Differenzierungsmarker gilt, der in der späteren Differenzierung wieder verschwindet. β III-Tubulin ist als Mikrotubulus Bestandteil vor allem in Neuronen zu finden. Smooth Muscle Actin färbt das Aktin der glatten Muskulatur an.

Wie Abb. 5.9 zeigt, waren all diese Markerproteine in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung nachweisbar.

5.3 W4 mES Zellen auf strukturierten Polystyrol-Oberflächen

Die Adhäsion der W4 mES Zellen wurde auf Polystyrol-Oberflächen (PS-OF) getestet. Die Methode wurde entwickelt, um strukturierte Oberflächen einfach und schnell zu generieren. Dabei entstehen nach UV-Bestrahlung hydrophile Quadrate (mit einer Tiefe abhängig von der Belichtungszeit) und hydrophobe Stege. In der

vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit ca. 120 µm x 120 µm großen Quadraten und einer Tiefe von 30 nm gearbeitet.

Da W4 mES Zellen auf Gelatine kultiviert werden, wurden die Oberflächen mit 0,1% Gelatine inkubiert. Erste Tests zeigten, dass sich die mES Zellen nicht vollständig auf den Quadraten absetzten. Deshalb wurde zusätzlich eine Inkubation mit dem Passivierungsreagenz Pluronic® vorangesetzt. Verschiedene Bedingungen wurden getestet. Der Einfluss einer beginnenden Differenzierung durch LIF Entzug wurde untersucht, zusätzlich auch das Adhäsionsverhalten in Bezug auf FCS. Das FCS liefert viele extrazelluläre Matrixproteine, die das Adhäsionsverhalten verändern könnten.

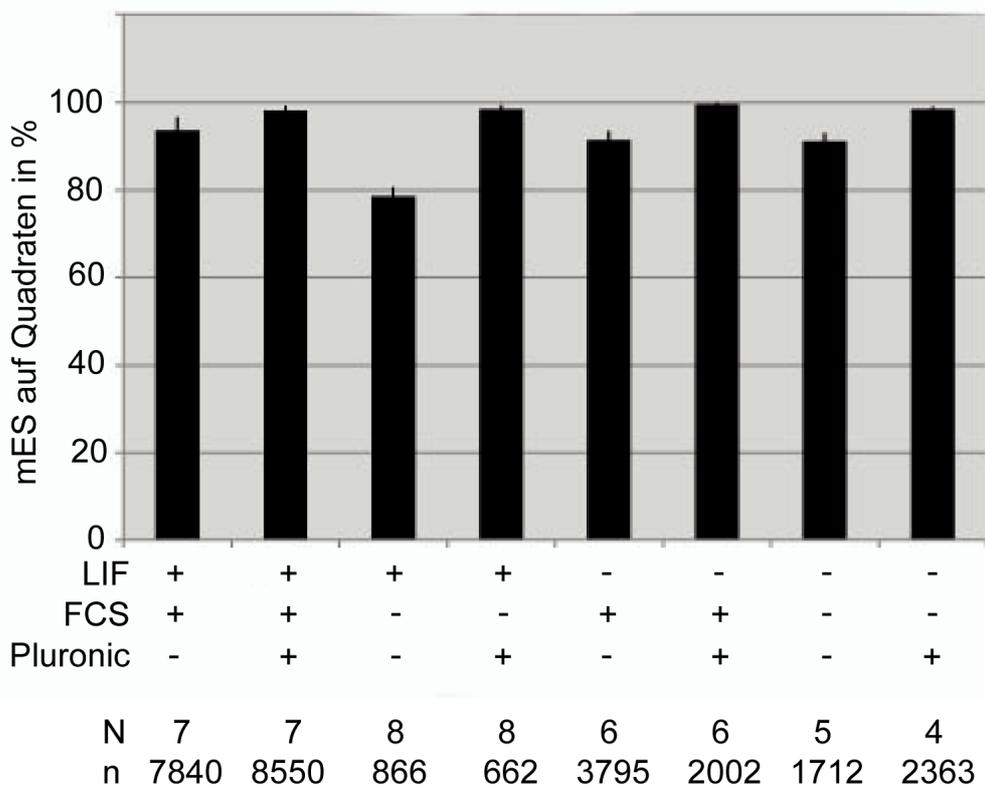


Abb. 5.10: Relative Häufigkeit der W4 mES auf den strukturierten PS-OF unter verschiedenen Bedingungen.

Gezeigt wird die relative Häufigkeit der mES Zellen, die auf den UV-belichteten und Gelatine-adsorbierten Quadraten adhärten. Die mES wurden 4h auf den Oberflächen kultiviert.

Der Standardfehler ist dargestellt. N: Versuchsanzahl; n: absolute Zellanzahl.

Die statistische Darstellung der mES Zellen, die 4 Stunden auf den Oberflächen kultiviert wurden, zeigte sehr klar, dass nur die Inkubation mit Pluronic® einen deutlichen Unterschied erbrachte, bezogen auf ihr absolutes Adhäsionsverhalten. Ohne Pluronic® adhärten 79-94 % der Stammzellen auf den Quadraten, während nach Passivierung fast 100% erreicht wurden (Abb. 5.10). FCS und LIF zeigten in

den absoluten Zellzahlen ihre Wirkung: Ohne LIF oder FCS adhärirten deutlich weniger Zellen auf den Oberflächen.

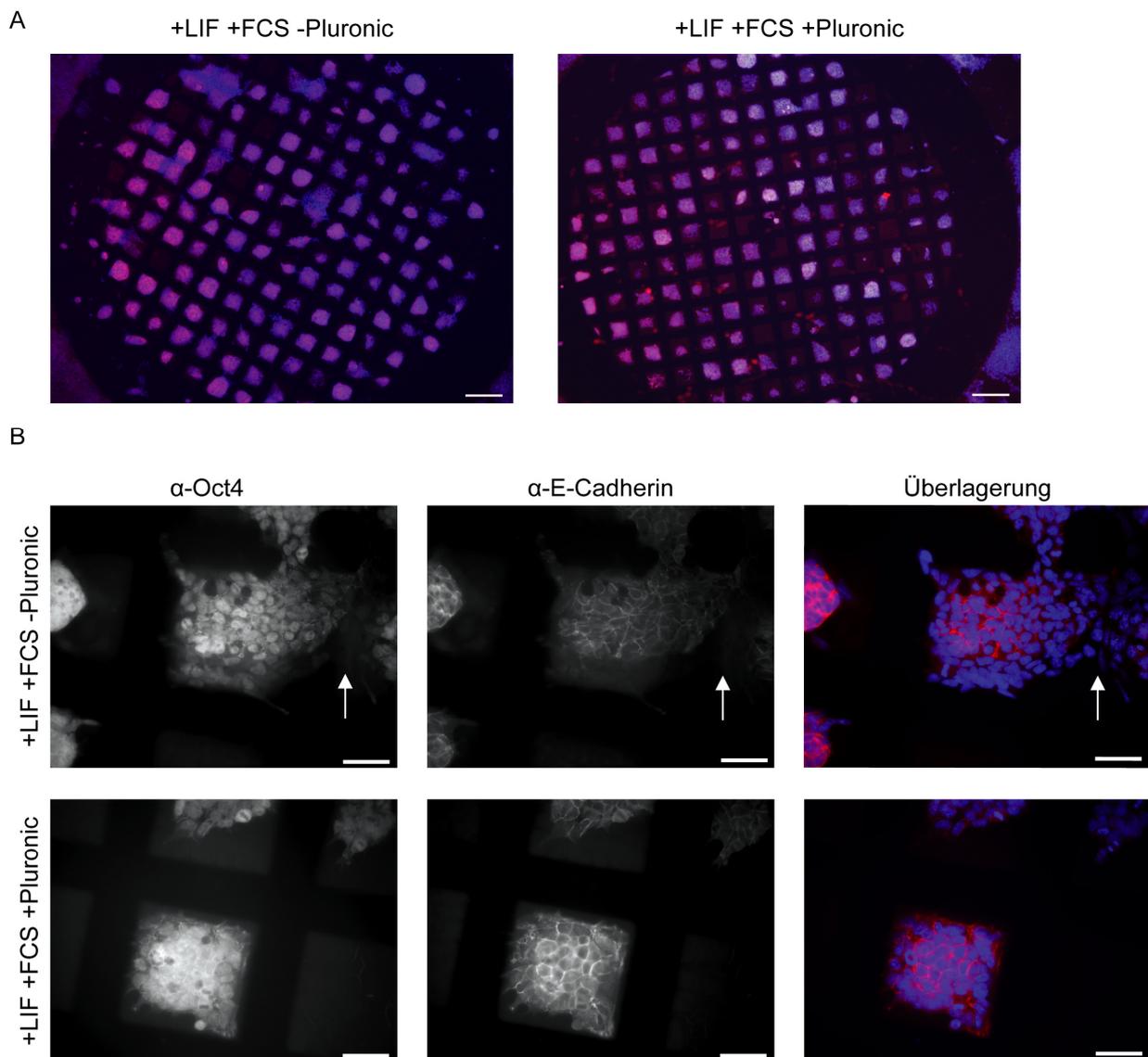


Abb. 5. 11: Pluronic® förderte die selektive Adhäsion der W4 mES Zellen auf den Quadraten.

Fluoreszenzaufnahmen der W4 mES Zellen nach 48h Kultivierung auf den strukturierten PS Oberflächen.

A: Übersichtsaufnahmen der W4 mES Zellen auf den Oberflächen. Gezeigt sind die Überlagerungen der indirekten Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin (rot, DECMA) und einer zusätzlichen Kernfärbung (DAPI, blau). Links: ohne Pluronic®, rechts: mit Pluronic®. Maßstabsbalken: 200 μ m.

B: Detailansicht. Oben: ohne Pluronic®, unten: mit Pluronic®. Links: indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen Oct4 (grün), Mitte: indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin (rot, DECMA), rechts: Überlagerung der Antikörperfärbung gegen E-Cadherin mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau). Pfeile deuten auf den Verlust von E-Cadherin und Oct4.

Maßstabsbalken: 50 μ m.

Eine längere Kultivierung über 48 Stunden auf diesen Oberflächen zeigte in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung ihre Unterschiede. Aufgrund zahlreicher Koloniebildungen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet, dennoch war in den Fluoreszenzbildern ein deutlicher Unterschied zu erkennen (Abb. 5.11). Ohne

Pluronic® Inkubation wuchsen die mES Zellen häufig über die Quadrate hinaus, mit Pluronic® begrenzten sie ihr Wachstum überwiegend auf die Gelatine-adsorbierten Bereiche. Die E-Cadherin und Oct4 Expression war in mES Zellen, die in einem Quadrat lagen, deutlich nachweisbar (Abb. 5.11), während sie bei mES Zellen, die die Quadrate verließen, zumindest teilweise verloren ging. Die mES Zellen, die außerhalb der Quadrate und nicht mehr eng zusammen lagen, zeigten eine deutlich geringere Oct4 und E-Cadherin Färbung (Abb. 5.11 B, oben, Pfeile).

5.4 Funktionalitätstests der verschiedenen Fusionsproteine

5.4.1 Auswertungskriterien

Die aufgereinigten Fusionsproteine (Abschnitt 5.1.2) wurden hier zur Oberflächenfunktionalisierung verwendet. Zunächst sollte gezeigt werden, wie sich L-Zellen und mit hE-Cadherin-EGFP transfizierte L-Zellen (ECadEGFP/L-Zellen) auf den funktionalisierten Oberflächen verhalten. Untransfizierte L-Zellen wurden als Kontrollen verwendet, da in diesen keine deutliche E- oder N-Cadherin Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 5.2.1). Um strukturierte Oberflächen zu generieren, wurde das Microcontact Printing gewählt, bei dem eine Thiol-Lösung auf die Goldoberflächen gestempelt wird. Das Benzylguanin-Thiol, das in dieser Lösung vorhanden ist, wird von dem SNAP-Tag der Fusionsproteine erkannt. Dieser entfernt die Benzylgruppe von dem Guanin, indem er diese an ein Cystein kovalent bindet. Um unspezifische Bindungen der Proteine und später auch der Zellen zu vermeiden, wurden die ungestempelten Flächen zuvor mit einem Matrixthiol passiviert.

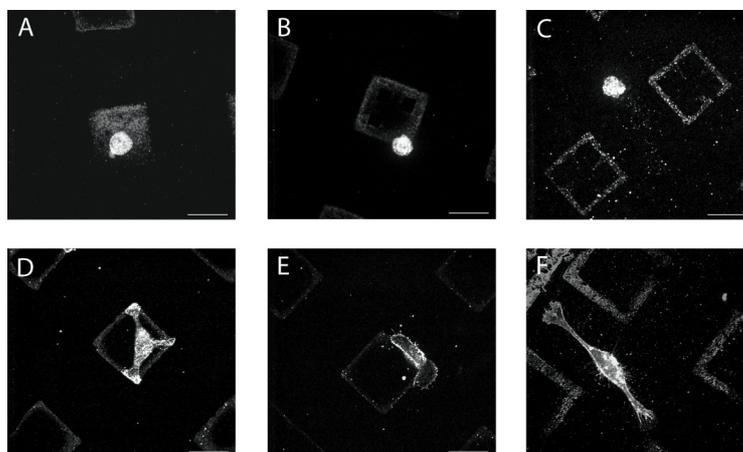


Abb. 5.12: Die verschiedenen Kriterien bei der statistischen Auswertung des Adhäsionsverhaltens.

A: vollständig auf Quadrat – rund
 B: teilweise auf Quadrat – rund
 C: außerhalb – rund
 D: vollständig auf Quadrat – ausgebreitet
 E: teilweise auf Quadrat – ausgebreitet
 F: außerhalb – ausgebreitet
 Maßstabsbalken: 20 µm.

Die Zellen wurden 2 Stunden oder über Nacht (18-20 h) auf den Oberflächen kultiviert. Um das spezifische Adhäsionsverhalten zu untersuchen, wurde in den ersten drei Stunden der Kultivierung Medium ohne FCS verwendet.

In der statistischen Auswertung wurde unterschieden, ob die Zellen vollständig auf den funktionalisierten Quadraten lagen (Abb. 5.12 A+D), die Quadrate nur teilweise berührten (Abb. 5.12 B+E) oder sich auf der Fläche außerhalb befanden (Abb. 5.12 C+F).

Zusätzlich wurde unterschieden, ob die Zellen rund (A-C) oder ausgebreitet (D-F) waren. Pro Ansatz wurde die ganze Stempelfläche ausgezählt (Abb. 5.13), die eine Größe von ca. 9 mm² besitzt.

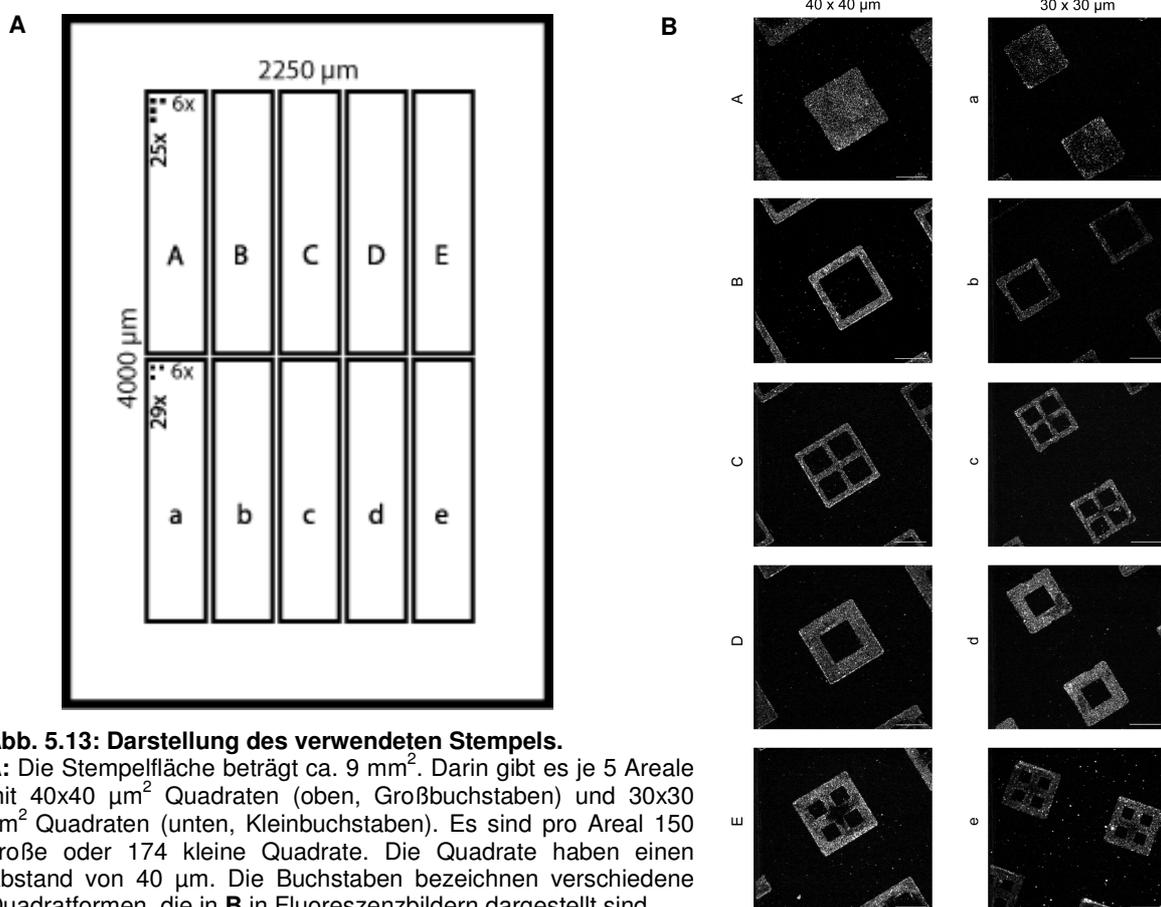


Abb. 5.13: Darstellung des verwendeten Stempels.

A: Die Stempelfläche beträgt ca. 9 mm². Darin gibt es je 5 Areale mit 40x40 µm² Quadraten (oben, Großbuchstaben) und 30x30 µm² Quadraten (unten, Kleinbuchstaben). Es sind pro Areal 150 große oder 174 kleine Quadrate. Die Quadrate haben einen Abstand von 40 µm. Die Buchstaben bezeichnen verschiedene Quadratformen, die in **B** in Fluoreszenzbildern dargestellt sind. Maßstabsbalken: 20 µm.

5.4.2 Adhäsionsverhalten auf E15 Oberflächen

Um die Funktionalität von E15 zu untersuchen, wurden L-Zellen und ECadEGFP/L-Zellen auf den Oberflächen ausgesät.

Nach zweistündiger Kultivierung auf diesen wurden sie fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (Abb. 5.14 und Abb 5.15). Zur statistischen Auswertung wurden die Zellen bezüglich ihrer Lage und Morphologie auf den

Oberflächen ausgezählt. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den L-Zellen und den ECadEGFP/L-Zellen.

