

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
des Universitätsklinikums Charité
Direktor: Prof. Dr. med. Eckart Köttgen

Thema

"Biomolekulare Interaktionen"

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach
Laboratoriumsmedizin und Biochemie

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Geßner
aus Bielefeld

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: 28. Dezember 2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Christoph Wagener, Universität Hamburg
2. Prof. Dr. rer. nat. Christian Betzel, Universität Hamburg

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	DNA-konformationsstabilisierende atomare Interaktionen: Röntgenkristallstruktur- und 2D-NMR-Analysen	3
2.1	Einleitung, Fragestellung und Diskussion	3
2.2	Sequenzabhängigkeit des B/Z-Konformationspolymorphismus	7
2.3	Z-DNA-Stabilisierung durch Mg ²⁺ - und Co ³⁺ -Komplexe	11
2.4	Molekulare Struktur der Z-DNA bei 1,0 Å Auflösung	15
2.5	Z-DNA-Hydrathülle bei atomarer Auflösung	19
2.6	Konformationsspezifische elektronische Interaktionen	25
2.7	2D-NMR-Analyse der Konformationsvariabilität nicht-selbstkomplementärer DNA-Fragmente	29
3.	Struktur und Ligandenbindung des Transferrinrezeptors: Elektronenmikroskopie und Ligandenbindungsanalysen	33
3.1	Einleitung, Fragestellung und Diskussion	33
3.2	Membranrekonstitution des Transferrinrezeptors	45
3.3	Strukturmodell des membraninsertierten Transferrinrezeptors	49
3.4	Quantifizierung von biomolekularen Assoziationen mittels direkt kalibriertem ELISA	55
3.5	Transferrinrezeptor-Ligandenbindung wird durch kovalente Markierung signifikant verändert	59
3.6	Fehleranalyse der Messung biomolekularer Interaktionen	61
4.	Struktur- und Funktionsanalyse der 7D-Cadherine: Zell- und Molekularbiologie einer neuen Molekülfamilie	67
4.1	Einleitung, Fragestellung und Diskussion	67
4.2	Isolierung und molekulare Charakterisierung des LI-Cadherins	81
4.3	Klonierung und Expression des LI-Cadherins	85
4.4	Analyse der zelladhäsiven Funktion des LI-Cadherins	89
4.5	LI-Cadherin als Marker der Magenmetaplasie	93
4.6	Analyse der Calciumionenbindung an LI-Cadherin	95
4.7	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der homotypischen LI-Cadherin-Bindung	99
4.8	Genstruktur und phylogenetischer Ursprung des LI-Cadherins	103
4.9	Adhäsive Funktion des Ksp-Cadherins	105
4.10	Genomische Paralogie von LI- und Ksp-Cadherin	109
5.	Referenzen	113
6.	Verzeichnis der eigenen Publikationen	125
7.	Danksagung	129
	Anhang: Lebenslauf	
	Anhang: Eidesstattliche Versicherung	

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Weg vom Einzelmolekül über den Molekülverband bis hin zur lebenden Zelle exemplarisch an drei biologischen Systemen beschrieben:

Im ersten Teil wird die Konformationsvariabilität des initial als starr betrachteten, größten Makromoleküls lebender Zellen, der DNA, auf atomarer Ebene unter Einsatz der beiden am besten dafür geeigneten Methoden, der Einkristall-Röntgenstrukturuntersuchung und der hochauflösenden NMR-Spektroskopie, analysiert. Ziel ist hierbei, die Bedeutung einzelner molekularer Interaktionen für die Stabilisierung einer spezifischen Konformation zu erfassen, wobei sich der Auflösungsbereich von der elektronischen Interaktion einzelner Atome und Moleküle über die Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen bis zu der Koordination konformationsstabilisierender Kationen und dem Einfluß der Basenfolge des analysierten DNA-Fragmentes auf die Konformation erstreckt.

Im zweiten Teil wird die Struktur eines hochmolekularen (190 kd), homodimeren Transmembranproteins, des humanen Transferrinrezeptors, im physiologischen Kontext einer Phospholipidmembran bestimmt und die Bindung seines etwa 80 kd großen Liganden Transferrin in vitro quantifiziert. Da die oben genannten physikalischen Verfahren zur Strukturaufklärung nicht für die Analyse membran-insertierter Proteine geeignet sind, kommen hier alternative Methoden zur Anwendung. Obwohl der Transferrinrezeptor zu den am besten untersuchten Membranproteinen zählt, differieren die publizierten Dissoziationskonstanten für die Bindung seines Liganden Transferrin um mehr als das Hundertfache. Vor diesem Hintergrund ist zum einen Ziel dieser Arbeit, ein Verfahren zur möglichst genauen Quantifizierung der Bindung unmarkierter makromolekularer Interaktionspartner zu entwickeln und zum anderen dieses Verfahren mit den zuvor verwendeten Methoden im Hinblick auf seine Genauigkeit zu vergleichen.

Im dritten Teil soll schließlich die Brücke vom Einzelmolekül zur lebenden Zelle am Beispiel eines im Rahmen dieser Arbeit entdeckten neuen Zelladhäsionsmoleküls, des LI-Cadherins, geschlagen werden. Hierunter fallen zunächst die Isolierung, Klonierung und Sequenzanalyse des Proteins. Es folgen seine Expression in verschiedenen Zellsystemen und die Untersuchung seiner zelladhäsiven Eigenschaften, die sich mit herkömmlichen Methoden nicht an isolierten Molekülen, sondern nur im zellulären Kontext unter der gleichzeitigen Bindung vieler Tausender Einzelmoleküle nachweisen läßt. Um die Funktion des LI-Cadherins im lebenden Organismus aufklären zu können, wird im Rahmen

dieser Arbeit nicht nur dessen Expressionsmuster in den einzelnen Geweben unter physiologischen Bedingungen, sondern auch bei pathologischen Veränderungen analysiert. Ausgehend von Sequenzmotiven, welche das LI-Cadherin von den klassischen Cadherinen unterscheiden, wird auf verschiedene biophysikalische Methoden zurückgegriffen, um die dadurch bedingten funktionellen Eigenschaften auf molekularer Ebene aufzuklären. Schließlich wird das zum LI-Cadherin strukturhomologe Ksp-Cadherin in die funktionellen Untersuchungen einbezogen und auf der Basis der genomischen Organisation von LI- und Ksp-Cadherin ein Modell für die phylogenetischen Entwicklung beider Proteine, welche die Familie der 7D-Cadherine bilden, abgeleitet.

2. Sequenz- und Kationenabhängigkeit der DNA-Konformation

2.1 Einleitung, Fragestellung und Diskussion

Obwohl Desoxyribonukleinsäure (DNA) bereits Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt worden war (Miescher, 1871), konnte nach langer widersprüchlicher Diskussion der Funktion dieses makromolekularen Biomoleküls erst Mitte des vergangenen Jahrhunderts gezeigt werden, daß DNA der Träger der Erbinformation und damit der primäre genetische Informationsspeicher aller lebenden Zellen ist (Avery et al, 1944). Basierend auf den Ergebnissen von Stoichiometrieanalysen (Chargaff, 1950), Faserdiffraktionsdaten (Wilkins, 1951; Franklin & Gosling, 1953) und theoretischen Strukturmodellen von DNA (Furberg, 1952; Pauling & Corey, 1953) entwickelten Jim Watson und Francis Crick 1953 ihr berühmtes Doppelhelixmodell der DNA, das nicht nur alle bisherigen biochemischen und Strukturdaten in Übereinstimmung brachte, sondern auch die zentralen Probleme der Informationsweitergabe bei der Zellteilung (Replikation) der Informationsübersetzung in RNA- und Proteinstrukturen (Transkription und Translation) und der Information zwischenspeicherung in der Boten-RNA (tRNA) auf einfache Weise erklären konnte (Crick & Watson, 1954).