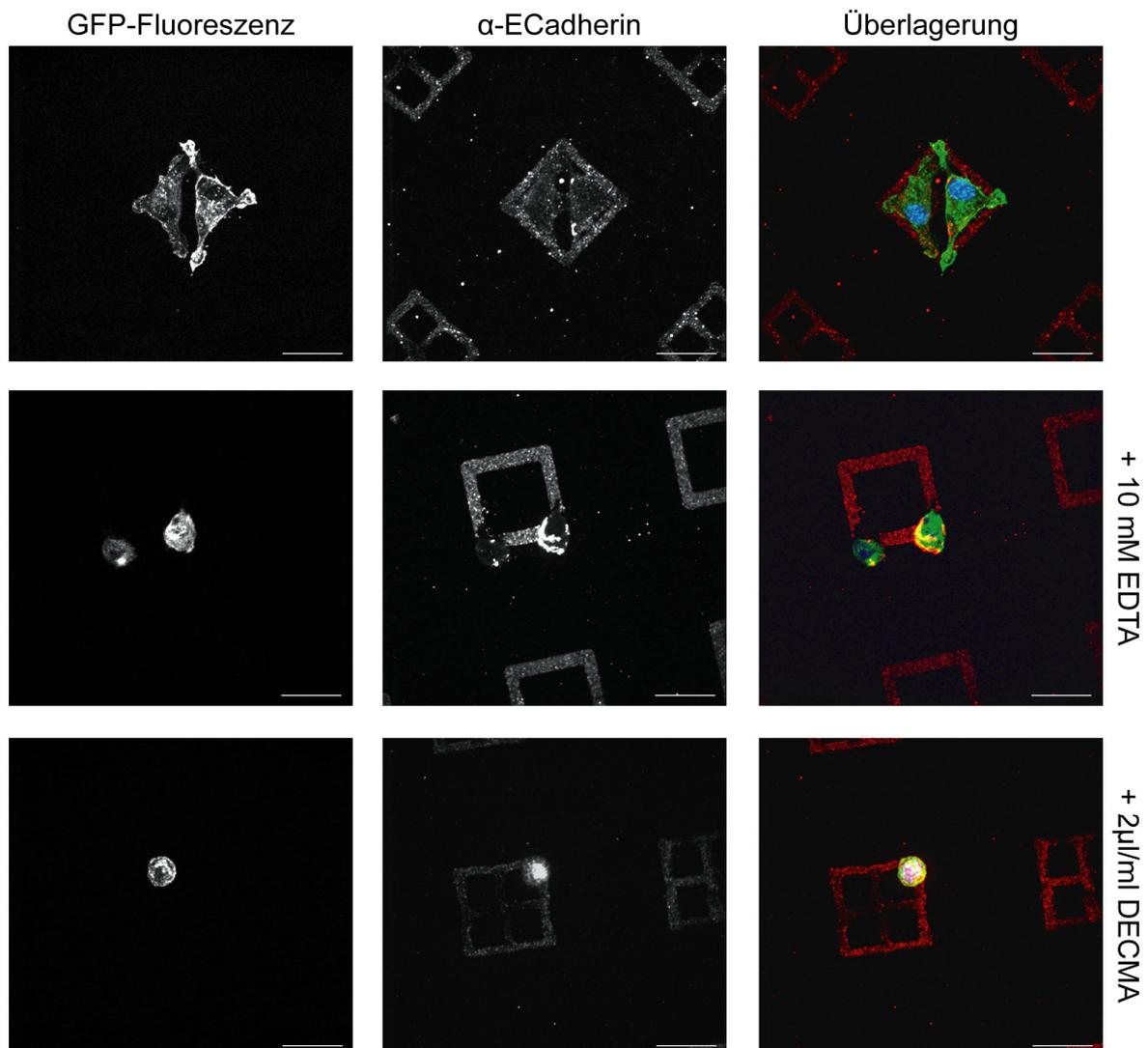


Abb. 5.14: ECadEGFP/L-Zellen auf E15 Oberflächen.

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen der ECadEGFP/L-Zellen auf mit E15 funktionalisierten Bereichen unter verschiedenen Bedingungen. Die Zellen wurden 2h auf den Oberflächen kultiviert (oben), zusätzlich wurden sie in Gegenwart von 10 mM EDTA (Mitte) oder 2 µl/ml des blockierenden Antikörpers DECMA (unten) kultiviert.

Links: GFP-Fluoreszenz, Mitte: indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin (DECMA oder H108, rot), rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau).

Größenmaßstab: 20 µm.

Über 60% der ECadEGFP/L-Zellen adhärirten vollständig und ausgebreitet auf den funktionalisierten Bereichen, dagegen zeigten L-Zellen keine spezielle Präferenz (Abb. 5.16 A).

Um die Ergebnisse verständlicher darzustellen, wurde auf die Aufteilung in „teilweise“ und „vollständig“ auf den Quadraten verzichtet und diese zu einer kumulierten Darstellung zusammengefasst (Abb. 5.16 B, auf Quadraten). Die ECadEGFP/L-

Zellen lagen zu fast 70%, die untransfizierten L-Zellen zu 25% ausgebreitet auf den Quadraten (Abb. 5.15 B). ECadEGFP/L-Zellen lagen zu über 20% rund auf den Quadraten und außerhalb der funktionalisierten Quadrate waren 3% rund und 6% ausgebreitet. Die L-Zellen lagen deutlich häufiger außerhalb der funktionalisierten Flächen, mehr als 40% der L-Zellen lagen rund außerhalb der Quadrate, während über 20% der L-Zellen rund auf den Quadraten lagen.

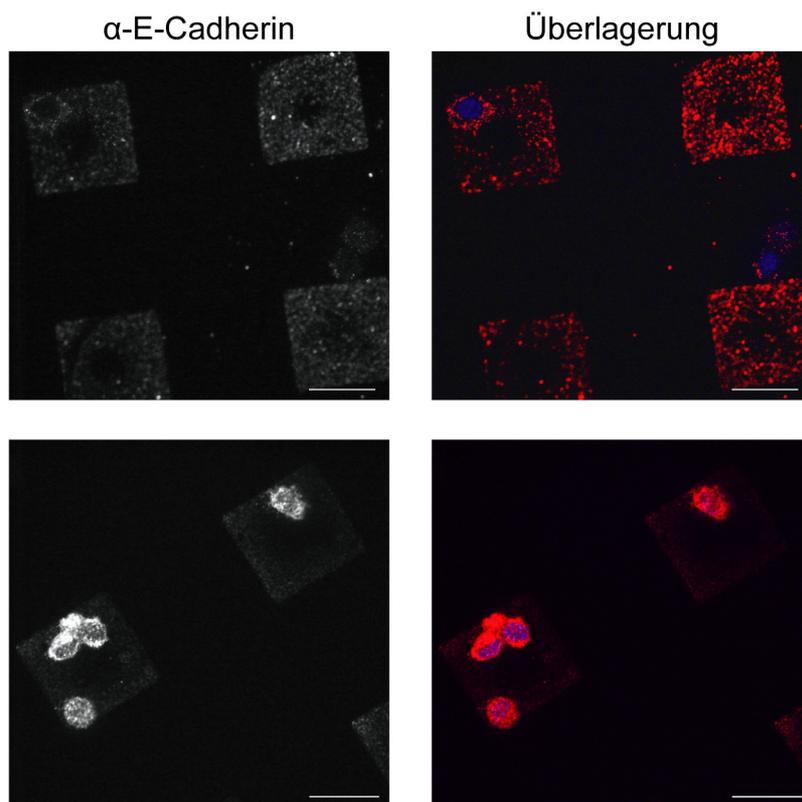


Abb. 5.15: L-Zellen auf E15 Oberflächen.

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen der L-Zellen auf mit E15 funktionalisierten Bereichen unter verschiedenen Bedingungen. Die Zellen wurden 2h auf den Oberflächen kultiviert, zusätzlich in Gegenwart von 10 mM EDTA (unten).

Links: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin (DECMA oder H108, rot), rechts: Überlagerung des Fluoreszenzsignals mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau).

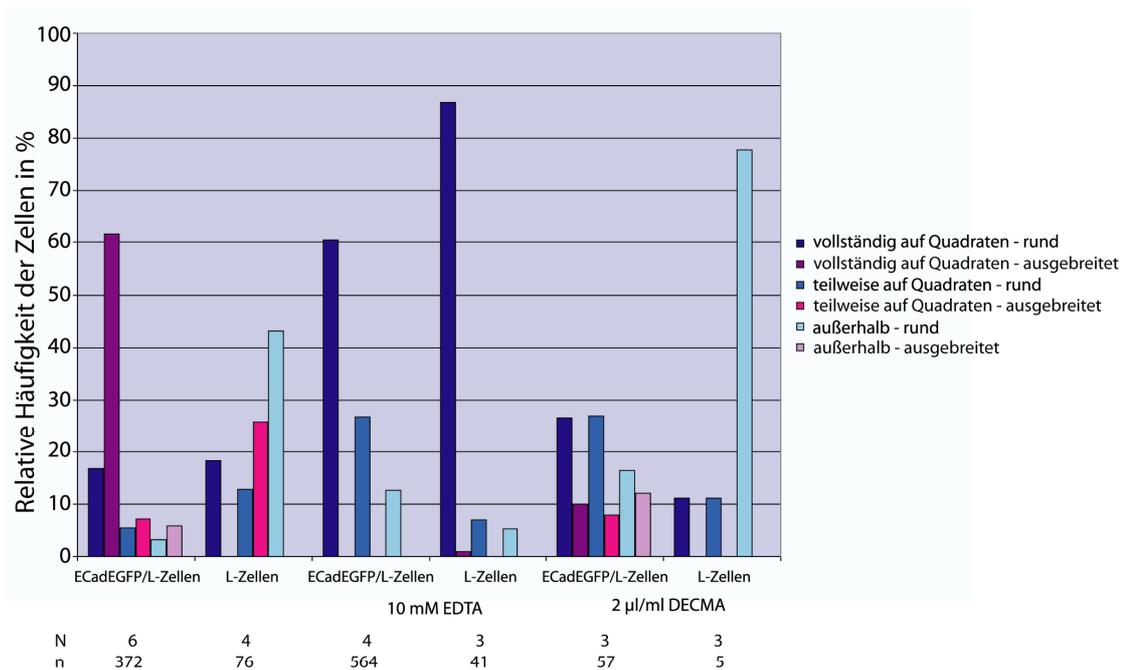
Größenmaßstab: 20 μm .

+ 10 mM EDTA

Zum Ausschluss unspezifischer Adhäsion wurden zwei Substanzen gewählt, die die E-Cadherin Interaktionen unterbinden.

EDTA komplexiert Kationen und verhindert dadurch die Bindung dieser an andere Moleküle. E-Cadherin benötigt Ca^{2+} für seine Stabilität, d.h. die leicht gekrümmte Form der extrazellulären Domäne und die daraus resultierende mögliche homophile Bindung. Diese wird durch das Komplexieren der Ca^{2+} Ionen verhindert. Bei beiden Zelllinien waren die ausgebreiteten Zellen auf den funktionalisierten Oberflächen bei EDTA Inkubation nahezu verschwunden, und fast ausschließlich runde Zellen waren auf den Quadraten und außerhalb zu finden (Abb. 5.14: Mitte, Abb. 5.15: unten und Abb. 5.16: 10 mM EDTA).

A



B

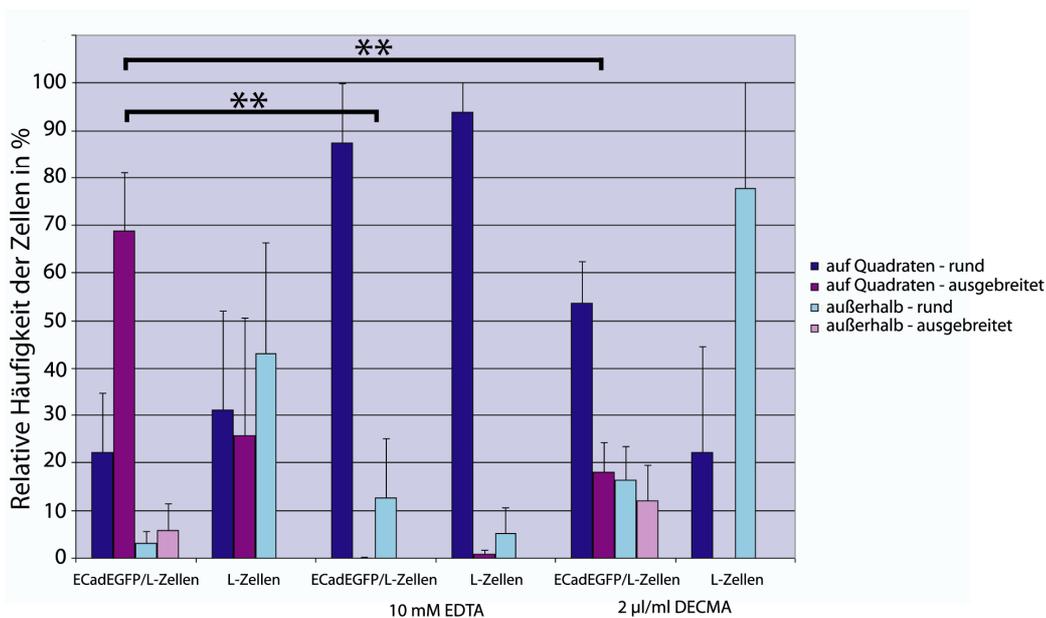


Abb. 5.16: ECadEGFP/L-Zellen zeigten höheres spezifisches Adhäsionsverhalten auf E15 funktionalisierten Oberflächen.

Gezeigt ist die relative Häufigkeit der ECadEGFP/L-Zellen (1., 3., 5. Spalte) und L-Zellen (2., 4., 6. Spalte) nach 2 Stunden Kultivierung, mit zusätzlich 10 mM EDTA (3. und 4. Spalte) oder 2 µl/ml DECMA (5. und 6. Spalte). Unterschieden wurde in „vollständig auf Quadraten“ und „teilweise auf Quadraten“ (nur in **A** gezeigt) und „auf Quadraten-rund“ (blau) oder „auf Quadraten-ausgebreitet“ (violett) und „außerhalb-rund“ (hellblau) oder „außerhalb-ausgebreitet“ (rosa).

N: Versuchsanzahl, n: absolute Zellanzahl.

B: Standardfehler ist dargestellt. Unter Annahme einer Normalverteilung sind die Unterschiede in den Häufigkeiten signifikant: ** : $p < 0,005$ (einseitiger, ungepaarter T-Test).

Untersuchte Werte: ECadEGFP/L-Zellen „auf Quadrat-gespreitet“ (violett) ohne Zusätze zu „10 mM EDTA“ oder zu „2 µl/ml DECMA“.

DECMA, ein spezieller, blockierender Antikörper gegen E-Cadherin, verhindert die homophilen Bindungen der E-Cadherine, indem er an die fünfte extrazelluläre Domäne bindet. Die ausgebreiteten ECadEGFP/L-Zellen waren bei DECMA Inkubation deutlich reduziert, 18% der Zellen adhärten ausgebreitet auf den Quadraten, während 70% der Zellen rund waren. (Abb. 5.14: unten und Abb. 5.16: 2 µl/ml DECMA). L-Zellen zeigten dieses Verhalten noch stärker, die Zellen waren hier ausschließlich rund (Abb. 5.16: 2 µl/ml DECMA).

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass die mit E15 funktionalisierten Oberflächen, die durch Microcontact Printing und der SNAP-Tag Kopplung generiert wurden, eine spezifische über E-Cadherin-Interaktionen vermittelte Adhäsion ermöglichen.

5.4.3 Adhäsionsverhalten auf E15 bei Langzeitkultivierung

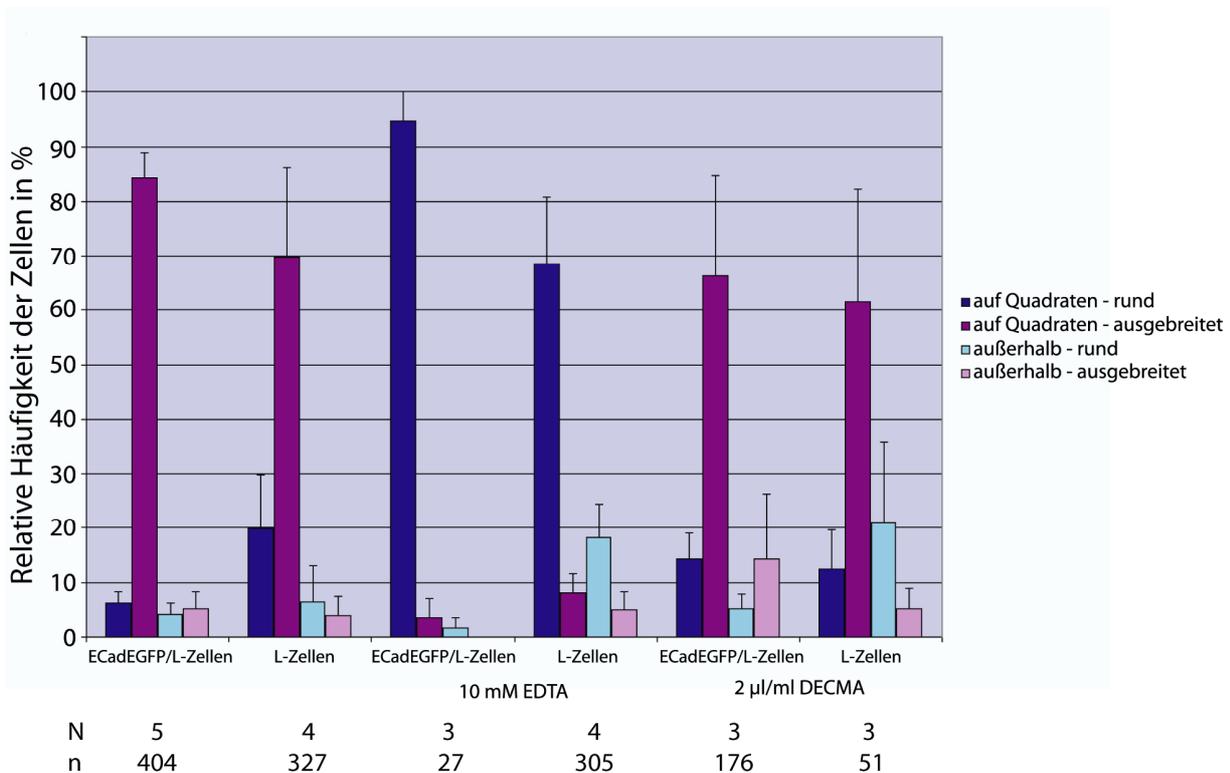


Abb. 5.17: ECadEGFP/L-Zellen und L-Zellen zeigten ähnliches Adhäsionsverhalten auf E15 funktionalisierten Oberflächen nach Langzeitkultivierung.

Gezeigt ist die relative Häufigkeit der ECadEGFP L-Zellen (1., 3., 5. Spalte) und L-Zellen (2., 4., 6. Spalte) nach Kultivierung über Nacht, mit zusätzlich 10 mM EDTA (3. und 4. Spalte) oder 2 µl/ml DECMA (5. und 6. Spalte). Unterschieden wurde in auf Quadraten - rund (blau) oder - gespreitet (violett) und außerhalb - rund (hellblau) oder - gespreitet (rosa).

N: Versuchsanzahl, n: absolute Zellanzahl.

Der Standardfehler ist dargestellt.

Da die L-Zellen nach längerer Kultivierung ohne FCS absterben, wurde nach 3 Stunden das Medium gewechselt. Die Zellen wurden über Nacht auf den Oberflächen kultiviert (insgesamt 18-20 h) und anschließend fixiert.

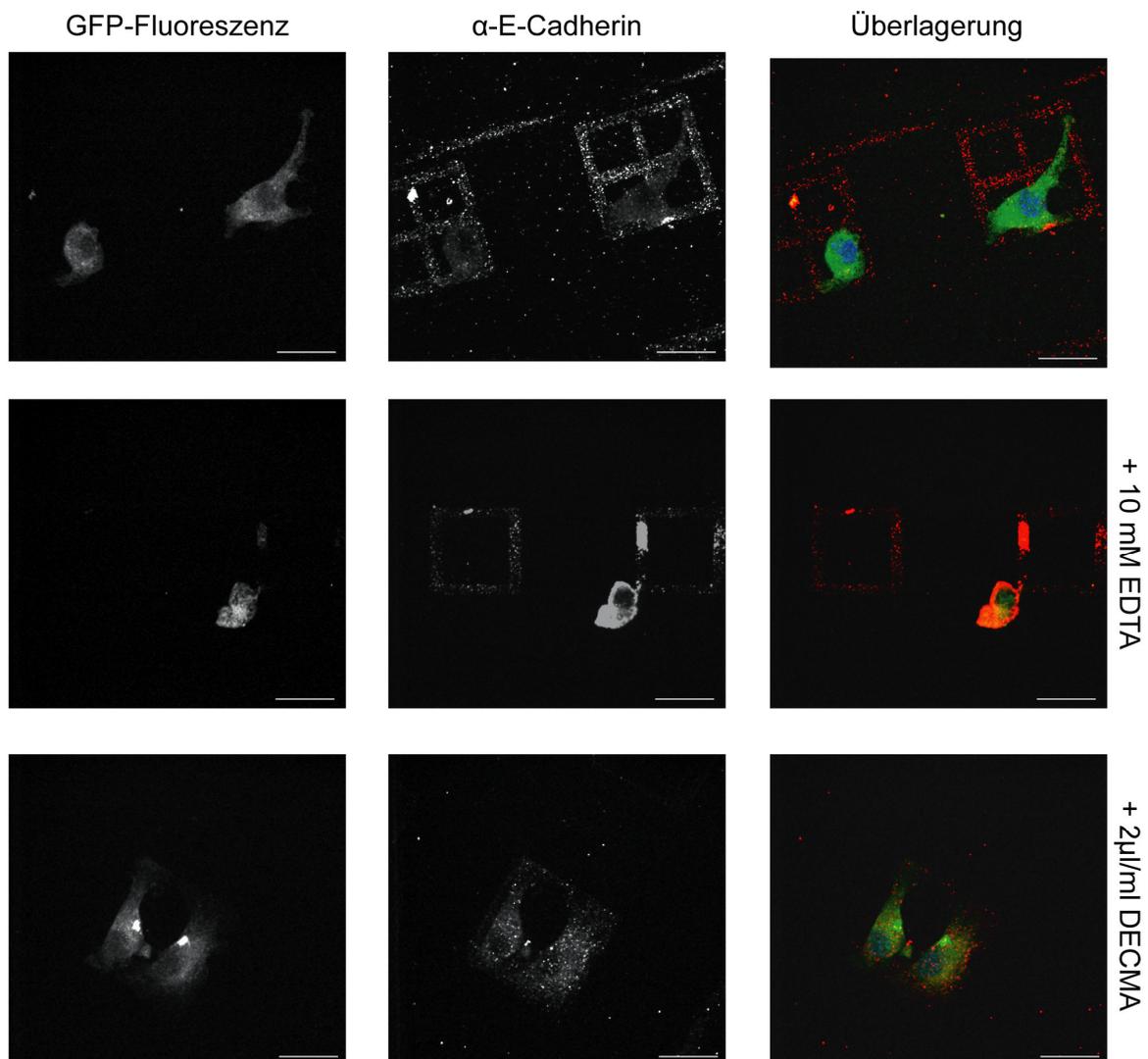


Abb. 5.18: Langzeitkultivierung der ECadEGFP/L-Zellen auf E15 Oberflächen.

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen der ECadEGFP/L-Zellen auf mit E15 funktionalisierten Bereichen unter verschiedenen Bedingungen. Die Zellen wurden 18-20 h auf den Oberflächen kultiviert (oben), zusätzlich wurden sie in Gegenwart von 10 mM EDTA (Mitte) oder 2 μl/ml des blockierenden Antikörpers DECMA (unten) kultiviert.

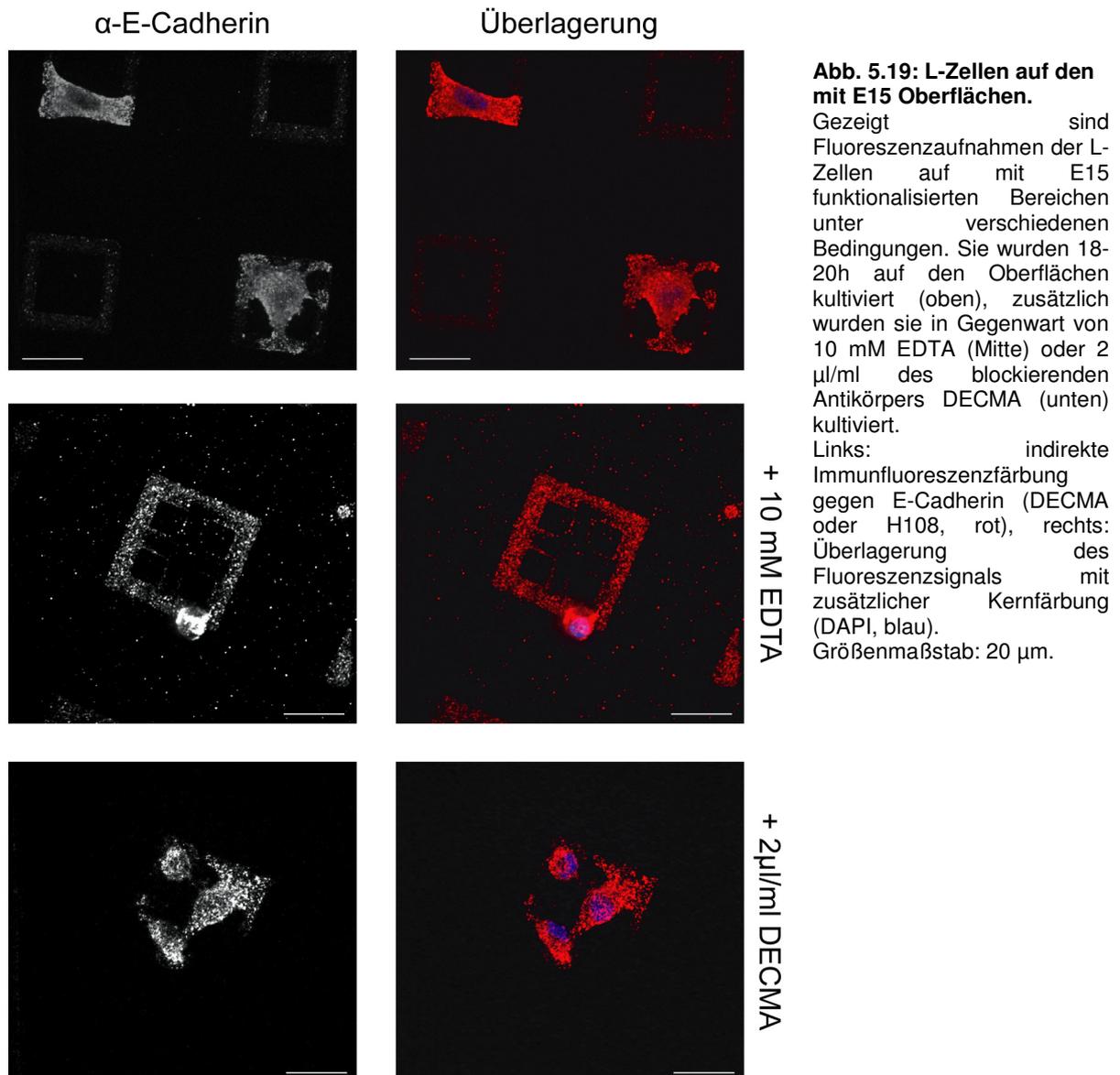
Links: GFP-Fluoreszenz, Mitte: indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin (DECMA oder H108, rot), rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau).

Größenmaßstab: 20 μm.

Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin durchgeführt (Abb. 5.18 und 5.19) und das Adhäsionsverhalten der Zellen statistisch ausgewertet (Abb. 5.17).

ECadEGFP/L-Zellen adhärten zu über 80% als ausgebreitete Zellen auf den Quadraten (Abb. 5.17 und Abb. 5.18). Wurde EDTA zugegeben, waren fast ausschließlich runde Zellen zu erkennen, nur 4% der Zellen lagen ausgebreitet auf den Quadraten. Die E-Cadherin Blockierung mit dem DECMA Antikörper zeigte hier

nicht den Effekt wie nach 2 Stunden. 67% der Zellen lagen ausgebreitet auf den Quadraten. (Abb. 5.17: 2 μ l/ml DECMA, Abb. 5.18: unten).



L-Zellen zeigten nach Kultivierung über Nacht ein ähnliches Verhalten. 70% der Zellen saßen ausgebreitet auf den funktionalisierten Oberflächen. Die EDTA Behandlung führte zu überwiegend runden Zellen, und auch die DECMA Inkubation erbrachte keine deutliche Verminderung der ausgebreiteten Zellen auf den Quadraten (Abb. 5.17 und Abb. 5.19).

Der blockierende E-Cadherin Antikörper DECMA konnte die Adhäsion nicht inhibieren. Sowohl unspezifische Adhäsion als auch das Verbrauchen des Antikörpers aufgrund der langen Inkubationszeit (18-20 h) könnten die Ursache dafür sein.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Zelllinien sich auf den Oberflächen ähnlich verhielten. Sowohl ECadEGFP/L-Zellen als auch untransfizierte L-Zellen lagen größtenteils ausgebreitet auf den funktionalisierten Bereichen. Es konnte durch die Langzeitkultivierung keine spezifische E-Cadherin-vermittelte Adhäsion nachgewiesen werden.

5.4.3.1 β -Catenin Färbung

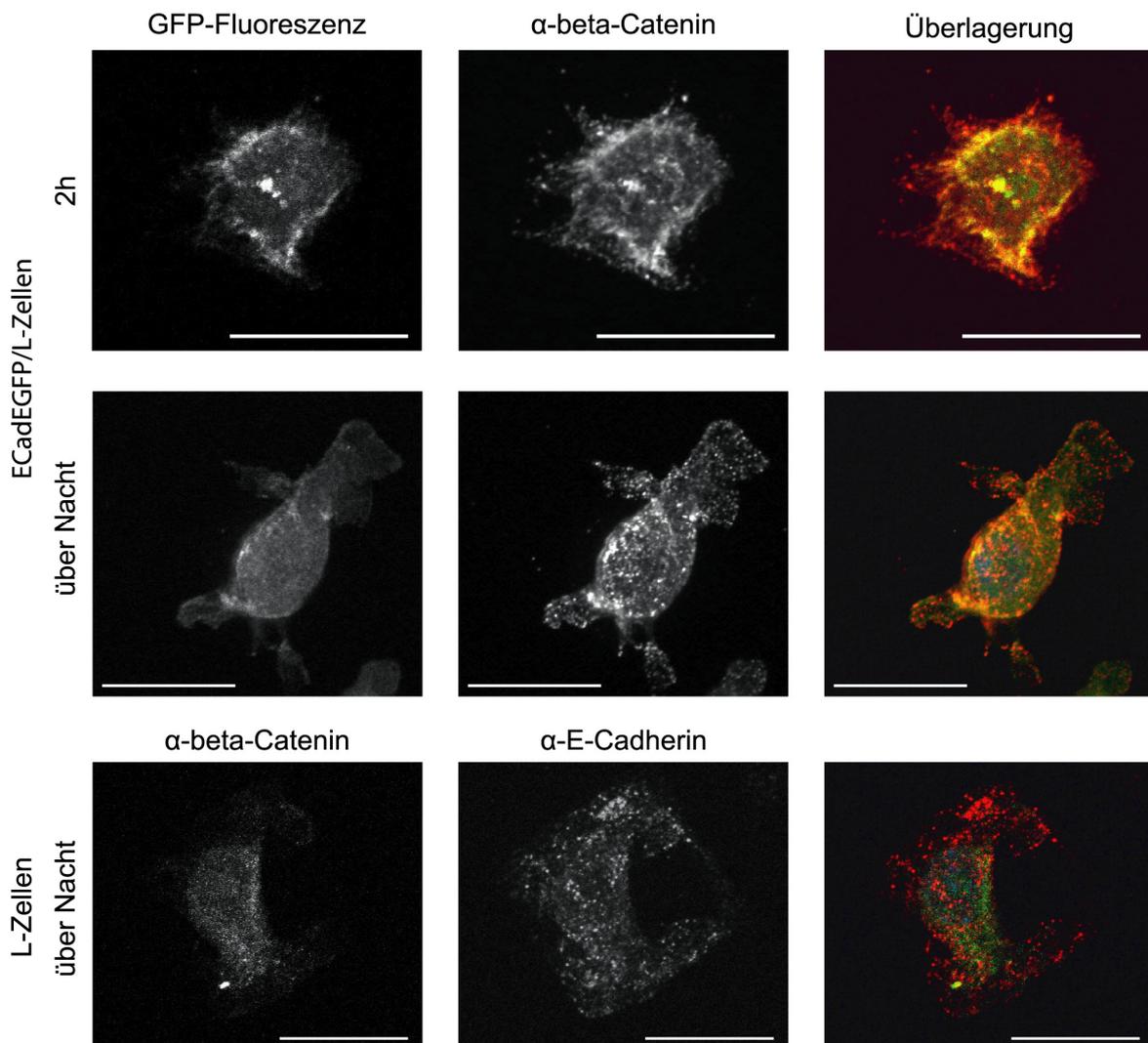


Abb. 5.20: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen β -Catenin.

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen der verschiedenen Zelllinien.

1. und 2. Zeile: ECadEGFP/L-Zellen nach 2h (1. Zeile) und Langzeitkultivierung (2. Zeile). Links: GFP-Fluoreszenz (grün), Mitte: indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen β -Catenin, (rot), rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau).

3. Zeile: L-Zellen nach über Nacht Kultivierung. Es wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen β -Catenin (grün, links) und E-Cadherin (rot, DECMA, Mitte) durchgeführt. Rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau).

Größenmaßstab: 20 μ m.

Nach Kultivierung über Nacht waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien zu erkennen, und auch nach 2 Stunden lagen die L-Zellen

zu über 20% ausgebreitet auf den Quadraten, wenn auch nur unvollständig. Daher wurde eine β -Catenin Färbung durchgeführt. Wenn klassische Cadherine vorhanden sind, bindet β -Catenin an ihre cytoplasmatische Domäne. Dies sollte in der Immunfärbung in einer Co-Lokalisation sichtbar werden.

Die indirekte Immunfärbung der ECadEGFP/L-Zellen zeigte eine deutliche Überlagerung des GFP-Signals und der β -Catenin Antikörperfärbung. Bei 2 Stunden und auch bei der Kultivierung über Nacht waren Co-Lokalisationen zu erkennen (Abb. 5.20, obere und mittlere Zeile).

Dagegen zeigten die L-Zellen eine deutlich geringere β -Catenin Expression. β -Catenin war nur in sehr geringen Mengen in den Ausläufern der L-Zellen zu finden (Abb. 5.20, untere Zeile, grün).

Dies lässt darauf schließen, dass die Adhäsion der L-Zellen auf den funktionalisierten Oberflächen durch eine Cadherin-unabhängige Bindung vermittelt wurde.

5.4.4 Einzelzellkraftmessungen

Für die in Kooperation mit Dr. Clemens Franz (KIT) durchgeführten Einzelzellkraftmessungen wurden homogene Oberflächen verwendet, die durch die Ausbildung eines SAMs aus Thiol-Lösungen auf Goldoberflächen generiert wurden. Nach der anschließenden Funktionalisierung der Thiolschicht mit E15 konnten mit Hilfe der Rasterkraftmikroskop-basierten Einzelzell-Kraftspektroskopie die Adhäsionskräfte transient transfizierter ECadEGFP/L-Zellen oder untransfizierter L-Zellen durch Dr. C. Franz ermittelt werden. Dazu wurden einzelne lebende Zellen am Cantilever des Rasterkraftmikroskops immobilisiert und vorsichtig mit der Oberfläche in Kontakt gebracht. Während der anschließenden Zellretraktion wurde die zum Ablösen der Zelle notwendige Kraft bestimmt. Abhängig von der Kontaktzeit wurden steigende Adhäsionskräfte der ECadEGFP/L-Zellen auf den E15 Oberflächen bis ca. 5 nN gemessen (Abb. 5.21).

Dagegen ergaben Kontrollversuche mit L-Zellen auf E15, ECadEGFP/L-Zellen auf dem Matrixthiol (EG₄-Thiol) oder ECadEGFP/L-Zellen auf E15 in Gegenwart von 2 mM EDTA signifikant reduzierte Adhäsionskräfte. Die geringen Adhäsionskräfte in den Kontrollversuchen zeigten somit, dass überwiegend spezifische E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion auf E15 Oberflächen gemessen wurde.

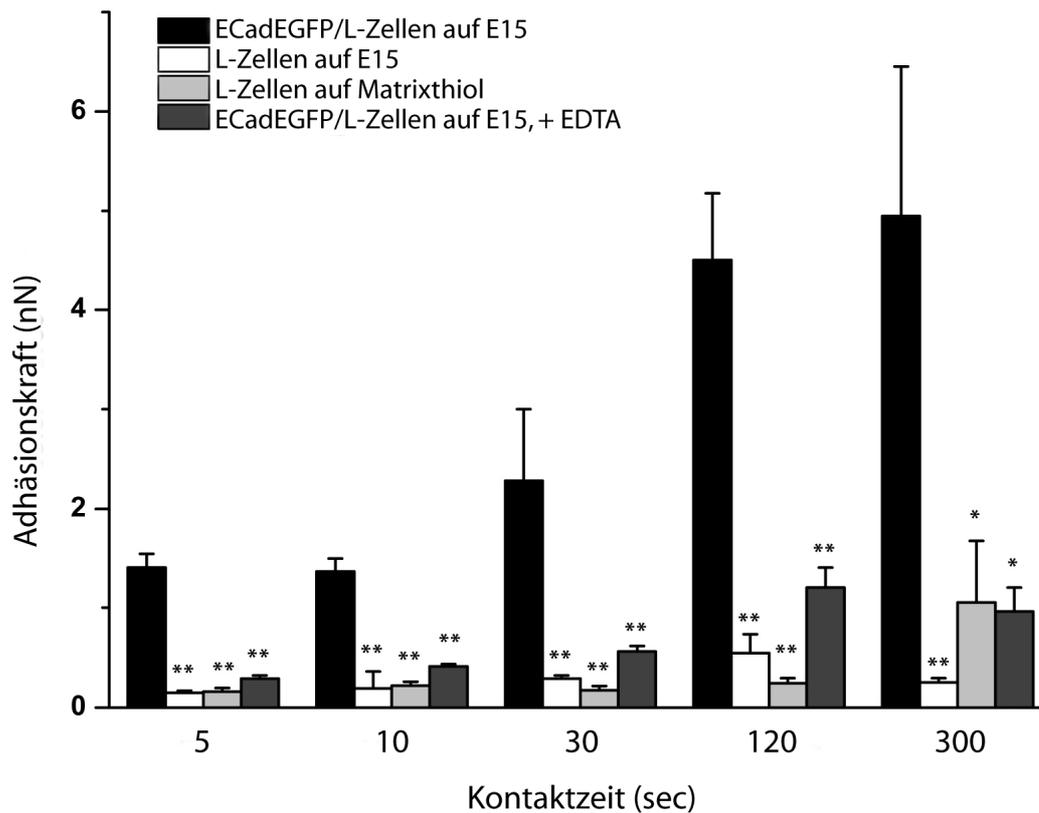


Abb. 5.21: Einzelzellkraftmessungen durchgeführt und dargestellt von C. Franz (KIT).