So beinhaltet jede der beiden in einer rechtsgängigen Schraube ineinander verwundenen, antiparallelen DNA-Einzelstränge aufgrund der vorgegebenen Basenpaarung (Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin) die gleiche Information, wenn auch in anderer Form. Bei der Replikation dient jeder Einzelstrang als Matrize zur Neusynthese eines durch die Basenpaarung vorgegebenen komplementären Stranges, wodurch eine semikonservative, vollständige Duplikation des Ausgangsmoleküls und der darin gespeicherten Information erreicht wird. Die Basenpaarung bildet auch die Grundlage bei dem Ablesen der Information des jeweils kodierenden Stranges in eine komplementäre mRNA bei der Transkription und der Übersetzung dieser Information von der mRNA in eine Proteinsequenz bei der Translation. Zudem ermöglicht die Redundanz der Informationsspeicherung in beiden Einzelsträngen der DNA verschiedene Reparaturmechanismen. Auf all die damit verbundenen Details und Implikationen für die verschiedensten molekular- und zellbiologischen Mechanismen soll jedoch an dieser Stelle nicht eingegangen werden, da das Ziel der vorliegenden Arbeit die Aufklärung struktureller Detailinformation spezifischer DNA-Konformationen war.

Die überzeugende Einfachheit des Doppelhelixmodells, die vielen grundlegenden Erklärungen naturwissenschaftlicher Phänomene zueigen ist, hat jedoch auf der anderen Seite dazu geführt, daß DNA im Gegensatz zu Proteinen in der Folge oft als ein konformationsfixierter Informationsspeicher im Sinne eines Buches, eines Lochstreifens oder eines Magnetbandes angesehen wurde, welche alle ihre Textur nicht aufgrund der in ihnen fixierten Information ändern. Vor diesem Hintergrund war es sehr überraschend, daß die erste erfolgreiche Röntgenstrukturanalyse eines DNA-Einkristalls, des selbstkomplementären DNA-Hexamers d(CGCGCG), nicht wie erwartet zu einer rechtsgängigen DNA-Helix, sondern zu einer linksgängigen Z-DNA-Helix führte, deren Name der zickzackförmigen Anordnung der Phosphatreste im Rückgrat der Helix entliehen war (Wang et al., 1979). Erst die dritte publizierte DNA-Einkristallstrukturanalyse, die des ebenfalls palindromomischen DNA-Dodecamers d(CGCGAATTCGCG), entsprach dem von Watson und Crick vorgeschlagenen B-DNA-Modell (Wing et al., 1980) und verifizierte damit deren aus den 1954 vorliegenden Faserdiagrammdateien nicht eindeutig ableitbares DNA-Strukturmodell.

Die Röntgenkristallstruktur der Z-DNA lieferte auch eine direkte Erklärung für die bereits fast 10 Jahre vorher in Lösung beobachtete fast vollständige Inversion des CD-Signals von poly-d(GC) unter hohen Salzkonzentrationen (Pohl & Jovin, 1970): Es handelte sich hierbei offensichtlich um eine Konformationsänderung dieses alternierenden Heteropolymers von der bei niedriger Ionenstärke favorisierten rechtsgängigen B-DNA- in die bei hoher Ionenstärke stabilere Z-DNA-Konformation.

Ein wichtiges Charakteristikum der Z-DNA-Konformation ist, daß die N-glycosidische Bindung, welche das N1 der Pyrimidine (Cytosin, Thymin) bzw. das N9 der Purine (Adenin, Guanin) mit dem C1' der Ribose des Zucker-Phosphat-Rückgrats verbindet, im Gegensatz zur B-DNA nicht generell die trans-Konformation einnimmt, sondern alternierend in syn (Guanin) und anti (Cytosin) steht. Hierdurch ergibt sich zum einen das charakteristische Zickzack-Muster der Phosphatreste entlang der kleinen Furche (Minor Groove) der DNA-Helix und zum anderen ein verringerter Abstand der Phosphatreste beider Stränge sowie eine derart weitgehende Verschiebung der Basenpaare in die große Furche (Major Groove), daß diese vollständig gefüllt wird und nicht mehr als Furche, sondern als konvexe Oberfläche imponiert (siehe auch graphische Darstellungen in den Publikationen 1-3).