Die Einzelzellkraftmessungen von ECadEGFP/L-Zellen auf mit E15 funktionalisierten Oberflächen (schwarze Balken) zeigten eine Kontaktzeit-abhängige Steigerung der Adhäsionskräfte. Kontrollexperimente mit untransfizierten L-Zellen auf E15 (weiße Balken), ECadEGFP/L-Zellen auf dem Matrixthiol (hellgraue Balken) und ECadEGFP/L-Zellen auf E15 in Gegenwart von 2 mM EDTA (dunkelgraue Balken) zeigten signifikant geringere Adhäsionskräfte. Der Standardfehler des Mittelwertes ist dargestellt. Basierend auf einem nicht-parametrischen Test (Mann-Whitney) ergaben sich Signifikanzen von * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

5.4.5 Verdünnungsreihe

Ausgehend von *lateralen* Dimeren, die für eine homophile *trans* Bindung der Cadherine nötig sind, wurden auf den bisher gezeigten Oberflächen *laterale* Dimere gebildet. Dies geht einher mit den Ergebnissen von Einzelmolekülspektroskopien, durchgeführt von Bärbel Lorenz an der Universität Göttingen, und Einzelzellkraftmessungen (Abschnitt 5.4.4). Die SAM-Technik gestattet, die Dichte der angebotenen E15 zu variieren, indem die Konzentration der BG-Thiole in der Thiol-Lösung verringert wird. Entsprechend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und ihre Wirkung in Bezug auf das Adhäsionsverhalten der ECadEGFP/L-Zellen untersucht.

In den vorangegangenen Versuchsreihen wurde eine 1:100 BG- zu MeO-EG₃-Thiol (1 μ M:100 μ M) Verdünnung verwendet.

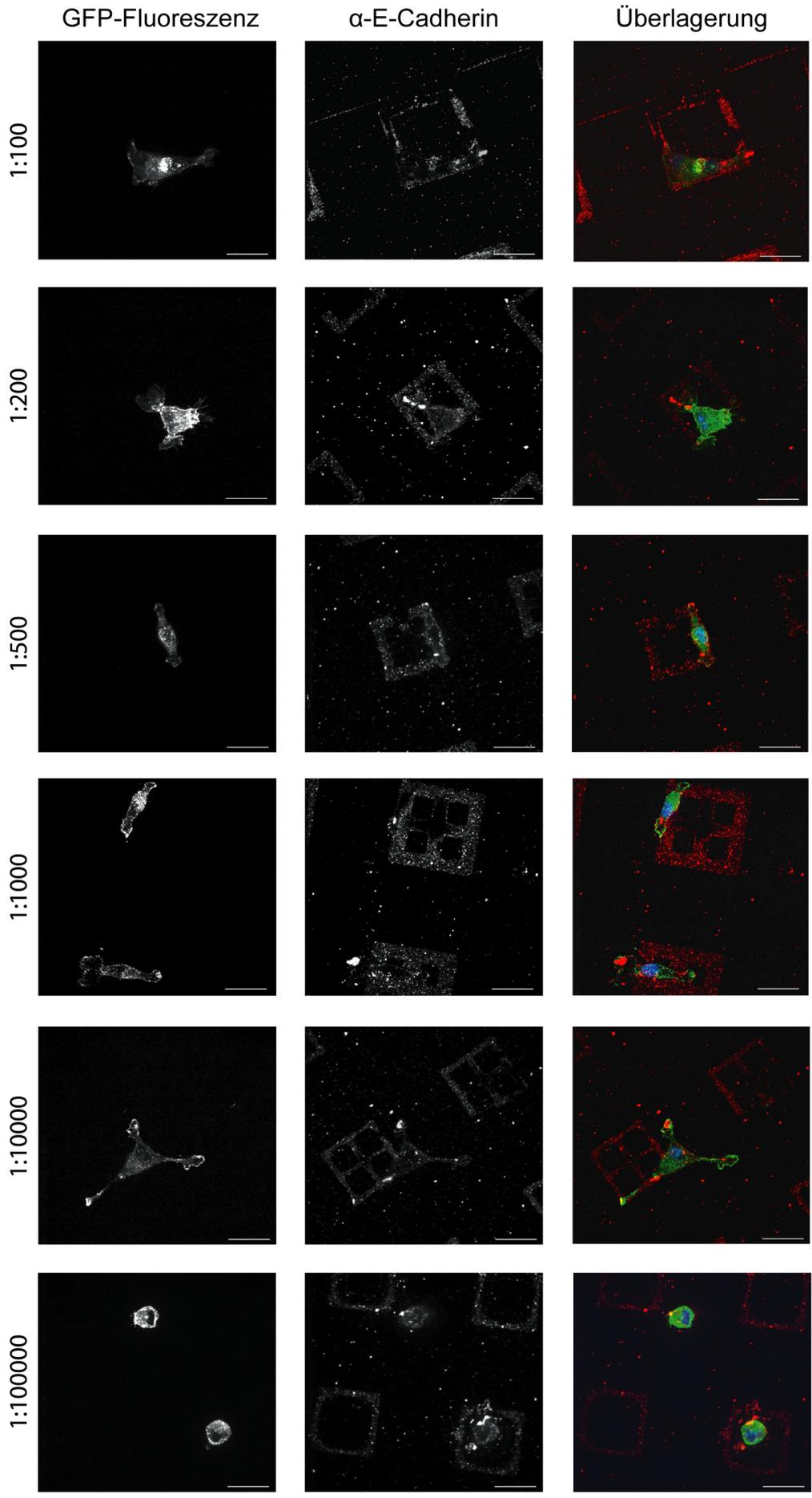


Abb. 5.22:
ECadEGFP/L-Zellen
auf den
verschiedenen
Verdünnungen.
 Gezeigt sind
 Fluoreszenz-
 aufnahmen der
 ECadEGFP/L-Zellen
 auf mit E15
 funktionalisierten
 Oberflächen. Es
 wurden verschiedene
 konzentrierte Thiol-
 mischungen zum
 Stempeln verwendet
 (siehe
 Spaltenbeschriftung).
 Links: GFP-
 Fluoreszenz (grün),
 Mitte: indirekte
 Immunfluoreszenz-
 färbung gegen E-
 Cadherin (DECMA,
 rot), rechts:
 Überlagerung der
 Fluoreszenzsignale
 mit zusätzlicher
 Kernfärbung (DAPI,
 blau).
 Größenmaßstab: 20 μ m.

Verdünnungen von 1:200, 1:500, 1:1000, 1:10000 und 1:100000 wurden hergestellt, wobei die eingesetzte MeO-EG₃-Thiol-Konzentration (100 µM) immer konstant gehalten wurde. Da ECadEGFP/L-Zellen nach 2 Stunden die höchste Aussagekraft in Bezug auf eine spezifische E-Cadherin-Interaktion zeigten, wurde in dieser Versuchsreihe ausschließlich unter diesen Bedingungen gearbeitet.

Wie in Abschnitt 5.4.2 gezeigt wurde, lagen über 60% der ECadEGFP/L-Zellen ausgebreitet auf den Quadraten.

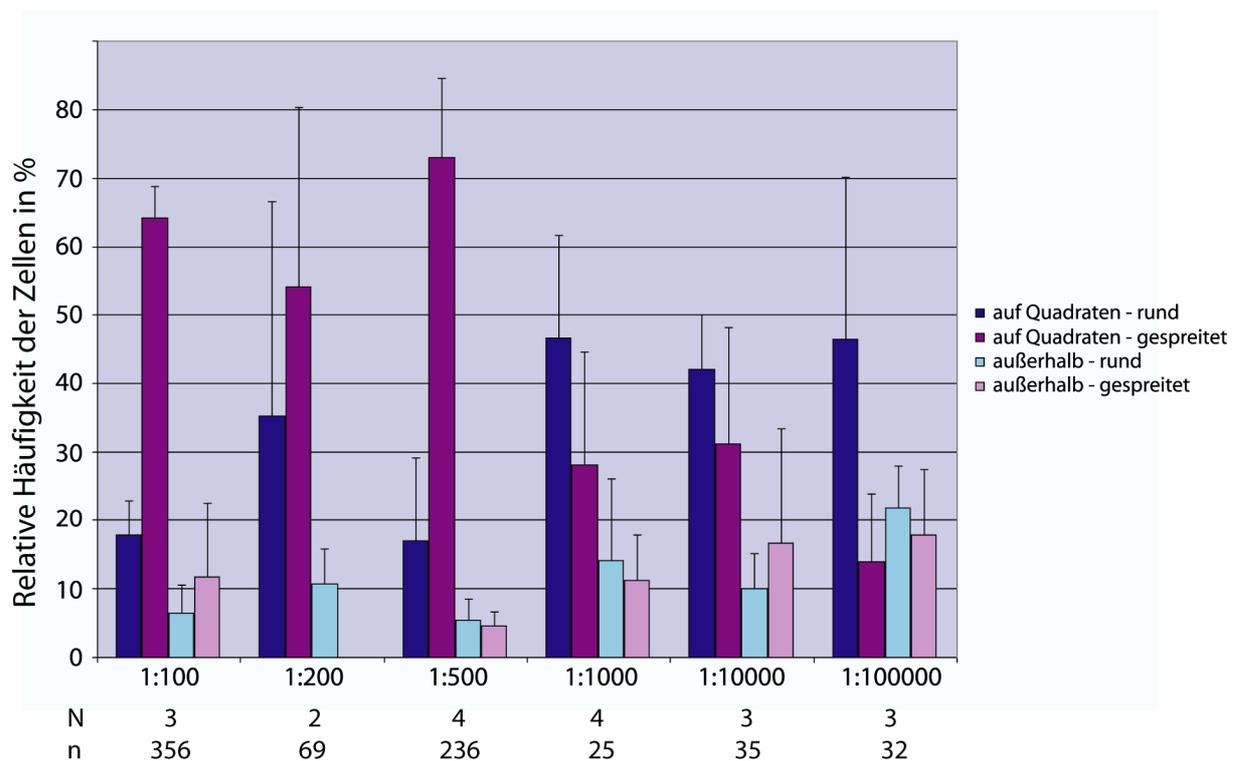


Abb. 5.23: ECadEGFP/L-Zellen zeigten ein vermindertes Adhäsionsverhalten ab einer Verdünnung von 1:1000.

Gezeigt ist die relative Häufigkeit der ECadEGFP/L-Zellen auf den verschiedenen Verdünnungen. Unterschieden wurde in auf Quadraten - rund (blau) oder - gespreitet (violett) und außerhalb - rund (hellblau) oder - gespreitet (rosa).

N: Versuchsanzahl, n: absolute Zellanzahl. Der Standardfehler ist dargestellt.

Bei einer Verdünnung der gestempelten Thiole von 1:200 war eine geringe Verminderung der ausgebreiteten Zellen zu erkennen, während bei einer Verdünnung von 1:500 über 70% der Zellen ausgebreitet auf den Quadraten saßen. Erst 1:1000 und 1:10000 zeigten eine deutliche Verminderung auf ca. 30% der Zellen, die ausgebreitet auf den funktionalisierten Oberflächen lagen. Die Verdünnung von 1:100000 brachte nur noch 14% Präferenz für die funktionalisierten Oberflächen.

Es konnte gezeigt werden, dass bis zu einer Verdünnung von 1:500 genügend E-Cadherine für die Zelladhäsion vorhanden waren. Ab der Verdünnung von 1:1000 waren nicht mehr genügend E-Cadherine vorhanden und diese lagen wahrscheinlich zu weit auseinander (Abb. 5.22 und Abb. 5.23).

5.4.6 Stempelmuster

Da der Stempel verschiedene Quadratmuster liefert (Abb. 5.13), lag die Frage nahe, ob die Zellen bestimmte Muster bevorzugen. Dazu wurden die Oberflächen gesondert ausgezählt, auf denen die ECadEGFP/L-Zellen kultiviert wurden. Dabei wurden ausschließlich die Zellen gewertet, die ausgebreitet auf den Quadraten lagen.

Die Auswertung zeigte keine statistisch signifikanten Adhäsionspräferenzen, dennoch stachen einige Muster hervor.

Nach 2 Stunden Kultivierung wurden 3 Muster durch die Zellen bevorzugt (Abb. 5.24). 23% der Zellen adhärten ausgebreitet auf dem Muster b, das aus $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ Quadraten besteht, die einen dünnen Rand und innen keine funktionalisierten Bereiche besitzen.

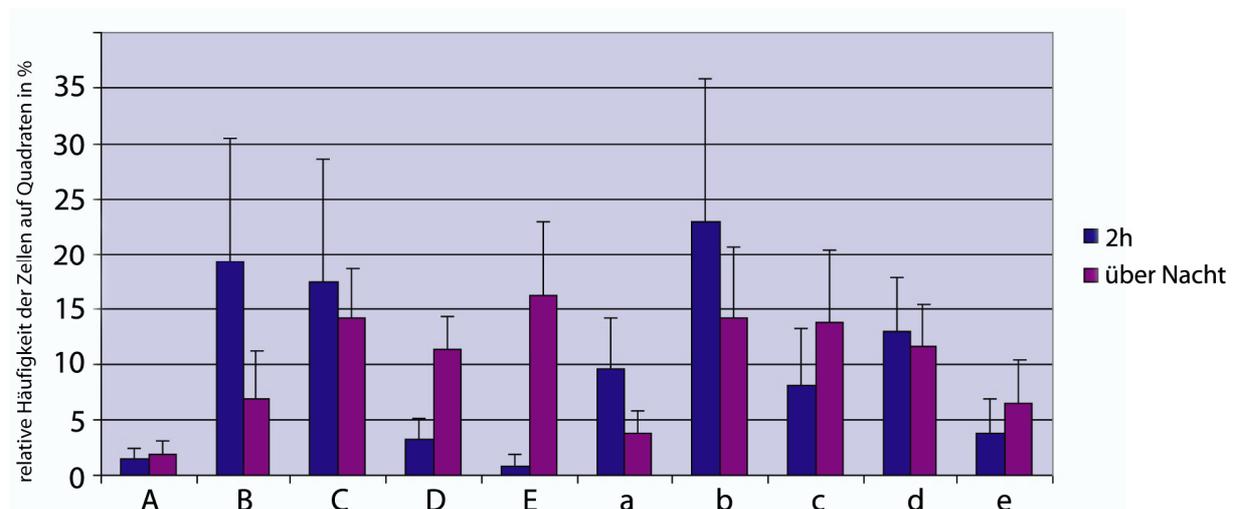


Abb. 5.24: ECadEGFP/L-Zellen auf den verschiedenen Stempelmustern. Gezeigt sind die 2h (blau) und über Nacht Werte (lila) der ausgebreiteten Zellen in Bezug auf die verschiedenen Stempelmuster. Der Standardfehler ist angezeigt.

Auch das größere Pendant dazu, B, wurde von den Zellen zu 19% genutzt. Das Stempelmuster C wurde zu 17% von den Zellen gewählt. Nach Kultivierung über Nacht waren die Zellen breiter verteilt. So lagen jeweils 11-16% der ECadEGFP/L-Zellen ausgebreitet auf C, D, E, b, c und d. Auffallend ist, dass die Stempelmuster weniger belegt wurden, die sich am Rand des Stempels befinden (A, a, e), wobei das

Muster E als Ausnahme herausstach, auf dem nach Kultivierung über Nacht 16% der ECadEGFP/L-Zellen ausgebreitet adhärten.

5.4.7 Adhäsionsverhalten auf E12 Oberflächen

Die funktionellen Motive für eine homophile Bindung sind in der ersten EC Domäne lokalisiert. Daher lag es nahe, einen verkürzten extrazellulären Bereich von E-Cadherin, EC1-EC2, als Fusionsprotein mit dem SNAP- und His-Tag zur Oberflächenfunktionalisierung einzusetzen.

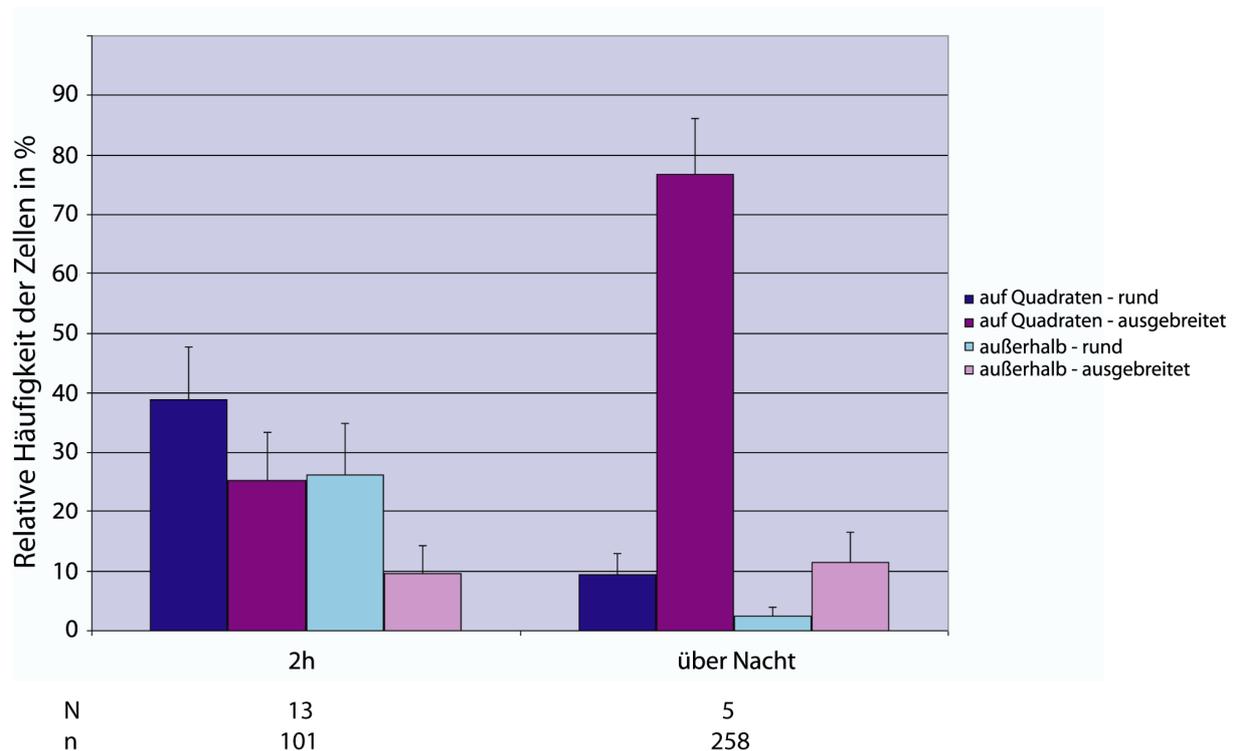


Abb. 5.25: 2h Inkubation zeigte keine spezifischen E-Cadherin-Interaktionen.

Gezeigt sind die 2h und über Nacht Werte der ECadEGFP/L-Zellen auf mit E12 funktionalisierten Bereichen. Standardfehler ist dargestellt. N: Versuchszahl, n: Zellanzahl.

Die ECadEGFP/L-Zellen wurden auf den mit E12 funktionalisierten Oberflächen ausgesät. Nach 2 Stunden oder Kultivierung über Nacht wurden sie fixiert, und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (Abb. 5.26). Die statistische Auswertung der adhärten Zellen auf den Oberflächen zeigte ihr Adhäsionsverhalten (Abb. 5.25).

Nach 2 Stunden Kultivierung der ECadEGFP/L-Zellen auf den funktionalisierten Oberflächen waren keine spezifischen E-Cadherin-Interaktionen zu erkennen. 39% der Zellen lagen rund auf den Quadraten, während 25% ausgebreitet auf den Quadraten adhärten.