Da die syn-Konformation bei Pyrimidinen zu einer sterischen Hinderung führen würde, wurde zunächst angenommen, daß nur alternierende Purin/Pyrimidin-Sequenzen die linksgängige Z-DNA-Konformation einnehmen können (Wang et al., 1979). Zu diesen zählen neben den selbstkomplementären $d(GC)_n$ und $d(AT)_n$ auch das asymmetrische Heteropolymer $d(GT)_n \cdot d(AC)_n$. Letztere Sequenz, nicht aber $d(AT)_n$, zeigt tatsächlich unter extremen Salzbedingungen (4 M CsCl) eine Inversion des CD-Spektrums (Vorlickova et al., 1982), die als B/Z-Transition interpretiert werden kann. Vor diesem Hintergrund stellte sich die wichtige Frage, ob jegliche Unterbrechung einer alternierenden Purin/Pyrimidin-Sequenz eine Z-DNA-Konformation unmöglich macht, oder ob gewisse Abweichungen toleriert werden können. Dieser Frage wird in der beigefügten Publikation 1 nachgegangen; eine Einführung zu dem Thema findet sich unter 2.2.

Wie systematische Untersuchungen an poly-d(GC) in Lösung gezeigt hatten, erfolgt die B/Z-Konformationsänderung bei 2,3 M NaCl (Soumpasis, 1987) oder 700 mM $MgCl_2$ (Behe & Felsenfeld, 1981). Übergangsmetall- und Metallkomplexionen sind wesentlich effektiver: So werden z.B. lediglich 20 μM $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ benötigt, um die B/Z-Konformationsänderung bei poly-d(GC) zu induzieren (Behe & Felsenfeld, 1981). Warum gerade der Cobalt-(III)-hexamine-Komplex so effektiv eine B/Z-Transition induziert, läßt sich nur anhand hochauflösender struktureller Daten klären, wie sie eine Röntgenstrukturuntersuchung liefert. Einen Überblick zu der hierzu beigefügten Publikation 2 wird unter 2.3 gegeben.

Die extrem hohe Auflösung (1,0 Å) der weiter verfeinerten unter 2.3 beschriebenen $MgCl_2$ -Struktur des DNA-Hexamers $d(CGCGCG)$ lieferte in Verbindung mit der noch etwas höher aufgelösten Spermine-Struktur (0,9 Å) des gleichen DNA-Fragmentes (Wang et al., 1979; Holbrook et al., 1986) derart detaillierte Strukturinformationen, daß eine vergleichende Analyse aller strukturellen Parameter mit einer statistischen Genauigkeit von bis zu 0,01 Å möglich wurde, einer Größenordnung, die im Bereich von einem Hundertstel des Durchmessers des kleinsten Atoms (Wasserstoff) liegt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in 2.4 zusammengefaßt und beziehen sich auf die Publikation 3.

Bei der oben beschriebenen atomaren Auflösung werden auch alle Wassermoleküle erfaßt, die sich mit einem ausreichenden Besetzungsgrad in definierten Positionen der ersten und sogar zweiten Hydrathülle der DNA befinden. Unter Einbeziehung einer weiteren, ebenso hoch aufgelösten Kristallstruktur des

d(CGCGCG)-Hexamers, der reinen Spermin-Struktur (Egli et al., 1991; Bancroft et al., 1994) wurden daher generelle Muster der Hydratisierung von Z-DNA untersucht. Die diesbezügliche Publikation 4 wird unter 2.5 einführend beschrieben.

Im Zuge der Analyse der oben beschriebenen Z-DNA-Kristallstrukturen wurden einige spezifische, direkte elektronische Interaktionen zwischen Atomen aus unterschiedlichen Resten (Ribose-Base, Base-Phosphat) beobachten, die nicht unwesentlich zu der Stabilisierung der Z-DNA-Konformation beitragen dürften. Hierbei spielen offensichtlich auch indirekte elektronische Effekte eine Rolle, die durch die Koordinierung von Kationen mit den Keto- und Iminofunktionen des Guanins hervorgerufen werden. Die Details dieser Analyse sind in der Publikation 5 beschrieben – eine Einführung in die Thematik findet sich unter 2.6.

Neben den oben beschriebenen DNA-Helices wurden in den 80er Jahren die 3D-Strukturen von über 50 weiteren DNA-Fragmenten mittels Einkristall-Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Darunter befanden sich auch einige wenige DNA-Fragmente, die ungewöhnliche Basenpaare ("Mismatch": G-T, G-U, G-A, A-C, A-I) oder überzählige Basen (A) enthielten oder aus zwei nicht-selbstkomplementären DNA-Einzelsträngen bestanden. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel zweier weiterer Strukturanalysen, mittels hochauflösender NMR-Spektroskopie die molekulare Struktur von nicht-selbstkomplementären kurzen DNA-Fragmenten aufzuklären, die Strukturelementen der ribosomalen RNA entsprachen. Da zu dem Zeitpunkt dieser Arbeiten RNA-Synthesen ausgesprochen schwierig und teuer waren, sollte zunächst versucht werden, die besonderen Eigenschaften spezifischer Sequenzen auf DNA-Ebene zu prüfen, wobei klar war, daß die dabei zu gewinnenden Ergebnisse nur sehr eingeschränkt auf RNA rückübertragen werden können. Vor diesem Hintergrund wurden zwei DNA-Nonamere, die der Helix II der 5S rRNA aus *Escherichia coli* und *Thermus thermophilus* entsprachen und sich in nur einer Base unterschieden, in Lösung mittels NMR untersucht. Hierbei stellte sich überraschend heraus, daß eine der beiden Sequenzen, d(CGCCGCAGC), je nach pH und DNA-Konzentration, präferentiell in doppelsträngiger Form unter Ausbildung eines Mismatches oder in einzelsträngiger Form unter Ausbildung eines Hairpins existierten. Die beiden hierzu publizierten Arbeiten 6 und 7 sind unter 2.7 einführend beschrieben.

2.2 Sequenzabhängigkeit des B/Z-DNA-Konformationspolymorphismus

siehe beiliegende Publikation Nr. 1:

Crystal structure of Z-DNA without an alternating purine-pyrimidine sequence. A.H.-J. Wang, R.V. Gessner, G.A. van der Marel, J.H. van Boom and A. Rich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3611-15, 1985

Die erste Einkristallstrukturanalyse eines mehr als zwei Nukleotide umfassenden DNA-Fragmentes ergab zur großen Überraschung nicht die erwartete rechtsgängige B-DNA-Struktur, sondern eine völlig neue, linksgängige Z-DNA-Helix, deren charakteristisches Merkmal die alternierende Abfolge von syn- und anti-Konformationen der glycosidischen Bindung und damit kristallographisch die Definition eines Dinukleotid-Repeats und nicht eines einfachen Basenpaars als Wiederholungseinheit der Schraubenachse war (Wang et al., 1979). Da in der Kristallstruktur alle Guanosinreste die syn- und alle Cytidinreste die anti-Konformation einnahmen und eine syn-Konformation aufgrund sterischer Behinderungen für Pyrimidine nicht möglich erschien, schlossen die Autoren, daß die Z-DNA-Konformation eine strenge Abfolge alternierender Purin/Pyrimidin-Sequenzen erforderte. In nachfolgenden Röntgenstrukturanalysen (Wang et al., 1984; Fujii et al., 1985; Brennan & Sundaralingam, 1985) sowie spektroskopischen Studien (Vorlickova et al., 1982; Zimmer et al., 1982; Taboury et al., 1984) und molekularbiologischen Analysen von definierten Sequenzelementen innerhalb von Plasmiden unter negativem superhelikalem Torsionsdruck (Haniford & Pulleyblank, 1983; Nordheim & Rich, 1983; Ellison et al., 1985) konnte gezeigt werden, daß in der Tat Guanin durch Adenin und Cytosin durch Thymin ersetzt werden konnte, ohne daß eine Z-DNA-Konformation unmöglich wurde.

Im Zusammenhang mit der Frage nach der biologischen Relevanz der Z-DNA-Konformation und ihrem potentiellen Vorkommen in prokaryotischen und eukaryotischen Genomen stellte sich vor allem vor dem Hintergrund der auffälligen Stabilisierung der Z-DNA-Konformation durch die natürlich vorkommende C5-Methylierung des Cytosins und umgekehrt die negative Selektion gegen längere Bereiche von alternierenden d(GC)-Sequenzen in Vertebratengenomen die Frage, in wieweit "out-of-alternation"-Sequenzen die Ausbildung der Z-DNA-Konformation unmöglich machten. Um diese Frage mit kristallographischen Methoden zu beantworten, wurde versucht, verschiedene selbstkomplementäre DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge mit internen AT-Basenpaaren, die der Purin/Pyrimidin-Alternierung flankierender GC-Bereiche entgegengesetzt

waren, sowohl unter Verwendung kovalenter Modifikationen der Cytosin-C5-Positionen als Z-DNA-stabilisierender Kationen zu kristallisieren.