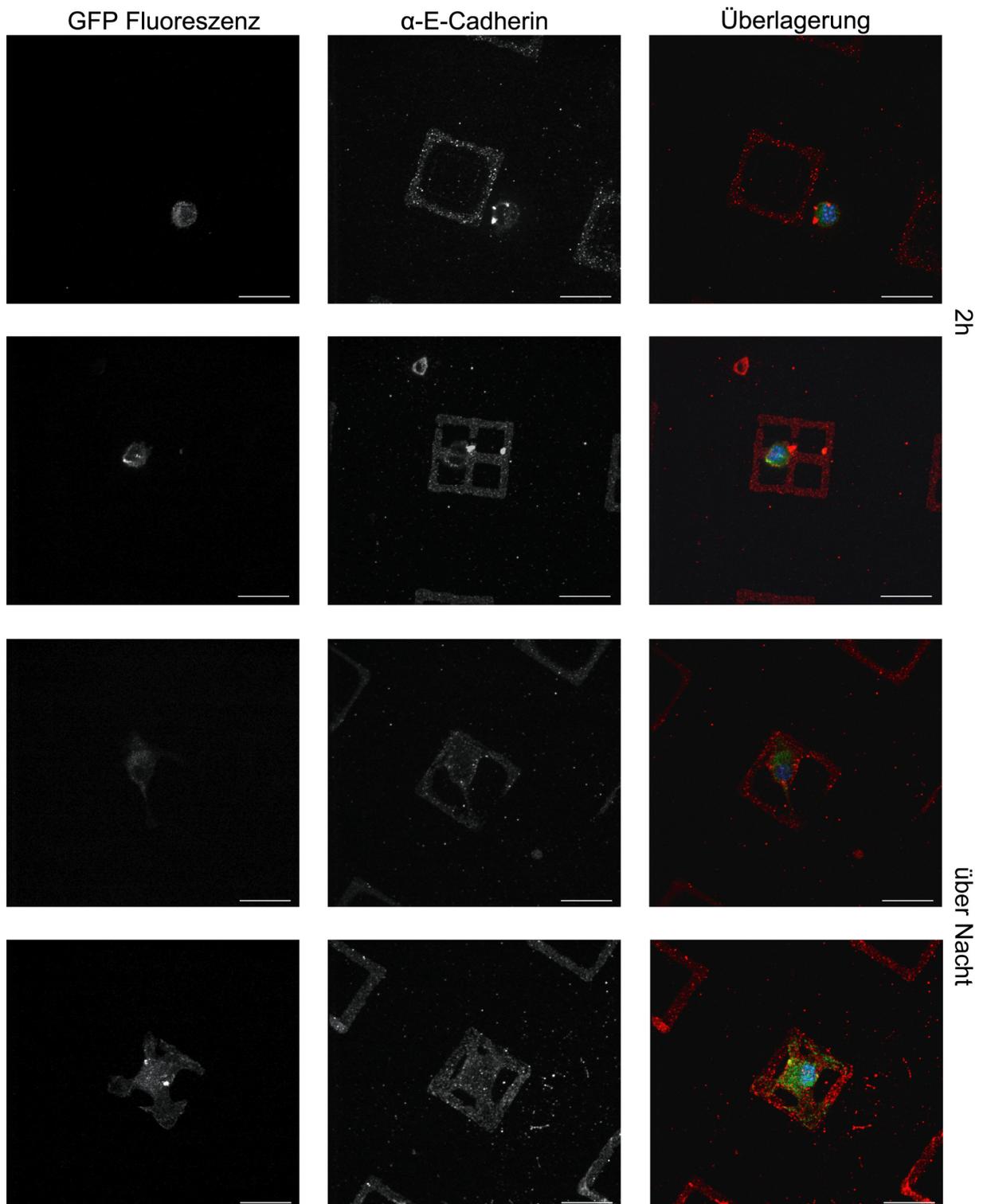


Abb. 5.26: ECadEGFP/L-Zellen auf E12 Oberflächen.

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen der ECadEGFP/Zellen auf den mit E12 funktionalisierten Bereichen. Links: GFP-Fluoreszenz (grün), Mitte: indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin (DECMA, rot), rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau). Größenmaßstab: 20 μm .

26% der Zellen lagen außerhalb der funktionalisierten Areale und waren rund, 10% der Zellen lagen ausgebreitet auf den nicht-funktionalisierten Flächen. Die

Kultivierung über Nacht zeigte hingegen zu 77% ausgebreitete Zellen auf den Quadraten, während 9% rund auf diesen lagen und außerhalb der Quadrate 2% runde und 11% ausgebreitete Zellen vorkamen.

Ähnliches wurde mit untransfizierten L-Zellen auf den funktionellen E15 Oberflächen gezeigt. Daraus ist zu schließen, dass das E12 nicht funktionell ist.

5.5 W4 mES Zellen auf E15 Oberflächen

Die Funktionalität der mit E15 funktionalisierten Oberflächen wurde durch die L-Zell-Versuche belegt, die von E12 nicht. Im nächsten Schritt wurden die Stammzellen auf den E15 Oberflächen untersucht.

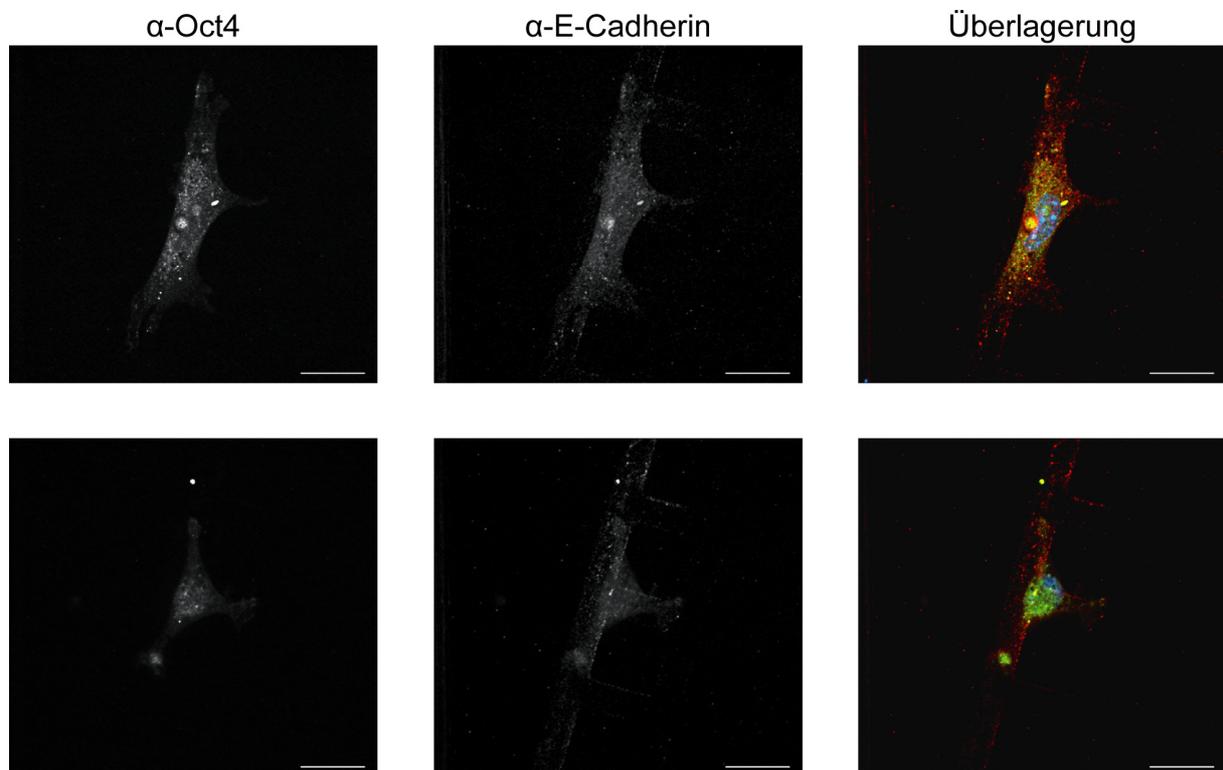


Abb. 5.27: W4 mES Zellen auf E15 Oberflächen nach 4 h Kultivierung.

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen der W4 mES Zellen auf mit E15 funktionalisierten Bereichen. Es wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen Oct4 (links, grün) und E-Cadherin (Mitte, DECMA, rot) durchgeführt. Rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau).
Größenmaßstab: 20 μm .

mES Zellen exprimieren in ihrem undifferenzierten Zustand E-Cadherin, weshalb die Frage nahe lag, ob es möglich sei, die Stammzellen auf den Oberflächen zu kultivieren. Die W4 mES wurden dazu 4 Stunden oder über Nacht (18-20 h) auf den Oberflächen in Gegenwart von LIF kultiviert, das die Pluripotenz erhalten soll. Um unspezifische Adhäsionen durch FCS zu vermeiden, wurden die mES Zellen in der

ersten Stunde in Medium ohne weitere Zusätze außer LIF kultiviert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig gegen Vollmedium ausgetauscht.

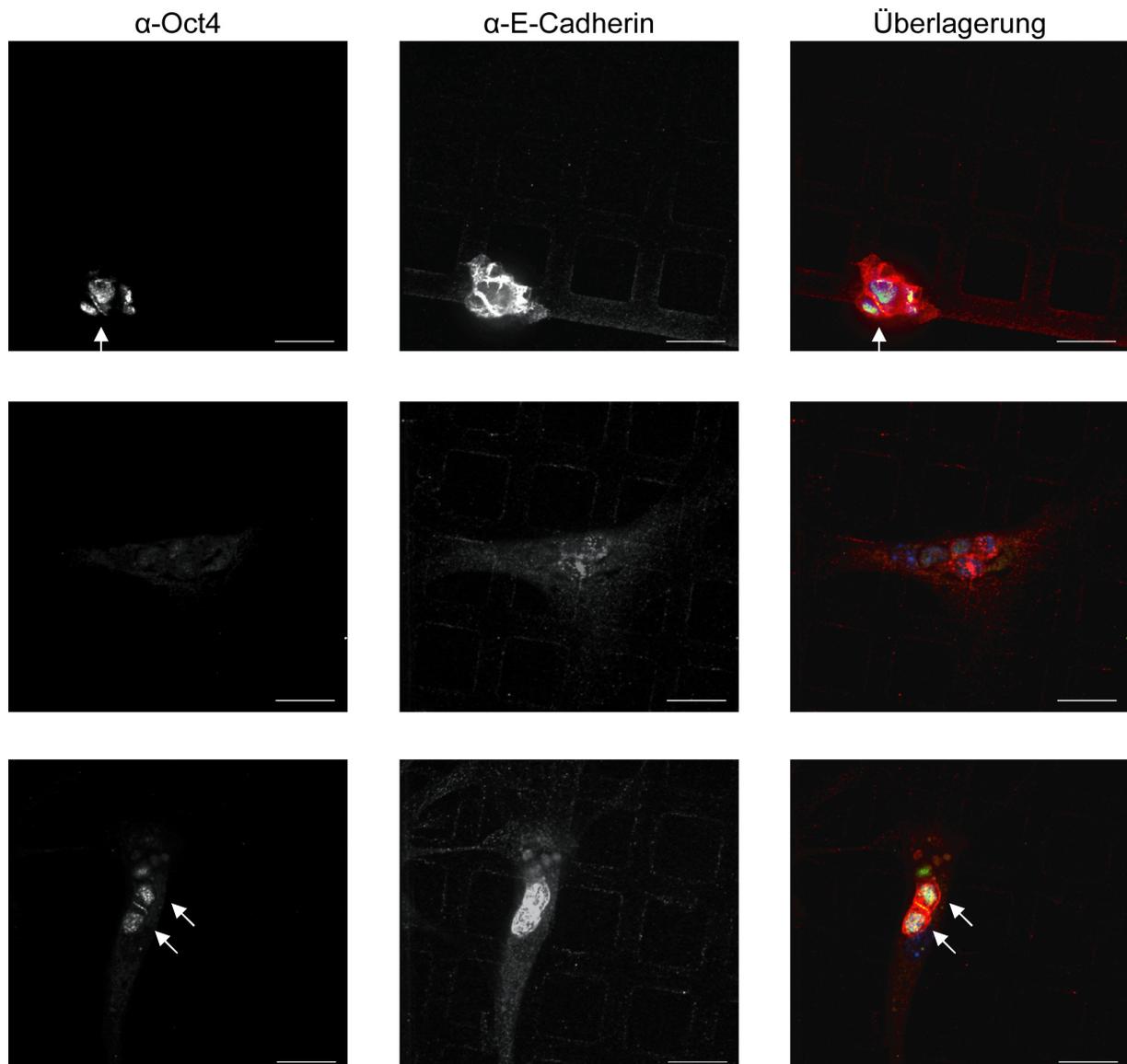


Abb. 5.28: W4 mES Zellen auf E15 Oberflächen nach Langzeitkultivierung.

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen der W4 mES Zellen auf mit E15 funktionalisierten Bereichen. Es wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen Oct4 (links, grün) und E-Cadherin (Mitte, DECMA, rot) durchgeführt. Rechts: Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit zusätzlicher Kernfärbung (DAPI, blau). Größenmaßstab: 20 μm .

Da Stammzellen kleiner als L-Zellen sind, wurde ein Stempel verwendet, der kleinere Quadrate liefern sollte. Allerdings wurde dieser invers übertragen, so dass 20x20 μm^2 freie Quadrate und 10 μm breite funktionalisierte Stege entstanden.

Die W4 mES Zellen setzten sich schon nach 4 Stunden Kultivierung auf den funktionalisierten Bereichen ab (Abb. 5.27). Sie veränderten dadurch aber größtenteils ihre Morphologie, so dass sie Ausläufer zu den Stegen bildeten, und zeigten einen Verlust der kernlokalisierten Oct4 Färbung. Die längere Kultivierung

der W4 mES Zellen über Nacht zeigte ein ähnliches Adhäsionsverhalten. Die mES Zellen veränderten ihre Morphologie, um viele Kontakte zu den Oberflächen auszubilden. Nur wenn mehrere Zellen zusammen saßen oder sie auf anderen Zellen lagen, konnte teilweise die Oct4 Färbung nachgewiesen werden (Abb. 5.28, Pfeile).

6 Diskussion

Die Strukturierung und Funktionalisierung von Oberflächen ermöglicht genauere Einsichten in das Verhalten der Zellen. Gerade für die Stammzellbiologie ist es wichtig, die Mikroumgebung im Körper nachzuahmen, die die notwendigen Signale für den Erhalt oder die Differenzierung liefert. Für die Stammzelltransplantationstherapie ist es beispielsweise notwendig, den Einsatz von unnötigen und körperfremden Substanzen zu vermeiden, aber auch eine Applikationsart zu entwickeln, die sowohl den Erhalt als auch die Differenzierung in der zu behandelnden Körperumgebung ermöglicht.

In der Mikroumgebung spielen Zell-Matrixkontakte, Zell-Zellkontakte, Wachstumsfaktoren und auch biophysikalische Kräfte eine große Rolle. Adulte Stammzellen befinden sich in Stammzellnischen, die größtenteils eine dreidimensionale Mikroumgebung bilden. Mittlerweile wurden erste 3D Strukturen entwickelt (Jongpaiboonkit et al., 2009; Sudo et al., 2009). Dennoch werden Stammzellen häufig in 2D Strukturen kultiviert. Der Stammzellerhalt oder die Differenzierung konnte durch die Immobilisierung von ECM-Molekülen (Flaim et al., 2005; Soen et al., 2006; LaBarge et al., 2008), Wachstumsfaktoren (Fan et al., 2007; Nur-E-Kamal et al., 2008), Cadherinen (Nagaoka et al., 2006 und 2010) und auch durch biophysikalische Eigenschaften (Engler et al., 2006) gefördert werden.

2D Strukturen können die Stammzellnische nicht vollständig imitieren, doch geben sie Hinweise auf notwendige Faktoren für deren Kultivierung. Murine embryonale, pluripotente Stammzellen exprimieren E-Cadherin und werden auf Gelatine kultiviert. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit artifizielle Oberflächen verwendet, die mit diesen Proteinen funktionalisiert wurden. Diese wurden in Bezug auf ihr zelluläres Adhäsionsverhalten untersucht.

6.1 Adhäsionsverhalten der W4 mES Zellen auf UV-strukturierten Polystyrol-Oberflächen

Polystyrol-Oberflächen (PS-OF), die durch UV-Bestrahlung strukturiert und nachfolgend mit Gelatine adsorbiert wurden, wurden auf das Adhäsionsverhalten von mES Zellen untersucht.

Durch gezielte UV-Belichtung durch ein Netz entstanden hydrophile Quadrate, die der Strahlung ausgesetzt waren, und hydrophobe Stege, die durch das Netz

geschützt waren (A. Petershans, Dissertation, 2010). Um die Adhäsion der mES Zellen zu fördern und eine ähnliche Mikroumgebung wie unter normalen Kultivierungsbedingungen zu schaffen, wurden die Oberflächen mit 0,1% Gelatine inkubiert.

Die W4 mES Zellen setzten sich selektiv auf den mit Gelatine-adsorbierten Quadraten ab. Die vorangehende Passivierung mit Pluronic® lieferte die besten Ergebnisse, fast 100% der mES Zellen setzten sich auf den Quadraten ab. Ohne Pluronic® Behandlung bevorzugten diese nur 79-84% der Zellen. Die Gelatine-Adsorption wurde in XPS Messungen untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Gelatine präzise auf den bestrahlten Bereichen nach Pluronic® Behandlung adsorbierte. Allerdings konnte dies nur gezeigt werden, wenn große Areale, die zur Hälfte bestrahlt und unbestrahlt waren, für die Messungen verwendet wurden. Wurden kleinere Areale (entsprechend den in der Arbeit verwendeten) untersucht, so war keine exakte Trennung zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Arealen in Bezug auf die Gelatine-Adsorption nachweisbar (A. Petershans, Dissertation, 2010). Dennoch setzten sich die mES Zellen nach vorangehender Pluronic® Behandlung spezifischer auf den Quadraten ab. Pluronic® besteht aus Polyethylenglykoleinheiten (PEG), die Polypropyloxid (PPO) flankieren. Das PPO adsorbiert auf der hydrophoben Oberfläche, die PEGs ragen heraus. Sehr wahrscheinlich ist, dass das Pluronic® nicht nur die Proteinadsorption, sondern auch die Zelladhäsion auf den hydrophoben Bereichen verminderte.

Auf den Gelatine-adsorbierten Bereichen lagen die mES Zellen eng in Kolonien beieinander und exprimierten E-Cadherin und Oct4. Das Ausbrechen aus diesen Bereichen (v.a. ohne Pluronic® Vorbehandlung) schien eine Veränderung ihrer Morphologie und der E-Cadherin und Oct4 Expression mit sich zu bringen. Die Zellen waren vereinzelter, lagen nicht mehr so dicht beieinander, und es schien zu einer verminderten Oct4 und E-Cadherin Expression zu kommen. Ähnliches zeigten Saha et al. (2011) mit hES Zellen auf UV-bestrahlten PS-Oberflächen, die mit Serum inkubiert wurden. Die hES Zellen wuchsen in Kolonien und waren pluripotent in den UV-bestrahlten Kreisen. Dabei war die Kreisgröße entscheidend. hES Zellen, die über den Rand wuchsen, zeigten erste Zeichen der Differenzierung (Saha et al., 2011).

Um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern, sollte ein größerer Abstand zwischen den Quadraten gewählt werden. Li et al. (2010) zeigten, dass hES Zellen innerhalb

von 2-6 Stunden wieder zusammenfinden nachdem sie vereinzelt wurden. Ist die Distanz der einzelnen Zellen jedoch größer als 150 μm , so geschieht dies nur in wenigen Fällen. Deshalb sollte ein Abstand von mindestens 150 μm zwischen den UV-bestrahlten Flächen eingehalten werden.

Die UV-Strukturierung von PS-Oberflächen ermöglicht die effiziente Bildung von Mikrostrukturen verschiedener Größe, Form und Tiefe, wodurch die Zellzahl und auch das Verhalten der Zellen manipuliert werden können. Gerade in der humanen Stammzellkultur ist es schwierig, vereinzelt Zellen in ihrem pluripotenten Zustand zu erhalten. Dies konnte jedoch durch die Kultivierung auf strukturierten, UV-bestrahlten Oberflächen verbessert werden. Durch eine optimale Flächengröße konnten die Zellen gezielt gruppiert werden, so dass sich schnell wieder Kolonien bilden konnten (Saha et al., 2011). Mohr et al. zeigten 2006, dass hES Zellen in Microwells, funktionalisiert mit Matrigel, über mehrere Wochen kultiviert werden konnten, ohne zu differenzieren. Lee et al. (2010) verwendeten die UV-Bestrahlung um 350 nm breite Furchen zu bilden, in denen hES Zellen nach 5 Tagen in Neurone differenzierten.