Von dem C5-bromierten DNA-Hexamer mit der Sequenz d(CGATCG) konnten schließlich Einkristalle in der Anwesenheit von $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ gezüchtet werden, die CuK_α -Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von 1,54 Å streuten und eine genaue Strukturanalyse ermöglichten. Das Diffraktionsmuster der Kristalle der Raumgruppe P21 zeigte bereits entlang der Z-Achse die für Z-DNA-Kristalle dieser Raumgruppe typische starke, einem Abstand von 3,75 Å entsprechende Reflektion an, die auf eine Dinukleotidrepeat entlang der Helixachse schließen ließ. Durch molekularen Ersatz mit einem aus der d(CGCGCG)-Struktur abgeleiteten Modell konnte eine Lösung gewonnen und das Modell bis zu einem R-Wert von 19,3 % verfeinert werden.

Die erhaltene Struktur glich im wesentlichen der anderer DNA-Hexamere in Z-DNA-Konformation, wies aber, bedingt durch die beiden bezüglich der Purin/Pyrimidin-Abfolge invertierten inneren AT-Basenpaare, in diesem Bereich eine wesentliche Verringerung des Basen-Stackings, eine im Vergleich zu den GC-Basenpaaren erhöhte Verwindung des Adenins und Thymins sowohl gegenüber der gemeinsam gebildeten Basenpaarebene als auch der durch die benachbarten GC-Basenpaare gebildeten Ebenen auf. Ob diese Verwindung durch die Einbindung des Pyrimidins Thymin in die syn-Konformation oder durch die großen und stark polarisierbaren Bromreste an der C5-Position der Cytosine bedingt ist, die mit dem π -Elektronensystem der Thymine interagieren, kann nicht entschieden werden. Durch diese Verwindung und durch größere Variationen des Zuckerpuckers im Vergleich zu der d(GCGCGC)-Kristallstruktur (s. Publikation 3) wurden die durch die syn-Konformation der Thymine bedingte sterische Behinderungen minimiert, wobei es dennoch zu einigen engen Kontakten insbesondere zwischen dem Thymin O2 und dem C2' des Riboserestes des gleichen Nukleotids kam. Insgesamt führen die beschriebenen Veränderungen zu einer Deviation des gesamten Ribose-Phosphat-Rückgrates, der eine leichte Erkennung von "out-of-alternation" AT-Basenpaare im Kontext einer Z-DNA-Konformation ermöglichen sollte, wobei zudem durch die starke Verschiebung der Basen in die große Furche eine stärkere Exposition der funktionellen Gruppen der Basen im Vergleich zur B-DNA bewirkt wird.

Aus den erhaltenen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß unter geeigneten Bedingungen (C5-Methylierung, negativer superhelikaler Torsionsdruck) Z-DNA-Bereiche durchaus unter physiologischen Bedingungen kurze "out-of-alternation"-Sequenzen beinhalten können, ohne ihre Konformation zu verlieren.

Außerdem muß die Definition der Z-DNA dahingehend geändert werden, daß sie nicht durch alternierende Purin/ Pyrimidin-Sequenzen, sondern durch eine Alternierung von syn- und anti-Konformationen der Nukleoside gekennzeichnet ist.

2.3 Z-DNA-Stabilisierung durch Mg^{2+} - und Co^{3+} -Komplexe

siehe beiliegende Publikation Nr. 2:

Structural basis for stabilization of Z-DNA by cobalt hexaammine and magnesium cations. R.V. Gessner, G.J. Quigley, A.H.-J. Wang, G.A. van der Marel, J.H. van Boom and A. Rich, *Biochem.* 24, 237-40, 1985

Spektroskopische Analysen mit poly-d(GC) in Lösung haben gezeigt, daß $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ etwa 10^5 -mal so effektiv wie Na^+ und etwa 10^4 -mal so effektiv wie Mg^{2+} die Z-DNA-Konformation stabilisiert (Behe & Felsenfeld, 1981). Auf welchen besonderen Eigenschaften des Cobalt(III)hexamine-Komplexions dieser Effekt beruht, kann weder aus den spektroskopischen Analysen noch aus den besonderen chemischen Eigenschaften dieses Ionenkomplexes abgeleitet werden. Man könnte sogar aufgrund chemischer Daten verleitet sein anzunehmen, daß einer der Amin-Liganden durch eine Amino- oder Iminogruppe einer Base ersetzt wird und so durch die daraus resultierende vergleichsweise feste Bindung einen wesentlichen Einfluß auf die Konformation der DNA ausgeübt wird. Eine besondere Bedeutung gewinnt die Analyse des Einflusses von $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ auf die DNA-Konformation aufgrund des weitverbreiteten Einsatzes dieses Komplexions als Zusatz zur Steigerung des DNA-Transfers in die Zelle bei Transformationen (Hanahan, 1983).

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel des Projektes, durch die Aufklärung der Röntgenstrukturen von Kristallen des DNA-Hexamers d(GCGCGC), die nur in Anwesenheit von Mg^{2+} (und Na^+) gezüchtet worden waren, und von solchen, die zusätzlich auch $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ enthielten, die spezifischen Bindungseigenschaften beider Kationen zu ermitteln und so Rückschlüsse auf den Mechanismus der $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ -induzierten B/Z-Transition zu ziehen. Da zuvor im Rahmen dieses Projektes gezeigt werden konnte, daß der extreme Effekt von $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, der eine sofortige Präzipitation der DNA zur Folge hatte, durch zunehmende Mg^{2+} -Konzentrationen kompetiert werden konnte, gelang es, Kristalle mit hervorragenden Diffraktionseigenschaften (über 1,25 Å Auflösung) unter beiden oben beschriebenen Bedingungen zu erhalten. Die Struktur des DNA- Mg^{2+} -Komplexes konnte durch molekularen Ersatz unter Verwendung der Spermin/ Mg^{2+} -Struktur des gleichen Hexamers (Wang et al., 1979) gelöst werden und diente wiederum als Startpunkt zur Analyse der isomorphen Kristalle der $Mg^{2+}/[Co(NH_3)_6]^{3+}$ -Struktur. Die Positionen der Cobalt-Atome durch eine Differenz-Fourieranalyse ermittelt – es fand sich je ein Cobaltkomplex pro

DNA-Doppelstrang, entsprechend einem Komplex in der asymmetrischen Einheit des Kristalls. Beide Strukturen wurden bis zu einem R-Wert von 18,5 % verfeinert. Der Cobalthexamine-Komplex zeigte eine regelmäßige, oktaedrische Konformation, die den Dimensionen der Struktur des Cobalthexaminehexachlorthallats (Watanabé et al., 1950) entsprach und unter Einbeziehung der dort ermittelten Geometrie weiter verfeinert wurde.

Das $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ fand sich entgegen den eigenen Erwartungen nicht primär in der Nähe der negativ geladenen Phosphatreste, sondern bildete Wasserstoffbrückenbindungen zu der Guanin O6 Keto- und N7-Iminogruppe. Es war genau so positioniert, daß es sich zwischen zwei parallelen DNA-Helices befand und so in der Lage war, in nahezu gleicher Weise auf beiden Seiten mit zwei gegenüberliegenden Guaninen dergestalt zu koordinieren, daß je zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum O6 und eine zum N7 ausgebildet wurden. Zusätzlich bildete der Komplex noch zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen zu der 5'-Phosphatgruppe des vorangehenden Cytidin-Nukleotids aus. Die Wasserstoffbrückenbindungen zu der Phosphatgruppe werden nur dadurch möglich, daß diese aus der sogenannten Z_I - in die Z_{II} -Position rotiert. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Koordination des Komplexions mit den beiden Guaninresten der benachbarten DNA-Helices energetisch derart günstig ist, daß ein Teil der gewonnenen Bindungsenthalpie wiederum zur Induktion der Phosphatgruppen-Rotation aufgewendet werden kann.