Auf den UV-bestrahlten und Gelatine-adsorbierten PS-Oberflächen ließen sich die mES Zellen kultivieren, wobei ihre Pluripotenz weitgehend erhalten blieb.

Gerade diese effektive und kostengünstige Methode ermöglicht die Bildung einer Vielzahl von Strukturen, auf denen verschiedene Proteine adsorbiert und die Pluripotenz oder Differenzierung der Stammzellen auch in Langzeitkulturen gesteuert werden könnten.

So könnte man beispielsweise die in dieser Arbeit gebildeten Quadrate, zum Erhalt der Stammzellen, verbinden mit den von Lee et al. (2010) gezeigten Furchen, die Neurone bilden. Dadurch entstünde günstigenfalls eine artifizielle Stammzellnische, bei der im Quadratbereich die Stammzellen erhalten blieben, während ein Auswachsen in den Furchenbereich die neuronale Differenzierung fördern würde. Da Lee et al. (2010) den Stammzellen bFGF entzogen, um die Differenzierung einzuleiten, wäre es angebracht einen zusätzlichen Gradienten mit bFGF zu bilden, der durch Mikrofluidik oder Immobilisierung ermöglicht werden könnte.

6.2 Funktionalitätstests der E-Cadherin-Fusionsproteine

Funktionalisierte Oberflächen mit Ektodomänen der Cadherine wurden bereits beschrieben. Sivasankar et al. (2000) verwendeten beispielsweise Lipide mit einer DSIDA Kopfgruppe, die mit der Ektodomäne des C-Cadherins über einen His-Tag interagieren. Über einen Antikörper wurden Fc-Fusionsproteine immobilisiert, bestehend aus den Ektodomänen eines Cadherins und dem IgG-Fc-Fragment. Dieser gegen das Fc-Fragment gerichtete Antikörper wurde durch ungerichtete Adsorption an die Oberflächen gebunden (Lambert et al., 2000; Gavard et al., 2003). Die Ektodomänen liegen aufgrund der Disulfidbrückenbildung zwischen den Fc-Fragmenten immer paarweise vor.

Engin et al. (2010) zeigten erfolgreich die strukturierte Oberflächenfunktionalisierung durch das Microcontact Printing und die SNAP-Tag Kopplung des Proteins His-SNAP-GFP. Diese Methode wurde im Weiteren zur Generierung von strukturierten Oberflächen mit verschiedenen langen E-Cadherin-Ektodomänen verwendet.

Dazu wurden zunächst die verschiedenen Cadherin-Fusionskonstrukte kloniert, eukaryotisch exprimiert und aufgereinigt (Abschnitt 5.1).

Die stabile Transfektion der HEK 293 Zellen mit hECad-EC1-5-SNAP-12His (E15, S. Engin, Dissertation, 2010) oder ECad-EC1-2-SNAP-12His (E12, vorliegende Arbeit) ermöglichte eine verbesserte Ausbeute der exprimierten E-Cadherin-Fusionsproteine (S. Engin, Dissertation, 2010). Die anschließende Aufreinigung über den His-Tag dieser Proteine wurde in den UV-Chromatogrammen über die Ni²⁺-NTA Säule und der Western-Blot Analyse gezeigt (Abb. 5.3 und 5.4). Die errechneten Molekülmassen der Aminosäuresequenzen durch ein spezielles Programm (Expasy, Compute pI/MW) liegen deutlich unter den in der Western-Blot Analyse gezeigten Werten. So wurden für E12 42 kDa und für E15 84 kDa errechnet, während sie in der Western-Blot Analyse bei 55 kDa (E12) und 120 kDa (E15) gezeigt wurden. Dies steht in Einklang mit den Werten, die für das vollständige humane E-Cadherin errechnet wurden. Durch das Programm wurden 80 kDa errechnet, während in der Literatur von einem 120 kDa Protein die Rede ist (Bussemakers et al., 1993). Wahrscheinlich ist, dass die Massenunterschiede in der posttranslationalen Modifikation der Proteine begründet liegen. Deshalb wurde in der weiteren Analyse der Proteine immer von 55 kDa bzw. 120 kDa großen Proteinen ausgegangen.

Das UV-Chromatogramm der Aufreinigung über Ni²⁺-NTA zeigte sowohl für E15 als auch für E12 einen prominenten Ausschlag, nach der Einleitung des Elutionspuffers. In der Western-Blot Analyse, bei der ein Antikörper gegen den SNAP-Tag verwendet wurde, sind deutliche Banden zu erkennen. In der Western-Blot Analyse von E15 sind prominente Banden im Bereich von 120 kDa festzustellen. Zusätzlich sind einzelne Degradierungen des Proteins bei ca. 100 kDa und 30 kDa zu erkennen.

Auch in der Western-Blot Analyse von E12 ist die prominente Bande bei 55 kDa. Eine Doppelbande bei ca. 70 kDa könnte auf nicht abgetrennte Pro- und Signalpeptide deuten (das Signalpeptid ist ca. 2 kDa und das Propeptid ca. 15 kDa groß, durch Expasy, Compute pI/MW kalkulierte Werte). Auch einzelne Degradationsbanden bei 36 und 30 kDa sind zu erkennen.

Dennoch könnten weitere Degradationen entstanden sein, bei denen der SNAP-Tag abgetrennt wurde. Diese können nicht in der Western-Blot Analyse mit dem Antikörper gegen den SNAP-Tag dargestellt werden. Da dies aber für die späteren SNAP-Tag Kopplungen nicht relevant ist, wurde es nicht weiter untersucht.

Bei der nachfolgenden Aufkonzentrierung der Proteinfractionen wurden kleinere Degradationsprodukte durch den Viva-Spin Filter entsorgt, der Proteine ab einer Größe von 30 kDa sammelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgreich war. Nicht nur aufgrund der Immundetektion in der Western-Blot Analyse über ihren SNAP-Tag, sondern auch durch die spezifische Aufreinigung der Proteine über ihren His-Tag und die indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf funktionalisierten Oberflächen mittels E-Cadherin Antikörpern konnten die drei Komponenten des Fusionsproteins nachgewiesen werden.

Für die E-Cadherin-Fusionsproteine sollte anschließend gezeigt werden, ob sie auf den Oberflächen funktionell sind, d.h. Cadherin-Interaktionen ermöglichen. Dazu wurden Zellen benötigt, die kein oder sehr wenig Cadherin exprimieren. In der Literatur werden L-Zellen oftmals als Cadherin-negative Zellen beschrieben (Herrenknecht et al., 1991), dies wurde im Folgenden überprüft (Abschnitt 5.2.1). In der Western-Blot Analyse konnte kein endogenes E- oder N-Cadherin nachgewiesen werden. Dies geht konform mit den Ergebnissen von Kashima et al. (2003), die in der Western-Blot Analyse von L-Zellen weder E-, N-, P- noch Cadherin-11 nachweisen konnten. Dennoch lassen sich L-Zellen mit den E-Cadherin Antikörpern DECMA

(monoklonal) und H108 (polyklonal) in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung darstellen. Durch die real-time PCR konnte die Expression weder für E- noch für N-Cadherin in L-Zellen überzeugend nachgewiesen werden. Dies wurde in zwei Ansätzen untersucht, dabei wurden in beiden Fällen sehr hohe Ct-Werte gemessen. Ct-Werte geben den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Die hohen Ct-Werte sowie die Höhe des Ausschlags in der Schmelzkurvenanalyse deuten auf eine sehr geringe Konzentration an amplifizierter DNA hin. Liegen die Ct-Werte über 35 kann davon ausgegangen werden, dass keine spezifische DNA amplifiziert wurde. Im Fall von E-Cadherin wurden Ct-Werte von 30-32 gemessen, was bedeuten würde, dass E-Cadherin in L-Zellen in geringem Ausmaß exprimiert wird. Die N-Cadherin-Expression in L-Zellen lässt sich dagegen ausschließen. Die Ct-Werte lagen bei 34-36.

Die Negativkontrolle (ohne *reverse Transkriptase*) dient dem Nachweis von genomischer DNA. Sind die zu untersuchenden Proben frei von genomischer DNA, werden auch hier Ct-Werte über 35 gemessen. Diese Kontrolle wurde ausschließlich für GAPDH durchgeführt, aber die gemessenen Ct-Werte von 31-32 deuten auf eine geringfügige Kontamination durch genomische DNA hin. Dies muss bei der Bewertung der E-Cadherin-Expression beachtet werden.

Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, sollte die real-time PCR wiederholt werden. Und um das vollständige Cadherin-Profil in L-Zellen zu untersuchen, müssen weitere real-time PCR Ansätze mit Oligonukleotiden durchgeführt werden, die konservierte Regionen der Cadherine flankieren.

Da gezeigt wurde, dass L-Zellen kein bzw. wenig Cadherin exprimieren, wurden diese Zellen mit humanem E-Cadherin-EGFP (EcadEGFP/L-Zellen) stabil transfiziert. Dies konnte im Fluoreszenzmikroskop durch die membranlokalisierte GFP-Fluoreszenz und in der Western-Blot Analyse nachgewiesen werden (Abb. 5.5).

Die Funktionalität der strukturierten Oberflächen von E15 wurde durch die Adhäsion der EcadEGFP/L-Zellen gezeigt. Diese saßen nach zweistündiger Kultivierung zu fast 70% ausgebreitet auf den funktionalisierten Bereichen, während die L-Zellen auf diesen zu 25% ausgebreitet waren. Da zuvor gezeigt wurde, dass L-Zellen kein (oder zumindest sehr wenig) E-Cadherin exprimieren, und dies auch durch eine sehr geringe β -Catenin Färbung an der Membran bestätigt wurde (Abb. 5.20), muss davon ausgegangen werden, dass die Adhäsion der L-Zellen unspezifischer Natur

ist. Durch die Thiole bedingte elektrostatische Wechselwirkungen oder auch die Bildung von eigenen ECM Molekülen könnten diese verursachen. Dennoch ist der Unterschied zu den ECadEGFP/L-Zellen so enorm, dass hier davon auszugehen ist, dass diese Zellen mit dem E-Cadherin homophile *trans* Bindungen eingehen. Auch die Blockierung der E-Cadherin Bindungen durch EDTA und den blockierenden Antikörper konnte zeigen, dass die Adhäsion danach vermindert wurde. Nach Zugabe von EDTA saßen beinahe ausschließlich runde Zellen auf den Oberflächen, während nach DECMA Behandlung noch fast 20% der ECadEGFP/L-Zellen ausgebreitet waren. Dies stützt die Annahme, dass ca. 20-25% der Adhäsion auf Bindungen zurückzuführen sind, die nicht durch E-Cadherin-Interaktionen hervorgerufen wurden, denn EDTA unterbindet nicht nur die Cadherin-vermittelte Adhäsion, sondern auch andere Bindungen, die dafür zweiwertige Ionen benötigen, wie beispielsweise die Integrin-vermittelte Adhäsion. DECMA hingegen unterbindet ausschließlich die E-Cadherin-Interaktionen. Da durch diesen blockierenden Antikörper zumindest im Fall von ECadEGFP/L-Zellen noch fast 20% der Zellen ausgebreitet auf den Oberflächen lagen, scheint dies eine unspezifische Adhäsion zu zeigen. Die L-Zellen lagen nach DECMA Behandlung vollständig rund auf den Oberflächen, allerdings wurden dafür auch nur fünf Zellen in drei Versuchen ausgezählt, was die Aussage statistisch schwächt.

Die in einer Kooperation mit Dr. Clemens Franz (KIT) durchgeführten Einzelzellkraftmessungen zeigten vergleichbare Ergebnisse (Abb. 5.21). Dazu wurden die Adhäsionskräfte von transient mit EcadEGFP transfizierten L-Zellen (ECadEGFP/L-Zellen) zu homogenen E15 Oberflächen bestimmt.

Eine einzelne lebende Zelle wurde zunächst an einem mit Concanavalin A-funktionalisierten Cantilever eines Rasterkraftmikroskops an- und danach mit der E15 Oberfläche in Kontakt gebracht. Während der anschließenden Zellretraktion wurde die zum Ablösen der Zelle notwendige Kraft bestimmt. Abhängig von der Kontaktzeit (5-300s) der Zellen zu E15 wurden steigende Adhäsionskräfte von bis zu ca. 5 nN gemessen. Dagegen zeigten Kontrollversuche mit untransfizierten L-Zellen auf E15, ECadEGFP/L-Zellen auf dem Matrixthiol (EG₄) oder ECadEGFP/L-Zellen auf E15 unter Zugabe von 2 mM EDTA signifikant reduzierte Adhäsionskräfte. Die geringen Adhäsionskräfte in den Kontrollversuchen zeigten, dass überwiegend spezifisch E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion auf E15 Oberflächen gemessen wurde.

In einer weiteren Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Janshoff (Universität Göttingen) untersuchte Bärbel Lorenz homotypische E-Cadherin-Interaktionen mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie. Dazu wurde ein E15 Molekül an den Cantilever des AFMs über eine SNAP-Tag Kopplung gebunden und die Bindungskräfte zu homogenen E15 Oberflächen ermittelt. Es konnten spezifische Bindungskräfte von 35 bis 90 pN für die Interaktionen von E15 Molekülen untereinander ermittelt werden (Bärbel Lorenz, persönliche Mitteilung). Dieser Kraftwertebereich steht im Einklang mit Ergebnissen von Zhang et al. (2008), die in Einzelmolekülmessungen mit dem Rasterkraftmikroskop zwischen den Ektodomänen von E-Cadherin 63 pN für Dimere und 53 pN für Monomere ermittelten.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Adhäsion auf den mit E15 funktionalisierten Oberflächen eine größtenteils durch *trans* E-Cadherin-Interaktionen vermittelte Adhäsion ist. Damit wurde auch nachgewiesen, dass das klonierte, in HEK 293 Zellen exprimierte und durch Ni²⁺-NTA aufgereinigte Protein E15 funktionell ist.

Konnte nach Kurzzeitinkubation der Zellen auf den mit E15 funktionalisierten Oberflächen eine spezifische E-Cadherin-vermittelte Interaktion gezeigt werden, so war dieses in den Langzeitversuchen (18-20 h) nicht darzustellen. Sowohl die E-Cadherin exprimierenden L-Zellen als auch die untransfizierten Kontrollen zeigten ein ähnliches Verhalten auf den mit E15 funktionalisierten Bereichen. Beide lagen größtenteils ausgebreitet auf den E15 Bereichen, wobei ECadEGFP/L-Zellen über 80% erreichten. Das Kontrollexperiment, bei dem die Zellen in Gegenwart von EDTA kultiviert wurden, zeigte größtenteils runde Zellen. Dagegen war die Blockierung über den DECMA Antikörper nicht erfolgreich, fast 70% der Zellen lagen ausgebreitet auf den Oberflächen. Nach der langen Kultivierungsdauer könnte der Antikörper verbraucht sein, dennoch lagen auch die untransfizierten L-Zellen ausgebreitet auf den Oberflächen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Adhäsion der Zellen nicht nur über E-Cadherin-Interaktionen, sondern auch über neu synthetisierte oder durch die im FCS (das nach 3 h Kultivierung im Vollmedium zugegeben wird) enthaltenen ECM-Moleküle vermittelt wird.

Dennoch wurde in Kurzzeitkultivierung gezeigt, dass über 70% der ECadEGFP/L-Zellen durch E-Cadherin-vermittelte Adhäsion auf diesen Oberflächen lagen. Diese

könnte auch in Langzeitstudien weiter erhalten bleiben, solange durch die ECM-Moleküle die E-Cadherin-Interaktionen nicht gestört werden.

Die Auswertung der Adhäsion bezüglich der einzelnen Stempelmuster lieferte keine statistisch signifikanten Präferenzen der Zellen. Dennoch stachen in der Kurzzeitkultivierung die Muster b, B und C hervor, die nur einen dünnen Rand besitzen (Abb 5.24). Möglicherweise ermöglichen kleinere Areale der Cadherine eine bessere Adhäsion der Zellen.

Da durch Boggon et al. (2002) beschrieben wurde, dass die funktionelle Einheit der homophilen Cadherinbindung in der EC1 Domäne liegt, wurde ein Fusionsprotein kreiert, das die erste und Teile der zweiten EC Domäne von E-Cadherin besitzt.

ECadEGFP/L-Zellen auf den mit E12 funktionalisierten Oberflächen zeigten keine spezifische Adhäsion. Es lagen nach zweistündiger Kultivierung 25%, nach Langzeitkultivierung dagegen über 70% der ECadEGFP/L-Zellen ausgebreitet auf den funktionalisierten Bereichen. Diese Ergebnisse ähneln den Kontrollversuchen mit L-Zellen auf E15. Deshalb ist davon auszugehen, dass durch E12 keine spezifischen E-Cadherin-Interaktionen vermittelt werden. Aufgrund der fehlenden *cis*-Bindestelle in der EC2 Domäne, die von Harrison et al. (2011) beschrieben wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Fusionsproteine keine *cis*-Interaktionen eingehen können. Harrison et al. untersuchten *cis*-Mutationskonstrukte, die ihre Mutation in der 1. und 2. EC Domäne hatten. Sie zeigten, dass transfizierte A431 Zellen mit den *cis*-Mutanten in *fulllength* E-Cadherin keine *Adherens Junctions* bildeten. Verwendeten sie dagegen *cis*-Mutanten, in denen die cytoplasmatische Domäne fehlte, so bildeten sich *Adherens Junctions* aus. Diese waren aber deutlich ungeordneter und instabiler. Fehlte endogenes E-Cadherin in A431 Zellen, so konnten diese E-Cadherin *cis*-Mutanten keine *Adherens Junctions* bilden. Die Autoren schließen daraus, dass die Cadherine auch ohne *cis*-Dimerbildung *trans*-Dimere bilden können. Allerdings führen ihre ungeordneten Strukturen zu instabilen Verbindungen, die in einem möglichen veränderten *inside-out signaling* und ungeordneten cytoplasmatischen Domänen mit ihrer Verbindung zum Aktinzytoskelett liegen könnten.

Das Verhalten der ECadEGFP/L-Zellen auf den E12 funktionalisierten Bereichen könnte demzufolge darin liegen, dass die E12 Oberflächen keine *cis*-Dimere bilden, es folglich zwar zu *trans*-Dimeren kommt, die Oberfläche aber wegen ihrer

ungeordneten Cadherine keine Fläche für die Ausbildung der *Adherens Junctions* bietet.

Shan et al. (2004) zeigten ein ähnliches Verhalten von L-Zellen, die mit einem Fusionskonstrukt aus der 1. EC Domäne, der Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen Domäne von N-Cadherin transfiziert und auf N-Cadherin-Fc Oberflächen kultiviert wurden. Diese zeigten in Adhäsionsassays geringe Adhäsion zu diesen Oberflächen, während NCad-EC1-2/L-Zellen auf diesen adhärten.

In Einzelmolekülspektroskopien konnte Bärbel Lorenz für die Bindung von E12 mit E12 nur sehr wenige WLC Ereignisse (*worm-like chain*) darstellen, die typischerweise beim Entfalten eines Proteins entstehen und die sie für E15 gezeigt hatte. Auch wurden deutlich geringere Abrisskräfte von 20-30 pN gemessen (Bärbel Lorenz, persönliche Mitteilung). Da ausschließlich die *trans*-Interaktionen untersucht werden und diese eigentlich durch die erste EC Domäne erhalten werden, sollten ähnliche Werte wie bei den E15 Messungen gezeigt werden. Dennoch konnten nur deutlich geringere Abrisskräfte gemessen werden. Dies könnte an der ungeordneten Oberfläche liegen, bedingt durch die fehlende *cis*-Dimerisierung. Als Ursache in Frage kommen aber auch mögliche fehlende Bereiche, die die *trans*-Bindung stabilisieren könnten.

Shi et al. (2010) zeigten in AFM-Messungen, dass die Ektodomänen von C-Cadherin (CEC1-5) untereinander stärkere Kräfte aufwiesen als die verkürzten Ektodomänen EC1-2 oder EC1245. Eine Mutation im Tryptophan der 1. EC Domäne, das oftmals als die *trans*-Bindestelle identifiziert wurde (Boggon et al., 2002), wies in AFM-Messungen geringere, aber dennoch messbare Kräfte auf. Dies lässt vermuten, dass neben der ersten EC Domäne auch weitere Domänen für die starke *trans*-Bindung verantwortlich sind (Shi et al., 2010).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass E12 keine oder nur sehr geringe Cadherin-Interaktionen vermitteln konnte. Dies könnte in der fehlenden geordneten Struktur begründet liegen, bedingt durch die fehlenden *cis*-Interaktionsflächen. Auch fehlen die restlichen EC Domänen, was zumindest zu einer geringeren Bindungsstärke führen könnte. Dennoch könnten auch eine fehlerhaft gefaltete erste EC Domäne bzw. nicht abgespaltene Propeptide die Ursache dafür sein. Dies sollte weiter überprüft werden. Durch N-terminale Markierung könnte die Abspaltung des Propeptids untersucht werden und durch Analyse der Kristallstruktur fehlerhafte Faltungen ausgeschlossen werden.

Die Dichte der Cadherin-Fusionsproteine kann einfach verändert werden durch die SAM Technik, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, indem die Konzentration der Benzylguanin-Thiole (BG-Thiol) zu den Abstandsthiole (MeO-EG₃-Thiol) in der zu stempelnden Thiol-Lösung modifiziert wird. In den vorangegangenen Versuchen wurden für die Oberflächenbildung Thiol-Lösungen in einer Verdünnung von 1:100 (BG: MeO-EG₃ Thiol) verwendet. Da Harrison et al. (2011) zeigten, dass die *cis*-Dimerbildung wichtig für eine stabile *trans*-Dimerbildung ist und in der Oberflächenanalyse von E15 gezeigt wurde, dass die E15 E-Cadherin-Interaktionen zu den ECadEGFP/L-Zellen vermitteln, kann davon ausgegangen werden, dass die E15 Moleküle in dieser Dichte laterale Dimere bilden. Auch die Einzelmolekülspektroskopien, durchgeführt von Bärbel Lorenz, deuten auf Cadherin *cis*-Dimerbildungen auf diesen Oberflächen hin (B. Lorenz, persönliche Mitteilung). Dennoch ist es gerade für Einzelmolekülspektroskopien erforderlich, mit einzelnen Cadherin-Molekülen zu arbeiten. Deshalb wurde das Adhäsionsverhalten der ECadEGFP/L-Zellen auf verschiedenen dichten E15 Oberflächen getestet.

Ausgehend von einer Gleichverteilung kann der theoretische Abstand zweier BG-Thiole in einem SAM unter Berücksichtigung der Verdünnung durch ein gedachtes hexagonales Raster errechnet werden. Der Flächenbedarf für ein Thiol wurde von Harder et al. (1998) mit 0,214 nm² dargestellt. Bei einer Verdünnung von 1:100 erhält man so je BG-Thiol eine Hexagonfläche von 21,4 nm². Daraus resultierend berechnet sich der Radius des Innenkreises jedes Hexagons zu 2,5 nm. Der Abstand zweier BG-Thiole zueinander entspricht nun dem Doppelten. Dies ergibt einen Abstand der BG-Thiole eines SAMs von 5 nm in einer 1:100 Verdünnung.

Diese Berechnung wurde auch für die weiteren Verdünnungen angewandt: für 1:200 wurden 7 nm, für 1:500 11 nm, für 1:1000 16 nm, für 1:10000 50 nm und für 1:100000 160 nm errechnet. Da diese Werte ausgehend von einer Gleichverteilung berechnet wurden, könnte es in dem tatsächlich gebildeten SAM zu geringfügigen Abweichungen kommen. Der Durchmesser eines C-Cadherins wurde von Al-Amoudi et al. (2007) mit ungefähr 3 nm dargestellt. Ausgehend von einem 3 nm Durchmesser der E-Cadherin-Ektodomänen sollten diese bei dem 5 nm Abstand der BG-Thiole die einzelnen Reaktionen des SNAP-Tags mit den BG-Thiole nicht beeinflussen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Cadherin-Ektodomänen in einem durchschnittlichen Abstand von 5 nm bei einer BG-Thiolverdünnung von 1:100 vorliegen.

In der Kristallstruktur der E-Cadherin-Ektodomänen zeigten Harrison et al. (2011) einen Abstand von 7 nm und einen Winkel von 30°. Dabei bildeten sich geordnete *cis*-Dimere aus, die über die Bindung der ersten EC Domäne des einen Cadherins in die 2., in den Übergang der 2. in die 3. und in die beginnende 3. EC Domäne des benachbarten Cadherins interagieren. Mutationen in diesen *cis*-Dimerbindungsstellen führten zu ungeordneten und instabilen *trans*-Dimeren.

Ausgehend von den Berechnungen ist der Abstand der Cadherine in einer 1:100 Verdünnung der BG-Thiole deutlich geringer als der durch Harrison et al. (2011) gezeigte. Dennoch saßen über 60% der ECadEGFP/L-Zellen auf den mit E15 funktionalisierten Bereichen. Dies lässt darauf schließen, dass die *cis*-Interaktionen größtenteils gewährleistet waren. Der vertikale Abstand zwischen der Goldoberfläche und den Cadherin Ektodomänen beträgt ca. 2-3 nm, bedingt durch die Länge des BG-Thiols und des SNAP-Tags. Dieser könnte die Anordnung der Cadherine insofern verbessern, als sich *cis*-Dimere und folgend, stabile *trans*-Dimere bilden können. Dennoch würden aufgrund der Berechnung noch bessere Resultate durch die 1:200 (7 nm) bzw. 1:500 (11 nm) Verdünnung erwartet. Für die 1:200 Verdünnung ließ sich dies nicht zeigen, hier saßen nur über 50% ausgebreitet auf den funktionalisierten Bereichen, bei der 1:500 Verdünnung saßen jedoch über 70% der ECadEGFP/L-Zellen ausgebreitet auf den Oberflächen. Abgesehen von den ausreißenden Ergebnissen bei der 1:200 Verdünnung, die noch weiter untersucht werden sollten, ist eine Tendenz zu einem Optimum bei einer Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:500 erkennbar. Beginnend ab einer Verdünnung von 1:1000 sank die spezifische Adhäsion auf ca. 30%, die in der geringen Adhäsion von 14% der ECadEGFP/L-Zellen gipfelte. Da die Kontrollversuche mit L-Zellen auf E15 Oberflächen ein ähnliches Adhäsionsverhalten von 25% ausgebreiteten Zellen auf den funktionalisierten Bereichen zeigten (bei einer 1:100 verdünnten Thiol-Lösung), ist davon auszugehen, dass die ECadEGFP/L-Zellen ab einer Verdünnung von 1:1000, spätestens bei einer Verdünnung von 1:100000 keine spezifischen Cadherin-Interaktionen eingehen. Daraus kann geschlossen werden, dass bei hohen Verdünnungen die Cadherin-Ektodomänen vereinzelt und weit auseinander liegen.

6.3 Adhäsionsverhalten der W4 mES Zellen auf E15 funktionalisierten Oberflächen

Die pluripotenten mES Zellen exprimieren E-Cadherin und verlieren dies mit beginnender Differenzierung (Spencer et al., 2007). Immer häufiger wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen E-Cadherin und dem Erhalt der Pluripotenz diskutiert (zusammengefasst in Soncin und Ward, 2011). Redmer et al. (2011) zeigten, dass E-Cadherin in der Reprogrammierung Oct4 ersetzen kann und diese iPS Zellen alle Pluripotenzfaktoren exprimieren, auch Oct4. Wie genau E-Cadherin den Transkriptionsfaktor Oct4 beeinflusst, ist noch ungeklärt.

Da bisher gezeigt wurde, dass die E15 Oberflächen Cadherin-Interaktionen ermöglichen, wurden die pluripotenten W4 mES Zellen auf E15 Oberflächen kultiviert und ihr Verhalten in Bezug auf die Adhäsion und ihre Pluripotenz betrachtet.

In ersten Experimenten untersuchte Anika Simon (Bachelorarbeit, 2011) W4 mES Zellen auf dem bisher verwendeten Stempel, der verschiedene Quadrate von einer Größe von $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ und $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ liefert. Die W4 mES Zellen lagen ausgebreitet auf den Mustern, veränderten dabei aber ihre Morphologie und verloren ihre Pluripotenz. Aufgrund der deutlich geringeren Größe der mES Zellen im Vergleich zu den L-Zellen wurden deshalb kleinere Muster untersucht. Kultiviert auf dem D1 Stempel, der $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ große Muster liefert, waren die W4 mES Zellen weiter ausgebreitet und verloren auch hier ihre Pluripotenzfaktoren (A. Simon, Bachelorarbeit, 2011).

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit einem Stempel gearbeitet, der $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ Muster liefern sollte. Interessanterweise wurde das Muster invers übertragen, so entstanden $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ freie Areale und dazwischen liegende, mit E15 funktionalisierte Stege, die ca. $10 \mu\text{m}$ breit sind. Die W4 mES Zellen lagen meist ausgebreitet auf den funktionalisierten Bereichen und verloren ihre kernlokalisierte Oct4 Expression. Nur mES Zellen, die in Verbänden oder auf anderen Zellen lagen, konnten diese erhalten (Abschnitt 5.5).

Natalie Traub konnte in ihrer Diplomarbeit zeigen, dass Oct4-EGFP mES Zellen ihre Pluripotenz oftmals auf diesen Oberflächen erhalten konnten. Das Verhalten dieser zwei mES Zelllinien kann nicht vollständig verglichen werden, aber die Ergebnisse von N. Traub geben einen Hinweis, dass diese Oberflächen zur Kultivierung der W4 mES Zellen genutzt werden könnten.

Da hier murine ES Zellen auf humanem E-Cadherin kultiviert wurden, ist die speziesübergreifende Bindung der E-Cadherine möglicherweise eine Ursache für die beginnende Differenzierung der Zellen. In der Stammzellforschung sollen, langfristig betrachtet, humane Stammzellen für die Regenerations- und Organersatztherapie kultiviert und gezielt differenziert werden. Dies erfordert die Verwendung von humanen Cadherinen. Deshalb ist der Einsatz von humanen Cadherinen in den hier durchgeführten Versuchen mit murinen Stammzellen sinnvoll.

Bussemakers et al. (1993) beschrieben das humane E-Cadherin als hoch konserviertes Pendant zum murinen E-Cadherin, dennoch könnten die geringen Unterschiede der beiden E-Cadherine verantwortlich sein für eine mögliche schlechtere Bindung und daraus resultierende verminderte Signale. Lambert et al. (2000) verwendeten Beads, die mit Huhn N-Cadherin beschichtet wurden, und kultivierten diese auf Zellen, die Huhn N-Cadherin, aber auch auf Mäuse- und Rattenzellen, die endogenes N-Cadherin exprimieren. Die Beads setzten sich zu 60% auf den Zellen, die das Huhn N-Cadherin exprimieren, zu 48% auf den Mäusezellen und zu 58% auf den Rattenzellen ab. Dadurch wurde eine speziesunabhängige N-Cadherin-Interaktion nachgewiesen. Dennoch wurde auch gezeigt, dass homophile Cadherin-Interaktionen der gleichen Spezies bessere Resultate lieferten. Deshalb wäre es angebracht, die W4 mES Zellen auf murinem E15 zu kultivieren.

Auch die Dichte der Cadherine könnte ausschlaggebend für den Erhalt der Pluripotenz sein. Nagaoka et al. (2006) kultivierten mES Zellen auf mit E-Cadherin funktionalisierten Oberflächen und konnten ihre Pluripotenz auch in Gegenwart von deutlich geringerer LIF Konzentration erhalten. Sie funktionalisierten diese Oberflächen mit E-Cadherin-Fc Fusionsproteinen, die dadurch *cis*-Dimere bilden. Das Adhäsionsverhalten der ECadEGFP/L-Zellen auf E15 lässt vermuten, dass eine geringere Dichte der E15 bessere Adhäsion auf diesen gewährleistet. Deshalb wäre es sinnvoll, Kontrollversuche mit den mES Zellen auf verschiedenen dichten E-Cadherin Oberflächen zu untersuchen. Möglicherweise könnte die Kultivierung bei einer geringeren Cadherin-Dichte pluripotente mES Zellen erhalten, wie sie durch Verdünnung von 1:500 entsteht.

Die mES Zellen wurden eine Stunde ohne FCS kultiviert, um unspezifische Adhäsion der mES Zellen zu verhindern. Auch dies könnte die Differenzierung gefördert haben,

da mES Zellen BMP4 zum Erhalt der Pluripotenz benötigen, das im FCS enthalten ist. Möglicherweise ist es hier erforderlich, zumindest BMP4 zuzugeben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kultivierung von mES Zellen weiter untersucht werden sollte. Die Kultivierung auf verschiedenen dichten E-Cadherin Oberflächen könnte bessere Ergebnisse erzielen, auch in Gegenwart von BMP4. Außerdem könnte möglicherweise die Kultivierung auf murinem E15 die Pluripotenz erhalten. Auch die Stempelgröße ist dafür entscheidend. Die Ergebnisse von N. Traub mit Oct4-EGFP mES Zellen lassen vermuten, dass eine Stempelgröße von 10 μm für die Stammzell-Kultivierung angemessen sein könnte.

Gelingt es, die Kultivierung und den Erhalt der mES Zellen auf den E15 Oberflächen zu etablieren, könnten durch Kontrollversuche mit E12 die Unterschiede der Proteinexpression ermittelt werden. Dadurch würden bessere Einsichten in die Mechanismen ermöglicht, die für den Stammzellerhalt erforderlich sind.

7 Zusammenfassung

Stammzellmanipulationen über optimal strukturierte und biofunktionalisierte Oberflächen bilden bedeutende Grundlagen für die Regenerations- und die Organersatzforschung.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Strukturierung zwei Methoden verwendet, die UV-bestrahlten Polystyrol-Oberflächen und das Microcontact Printing von Thiol-SAMs.

Die UV-Bestrahlung von Polystyrol-Oberflächen stellt eine effiziente und kostengünstige Methode dar, Stammzellen zu kultivieren. Dabei werden durch UV-Bestrahlung hydrophile und hydrophobe Areale gebildet, die lediglich bedingt funktionalisierbar sind, da dies nur über ungerichtete Adsorption geschieht. Deshalb wurde Gelatine verwendet, die an die hydrophilen Quadrate adsorbierte. Die Kultivierung der Stammzellen auf diesen ermöglichte die selektive Adhäsion in kleine Quadrate, wobei Koloniebildung und der daraus resultierende Stammzellerhalt gefördert wurden. Eine vorangehende Passivierung über Pluronic® konnte diese noch verbessern.

Das Mikrokontakt Printing von Thiol-SAMs und die Kopplung der Proteine über ihren SNAP-Tag hingegen ist aufwendiger, erlaubt aber gerichtete Immobilisierung und damit eine spezifische Anpassung an die natürliche Form. In der vorliegenden Arbeit wurden über diese Methode eine verkürzte (E12) und die vollständige (E15) Ektodomäne des humanen E-Cadherins auf Oberflächen immobilisiert. Cadherine sind zentrale Bestandteile der Stammzellnischen. E-Cadherin wird von murinen embryonalen Stammzellen exprimiert und ist wichtig für den Erhalt ihrer Stammzeleigenschaften.

Es gelang, die E-Cadherin-Fusionsproteine (E12 und E15) zu klonieren, eukaryotisch zu exprimieren und aufzureinigen. Sie wurden über ihren SNAP-Tag an das im SAM enthaltene Benzylguanin-Thiol kovalent gebunden.

Die Funktionalität von E15 Oberflächen konnte durch erhöhte Adhäsion stabil transfizierter ECadEGFP/L-Zellen im Vergleich zu untransfizierten L-Zellen bewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich, dass E12 nicht funktionell ist. Die Ergebnisse der Verdünnungsreihe deckten sich mit den theoretischen Werten der lateralen

Cadherin-Dichte und die Adhäsionskraft der ECadEGFP/L-Zellen beträgt nach 5 minütigem Kontakt zu E15 Oberflächen ca. 5 nN.

Nach Bestätigung der Funktionalität der E15 Muster wurden erste Versuche mit embryonalen Stammzellen durchgeführt. Diese setzten sich spezifisch auf den Mustern ab, änderten dabei aber ihre Morphologie und verloren ihre Pluripotenz.

Es konnte gezeigt werden, dass die strukturierten E15 Oberflächen spezifische E-Cadherin-Interaktionen ermöglichen, die im Speziellen für die Kultivierung und den Erhalt der pluripotenten W4 Stammzellen noch weiter untersucht werden müssen.

8 Literatur

- Al-Amoudi A., Díez D.C., Betts M.J., Frangakis A.S.** (2007). The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* **450**, 832-7.
- Auerbach, W., Dunmore, J., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Auerbach, A., Huszar, D., Joyner, A.** (2000). Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines. *Biotechniques* **5**, 1024-8, 1030, 1032.
- Baum, B., Georgiou, M.** (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* **6**, 907-17.
- Behrens, J., von Kries, J., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W.** (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature* **382**, 638-642.
- 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* **296**, 1308-13.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E.** (1994). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-6.
- Bussemakers M.J., van Bokhoven A., Mees S.G., Kemler R., Schalken J.A.** (1993). Molecular cloning and characterization of the human E-cadherin cDNA. *Mol Biol Rep* **17**, 123-8.
- Chen T., Yuan D., Wei B., Jiang J., Kang J., Ling K., Gu Y., Li J., Xiao L., Pei G.** (2010). E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* **28**, 1315-25.
- Davis M.A., Ireton R.C., Reynolds A.B.** (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163**, 525-34.
- Du X., Hlady V.** (2002). Monolayer Formation on Silicon and Mica Surfaces Rearranged from N-Hexadecanoyl-L-alanine Supramolecular Structures. *J Phys Chem B* **106**, 7295-7299.
- Eastham A.M., Spencer H., Soncin F., Ritson S., Merry C.L., Stern P.L., Ward C.M.** (2007). Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* **67**, 11254-62.

- Engin, Sinem** (2010). Funktionalisierung strukturierter Oberflächen mit E-Cadherin-Ektodomänen. *Dissertation am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie.*
- 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**, 6097-101.
- Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E.** (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677-89.
- Evans M.J., Kaufman M.H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-6.
- Fan V.H., Tamama K., Au A., Littrell R., Richardson L.B., Wright J.W., Wells A., Griffith L.G.** (2007). Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **25**, 1241-51.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E.** (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* **17**, 375-412.
- Flaim C.J., Chien S., Bhatia S.N.** (2005). An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation. *Nat Methods* **2**, 119-25.
- Gautier A., Juillerat A., Heinis C., Corrêa I.R. Jr., Kindermann M., Beaufils F., Johnsson K.** (2008). An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol* **15**, 128-36.
- Gavard J., Lambert M., Grosheva I., Marthiens V., Irinopoulou T., Riou J.F., Bershadsky A., Mège R.M.** (2003). Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J Cell Sci* **117**, 257-70.
- Graham, T., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., Xu, W.** (2000), Crystal Structure of a β -Catenin/Tcf Complex, *Cell* **103**, 885-896.
- Gumbiner, B.M.** (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 622-34.
- Guo, H.B., Lee, I., Kamar, M., Pierce, M.** (2003). N-acetylglucosaminyltransferase V expression levels regulate cadherin-associated homotypic cell-cell adhesion and intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* **278**, 52412-24.
- Häussinger, D., Ahrens, T., Aberle, T., Engel, J., Stetefeld, J., Grzesiek, S.** (2004). Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *EMBO J* **23**, 1699-708.

- Harder, P., Grunze, M., Dahint, R.** (1998). Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *J Phys Chem B* **102**, 426-436.
- Harrison, O.J., Bahna, F., Katsamba, P.S., Jin, X., Brasch, J., Vendome, J., Ahlsen, G., Carroll, K.J., Price, S.R., Honig, B., Shapiro, L.** (2010). Two-step adhesive binding by classical cadherins. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 348-57.
- Harrison, O.J., Jin, X., Hong, S., Bahna, F., Ahlsen, G., Brasch, J., Wu, Y., Vendome, J., Felsovalyi, K., Hampton, C.M., Troyanovsky, R.B., Ben-Shaul, A., Frank, J., Troyanovsky, S.M., Shapiro, L., Honig, B.** (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Structure* **19**, 244-56.
- Hatta K., Takeichi M.** (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* **320**, 447-9.
- Herrenknecht K., Ozawa M., Eckerskorn C., Lottspeich F., Lenter M., Kemler R.** (1991). The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9156-60.
- Hinck L., Näthke I.S., Papkoff J., Nelson W.J.** (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* **125**, 1327-40.
- Hong, S., Troyanovsky, R.B., Troyanovsky, S.M.** (2011). Cadherin exits the junction by switching its adhesive bond. *J Cell Biol* **192**, 1073-83.
- Huber A.H., Stewart D.B., Laurents D.V., Nelson W.J., Weis W.I.** (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* **276**, 12301-9.
- 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. *J Cell Biol* **159**, 465-76.
- Iuliano D.J., Saavedra S.S., Truskey G.A.** (1993). Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res* **27**, 1103-13.

- Jongpaiboonkit L., King W.J., Murphy W.L.** (2009). Screening for 3D environments that support human mesenchymal stem cell viability using hydrogel arrays. *Tissue Eng Part A* **15**, 343-53.
- Kaczorowski, Adam** (2009). Einfluss von ECM-Molekülen auf die Differenzierung und Selbsterneuerung muriner Stammzellen. *Diplomarbeit am Zoologischen Institut, Abt. für Zell- und Entwicklungsbiologie, KIT*.
- Kankate L., Turchanin A., Gölzhäuser A.** (2009). On the release of hydrogen from the S-H groups in the formation of self-assembled monolayers of thiols. *Langmuir* **25**, 10435-8.
- Kashima T., Nakamura K., Kawaguchi J., Takanashi M., Ishida T., Aburatani H., Kudo A., Fukayama M., Grigoriadis A.E.** (2003). Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer* **104**, 147-54.
- Keller G.M.** (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 862-9.
- Keller G.** (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* **19**, 1129-55.
- 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. *Nat Biotechnol* **21**, 86-9.
- Keppler A., Pick H., Arrivoli C., Vogel H., Johnsson K.** (2004). Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9955-9.
- Kindermann M., George N., Johnsson N., Johnsson K.** (2003). Covalent and selective immobilization of fusion proteins. *J Am Chem Soc* **125**, 7810-1.
- Klingelhöfer, J., Laur, O.Y., Troyanovsky, R.B., Troyanovsky, S.M.** (2002). Dynamic interplay between adhesive and lateral E-cadherin dimers. *Mol Cell Biol* **22**, 7449-58.
- Knoblich JA.** (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583-97.
- Kobielak A., Fuchs E.** (2004). Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 614-25.
- LaBarge M.A., Nelson C.M., Villadsen R., Fridriksdottir A., Ruth J.R., Stampfer M.R., Petersen O.W., Bissell M.J.** (2008). Human mammary progenitor cell fate

decisions are products of interactions with combinatorial microenvironments. *Integr Biol (Camb)* **1**, 70-9.

- 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. *J Cell Sci* **113**, 2207-19.
- Larue L., Antos C., Butz S., Huber O., Delmas V., Dominis M., Kemler R.** (1996). A role for cadherins in tissue formation. *Development* **122**, 3185-94.
- Larue L., Ohsugi M., Hirchenhain J., Kemler R.** (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8263-7.
- Lechler T., Fuchs E.** (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437**, 275-80.
- Lee M.R., Kwon K.W., Jung H., Kim H.N., Suh K.Y., Kim K., Kim K.S.** (2010). Direct differentiation of human embryonic stem cells into selective neurons on nanoscale ridge/groove pattern arrays. *Biomaterials* **31**, 4360-6.
- Lehnert D., Wehrle-Haller B., David C., Weiland U., Ballestrem C., Imhof B.A., Bastmeyer M.** (2004). Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci* **117**, 41-52.
- Li G., Satyamoorthy K., Herlyn M.** (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61**, 3819-25.
- Li L., Wang B.H., Wang S., Moalim-Nour L., Mohib K., Lohnes D., Wang L.** (2010). Individual cell movement, asymmetric colony expansion, rho-associated kinase, and E-cadherin impact the clonogenicity of human embryonic stem cells. *Biophys J* **98**, 2442-51.
- 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. *Chem Rev* **105**, 1103-69.
- Matsuzawa, M., Kobayashi, K., Sugioka, K., Knoll, W.** (1998). A Biocompatible Interface for the Geometrical Guidance of Central Neurons in Vitro. *J Colloid Interface Sci* **202**, 213–221.
- Mohr J.C., de Pablo J.J., Palecek S.P.** (2006). 3-D microwell culture of human embryonic stem cells. *Biomaterials* **27**, 6032-42.

- Nagaoka M., Koshimizu U., Yuasa S., Hattori F., Chen H., Tanaka T., Okabe M., Fukuda K., Akaike T.** (2006). E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS One* **1**, e15.
- Nagaoka M., Si-Tayeb K., Akaike T., Duncan S.A.** (2010). Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum. *BMC Dev Biol* **10**, 60.
- Niessen C.M., Gottardi C.J.** (2008). Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 562-71.
- Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A.** (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* **12**, 2048-60.
- Nur-E-Kamal A., Ahmed I., Kamal J., Babu A.N., Schindler M., Meiners S.** (2008). Covalently attached FGF-2 to three-dimensional polyamide nanofibrillar surfaces demonstrates enhanced biological stability and activity. *Mol Cell Biochem* **309**, 157-66.
- Nuzzo, R., Allara, D.** (1983). Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. *J Am Chem Soc* **105**, 4481-4483
- O'Reilly A.M., Lee H.H., Simon M.A.** (2008). Integrins control the positioning and proliferation of follicle stem cells in the Drosophila ovary. *J Cell Biol* **182**, 801-15.
- Pece S., Gutkind J.S.** (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* **275**, 41227-33.
- 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. *EMBO J* **18**, 1738-47.
- Petershans, Andre** (2010). Vom Werkstoff zum Werkzeug. *Disseration, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe.*
- Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R., Engel, J.** (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* **223**, 1019-26.
- Pokutta S., Weis W.I.** (2007). Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 237-61.
- Power C., Rasko J.E.** (2011). Promises and challenges of stem cell research for regenerative medicine. *Ann Intern Med* **155**, 706-13.

- Recker T., Haamann D., Schmitt A., Küster A., Klee D., Barth S., Müller-Newen G.** (2011). Directed covalent immobilization of fluorescently labeled cytokines. *Bioconjug Chem* **22**, 1210-20.
- Redmer T., Diecke S., Grigoryan T., Quiroga-Negreira A., Birchmeier W., Besser D.** (2011). E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep* **12**, 720-6.
- Renault J.P., Bernard A., Juncker D., Michel B., Bosshard H.R., Delamarche E.** (2002). Fabricating microarrays of functional proteins using affinity contact printing. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 2320-3.
- Rudini N., Felici A., Giampietro C., Lampugnani M., Corada M., Swirsding K., Garrè M., Liebner S., Letarte M., ten Dijke P., Dejana E.** (2008). VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J* **27**, 993-1004.
- Saha K., Mei Y., Reisterer C.M., Pyzocha N.K., Yang J., Muffat J., Davies M.C., Alexander M.R., Langer R., Anderson D.G., Jaenisch R.** (2011). Surface-engineered substrates for improved human pluripotent stem cell culture under fully defined conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18714-9.
- Samanta D., Sarkar A.** (2011). Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. *Chem Soc Rev* **40**, 2567-92.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Schwartz D.K.** (2001). Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Annu Rev Phys Chem* **52**, 107-37.
- Sekula S., Fuchs J., Weg-Remers S., Nagel P., Schuppler S., Fragala J., Theilacker N., Franzreb M., Wingren C., Ellmark P., Borrebaeck C.A., Mirkin C.A., Fuchs H., Lenhart S.** (2008). Multiplexed lipid dip-pen nanolithography on subcellular scales for the templating of functional proteins and cell culture. *Small* **4**, 1785-93.
- Shan W., Yagita Y., Wang Z., Koch A., Fex Svenningsen A., Gruzglin E., Pedraza L., Colman D.R.** (2004). The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *J Biol Chem* **279**, 55914-23.

- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grübel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R., Hendrickson, W.A.** (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327-37.
- Shi Q., Maruthamuthu V., Li F., Leckband D.** (2010). Allosteric cross talk between cadherin extracellular domains. *Biophys J* **99**, 95-104.
- Simon, Anika** (2011). Reaktion von Stammzellen auf E-Cadherin funktionalisierte Oberflächen. *Bachelorarbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie.*
- Sivasankar S., Gumbiner B., Leckband D.** (2000). Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J* **80**, 1758-68.
- Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M., Rogers D.** (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-90.
- Soen Y., Mori A., Palmer T.D., Brown P.O.** (2006). Exploring the regulation of human neural precursor cell differentiation using arrays of signaling microenvironments. *Mol Syst Bio* **2**, 37.
- Soncin F., Mohamet L., Eckardt D., Ritson S., Eastham A.M., Bobola N., Russell A., Davies S., Kemler R., Merry C.L., Ward C.M.** (2009). Abrogation of E-cadherin-mediated cell-cell contact in mouse embryonic stem cells results in reversible LIF-independent self-renewal. *Stem Cells* **27**, 2069-80.
- Soncin, F., Ward, C.M.** (2011). The Function of E-Cadherin in Stem Cell Pluripotency and Self-Renewal. *Genes* **2**, 229-259.
- Song X., Xie T.** (2002). DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the Drosophila ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14813-8.
- Spencer HL., Eastham AM., Merry CL., Southgate TD., Perez-Campo F., Soncin F., Ritson S., Kemler R., Stern PL., Ward CM.** (2007). E-cadherin inhibits cell surface localization of the pro-migratory 5T4 oncofetal antigen in mouse embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* **18**, 2838-51.
- Stemmler M.P., Bedzhov I.** (2010). A Cdh1HA knock-in allele rescues the Cdh1^{-/-} phenotype but shows essential Cdh1 function during placentation. *Dev Dyn* **239**, 2330-44.

- Sudo R., Chung S., Zervantonakis I.K., Vickerman V., Toshimitsu Y., Griffith L.G., Kamm R.D.** (2009). Transport-mediated angiogenesis in 3D epithelial coculture. *FASEB J* **23**, 2155-64.
- Suyama K., Shapiro I., Guttman M., Hazan R.B.** (2002). A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* **2**, 301-14.
- Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., Takai, Y.** (1999). Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J Cell Biol* **3**, 539-49.
- Takahashi K., Yamanaka S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-76.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-72.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-7.
- Traub, Natalie** (2012). Das Verhalten muriner embryonaler Stammzellen auf Cadherin-funktionalisierten Oberflächen. *Diplomarbeit am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie.*
- Vallier L., Alexander M., Pedersen R.A.** (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* **118**, 4495-509.
- Vazin T., Freed W.J.** (2010). Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci* **28**, 589-603.
- Vestweber D., Gossler A., Boller K., Kemler R.** (1987). Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* **124**, 451-6.
- Voog J., D'Alterio C., Jones D.L.** (2008). Multipotent somatic stem cells contribute to the stem cell niche in the Drosophila testis. *Nature* **454**, 1132-6.
- Voog J., Jones D.L.** (2010). Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell* **6**, 103-15.

- Xu C., Inokuma M.S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J.D., Carpenter M.K.** (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**, 971-4.
- Xu Y., Zhu X., Hahm H.S., Wei W., Hao E., Hayek A., Ding S.** (2010). Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8129-34.
- Yamada S., Pokutta S., Drees F., Weis W.I., Nelson W.J.** (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889-901.
- Yamashita Y.M.** (2010). Cell adhesion in regulation of asymmetric stem cell division. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 605-10.
- Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A.** (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-92.
- Ying Q.L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A.** (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-23.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A.** (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-20.
- Zhang Y., Sivasankar S., Nelson W.J., Chu S.** (2008). Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 109-14.
- 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. *Glycoconj* **25**, 727-40.
- Zhou H., Wu S., Joo J.Y., Zhu S., Han D.W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., Siuzdak G., Schöler H.R., Duan L., Ding S.** (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 381-4.

Anhang

Liste der verwendeten Abkürzungen

(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewichts-Volumen-Verhältnis
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
AJ	Adherens Junction
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BG	Benzylguanin
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>Bovine Serum Albumine</i>)
CBB	Coomassie Brilliant Blue R-250
C-Cadherin	<i>Compaction-Cadherin</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CXCL12	<i>CXC-Motiv-Chemokin 12</i>
DAPI	4',6-Diamid-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E12	hECad-EC1-2-SNAP-12His
E15	hECad-EC1-5-SNAP-12His
EB	Embryoidkörperchen (engl. <i>embryoid body</i>)
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
EC Domäne	extrazelluläre Cadherin Domäne
ECM	extrazelluläre Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>green fluorescent protein</i>)

GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
hAGT	humane O ⁶ -Alkylguanin-DNA-alkyltransferase
HAV	Aminosäuresequenz Histidin-Alanin-Valin
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung (engl. <i>HEPES buffered saline</i>)
HD	Hängender Tropfen (engl. <i>hanging drop</i>)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
hES Zellen	humane embryonale Stammzellen
ICM	innere Zellmasse (engl. <i>inner cell mass</i>)
IgG	Immunglobulin G
iPS Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
Klf4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LB Medium	Luria Bertani Medium
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-Cadherin	Myotubuläres Cadherin
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MeO	Methoxy-Gruppe
mES Zellen	murine embryonale Stammzellen
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
Oct4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Par-3	<i>Protease activated receptor 3</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
P-Cadherin	Plazentales Cadherin
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SAM	Selbstorganisierte Monoschicht (engl. <i>self-assembled monolayer</i>)
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
Sox2	SRY-related-HMG-box gene 2
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
VE-Cadherin	vascular endotheliales Cadherin
Wnt	Wingless / int-related
XPS	<i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i>
μ CP	Microcontact Printing

Danke

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Doris Wedlich für ihre intensive und hervorragende Unterstützung während meiner Arbeit. Für ihre konstruktive Kritik, ihr großes Engagement und ihre aufbauende Worte bin ich ihr sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Beim Aufbau der Stammzellkultur haben mich viele sehr intensiv unterstützt. Besonders hervorheben möchte ich dabei Dr. Marc Stemmler, Riana Vogt, Dr. Alexandra Rolletschek, Stefanie Schmitteckert, Cornelia Ziegler und Giuseppina Pace.

Auch für die fachlichen Ratschläge und Diskussionen mit Dr. Alexander Welle, Dr. Clemens Franz, Bärbel Lorenz und Prof. Dr. Andreas Janshoff bin ich sehr dankbar.

Der Arbeitsgruppe Beschichtungstechniken und Oberflächenanalytik am IAM-WPT, besonders Udo Geckle und Vanessa Hermann, möchte ich für die Goldbeschichtung, auch mal zu sehr kurzfristigen Zeiten, danken.

Sinem Engin und Andre Petershans möchte ich für die schöne Zeit in unserer kleinen CFN-Gruppe danken.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern unseres Instituts für das tolle Arbeitsklima und die freundliche und kompetente Unterstützung während meiner Arbeit. Besonders hervorheben möchte ich dabei Rahul, Karolin und Susi, mit denen ich viel Spass in unserem Büro hatte.

Auch den Mädels von „nebenan“: Bianca, Chrissy, Claudi, Martina und Vroni möchte ich für die fachliche Unterstützung und die vielen Lachpausen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer bedingungslos unterstützt haben. Die sonntäglichen Treffen mit meinen Eltern und meinem Bruder Wolf, Sandra und Marie konnten mich immer wieder aufheitern. Meiner Tante Moni und Oma Lissi möchte ich für ihre liebevolle Unterstützung danken.

Ich möchte all meinen Freunden für ihre Unterstützung danken, besonders seien Betty, Thomas, Jutta und Sylvia erwähnt.

Ganz besonders möchte ich meinem Freund Peter danken, der mich mit Geduld und Liebe immer wieder in meiner Arbeit unterstützt hat.

Publikationen

I. Veröffentlichungen

van Venrooy, S., **Fichtner, D.**, Kunz, M., Wedlich, D., Gradl, D. (2008). Cold-inducible RNA binding protein (CIRP), a novel XTcf-3 specific target gene regulates neural development in *Xenopus*. *BMC Dev Biol* 8, 77.

Montero-Pancera, S., Trouillet, V., Petershans, A., **Fichtner, D.**, Lyapin, A., Bruns, M., Schimmel, T., Wedlich, D., Reichlmaier, S., Weidler, PG., Gliemann, H. (2010). Design of chemically activated polymer microwells by one-step UV-lithography for stem cell adhesion. *Langmuir* 26(3), 2050-6.

II. Poster

Engin, S., **Fichtner, D.**, Kashef, J., Wedlich, D. „Functionalization of structured surfaces with adhesive properties to study cell behaviour.“

iNano School: Biointerfaces and Biocompatibility at the Nanoscale. 16.-20. August 2008, Fuglsøcentret, Ebeltoft, Dänemark

Fichtner, D., Engin, S., Petershans, A., Gliemann, H., Wedlich, D. „Functionalization of structured surfaces with adhesive properties to study cell behaviour.“

Molecular Cell Dynamics, 3rd Münster Graduate school Meeting. 6.-8. Mai 2009, Münster

Engin, S., **Fichtner, D.**, Petershans, A., Kaczorowski, A., Sekula, S., Lenhert, S., Gliemann, H., Wedlich, D. “Replication of Cellular Microenvironments.“

CFN Summer School on Nano-Biology. 8.-11. September 2009, Bad Herrenalb

Fichtner, D., Traub, N., Petershans, A., Gliemann, H., Wedlich, D. „Functionalization of structured surfaces with adhesive properties to study cell behaviour.“

CFN Summer School on Nano-Biology. 7.-10. September 2011, Bad Herrenalb

III. Vorträge

Fichtner, D., Engin, S., Petershans, A., Gliemann, H., Wedlich, D. „Functionalization of structured surfaces with adhesive properties to study cell behaviour.“

3rd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation. 11.-14. Juli 2010, Dresden

Lebenslauf

I. Persönliche Daten

Name: Dagmar Stephanie Fichtner
Geburt: 1.12.1977 in Bretten
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

II. Schulbildung

08/1984 - 06/1988 Schiller-Grundschule Bretten
08/1988 - 06/1997 Melanchthon-Gymnasium Bretten

III. Ausbildung

09/1997 - 08/1998 Freiwilliges soziales Jahr im Kreiskrankenhaus Bretten
10/1998 - 09/2001 Ausbildung zur Kinderkrankenschwester, Städtisches Klinikum Pforzheim

IV. Studium

10/2001 - 07/2007 Biologiestudium an der Universität Karlsruhe (TH)
Hauptfächer: Zoologie, Genetik
Nebenfächer: Umwelt- und Strahlentoxikologie, Paläontologie
10/2006 - 07/2007 Diplomarbeit am Zoologischen Institut II, Universität Karlsruhe (TH)
Thema der Diplomarbeit:
Die Rolle des neuen XTcf-3 Zielgens *XCIRP* in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*

V. Promotion

seit 05/2008 Promotion am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Begleit-CD

Die Begleit-CD enthält eine digitale Version der vorliegenden Arbeit im PDF-Format.