Einer der beiden in der $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Struktur zusätzlich aufgrund ihrer regelmäßigen Geometrie identifizierten Mg^{2+} -Hexaaquokomplexe befindet sich an einer ungefähr vergleichbaren Position wie das $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Dieser Mg^{2+} -Hexaaquokomplexe bildet jedoch lediglich zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Guanin und eine weitere zu dem nächsten Guanin-Rest im Gegenstrang der gleichen Helix aus. Es verbrückt zwar ebenfalls die dieses Guanin enthaltende Helix mit einer zweiten Helix; zu letzterer wird jedoch lediglich eine einzige Wasserstoffbrückenbindung mit einem Phosphatrest geknüpft. Ein weiteres Mg^{2+} -Ion befindet sich in der unmittelbaren Nachbarschaft des $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Komplexes und koordiniert sogar mit einem Amino-Liganden des Cobaltkomplexes. Die offensichtliche hohe Dichte an positiven Ladungen (insgesamt 5) auf kleinstem Raum scheint zum Verlust eines weiteren Wasserliganden des Mg^{2+} zu führen. Dennoch oder gerade deswegen ist dieser Mg^{2+} -Komplex jedoch ebenfalls in der Lage, über einen seiner Wasserliganden unter Knüpfung einer Wasserstoffbrückenbindung ebenfalls die Z_{II} -Konformation einer Phosphatgruppe zu induzieren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der spezifische Effekt von $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ auf die B/Z-Transition primär durch die besondere Fähigkeit dieses Komplexes zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bedingt ist. So kann der $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Komplex im Gegensatz zum $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -Komplex 18 Wasserstoffbrückenbindungen statt lediglich 12 eingehen, die aufgrund der höheren Effektivladung auch noch wesentlich stabiler sein dürften. Weiterhin ist der $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Komplex selbst ein sehr stabiler Komplex, während der $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -Komplex einem ständigen Austausch seiner Liganden gegen andere Wassermoleküle unterliegt und daher niemals so feste Verbindungen schaffen kann wie der $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Komplex. Hinzu kommt, daß der Cobaltkomplex alleine mit einer DNA-Helix 5 Wasserstoffbrückenbindungen knüpft. Im Falle eines langen DNA-Polymers könnte sich diese Komplexierung alle paar Basen wiederholen und so eine wesentliche Stabilisierung bewirken. Schließlich weist die gleichzeitige Koordination des $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Komplexes mit Guaninresten zweier benachbarter Helices darauf hin, daß dieses Komplexion eine besondere Fähigkeit zur lateralen Verbindung paralleler DNA-Helices besitzt, welche die in Lösung beschriebene schnelle DNA-Präzipitation nach $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Gabe erklären kann.

2.4 Molekulare Struktur der Z-DNA bei 1,0 Å Auflösung

siehe beiliegende Publikation Nr. 3:

The molecular structure of the left-handed Z-DNA double helix at 1.0Å atomic resolution. R.V. Gessner, C.A. Frederick, G.J. Quigley, A.H.-J. Wang and A. Rich, J. Biol. Chem., 264, 7921-35, 1989

Da die in Anwesenheit von $MgCl_2$ erhaltenen d(CGCGCG)-Kristalle zu einer noch wesentlich höheren Auflösung als 1,25 Å Röntgenlicht beugten, wurde mit einem weiteren Kristall ein zweiter Datensatz gesammelt und mit dem ersten fusioniert. Die mit dem fusionierten Datensatz bei einer kristallographischen Auflösung von 1,0 Å weiter verfeinerte Struktur wurde mit der Struktur der ursprünglichen Spermin/ $MgCl_2$ -Form (Wang et al., 1979), die bereits bis 0,9 Å Auflösung weiter verfeinert worden war, in diesem Fall zusätzlich anisotrop (Holbrook et al., 1986), verglichen. Ziel der Analyse der beiden Strukturen war, die genaue Geometrie der Z-DNA-Struktur bei 1,0 Å Auflösung zu ermitteln und mit der Struktur kleiner DNA-Moleküle zu vergleichen. Gleichzeitig sollte ermittelt werden, wie Mg^{2+} -Ionen und Spermin die Z-DNA-Konformation stabilisieren.

Die innere Geometrie der Z-DNA besteht, wie oben beschrieben, aus einem Dinukleotid-Repeat mit der alternierenden Ribose-Phosphat-Rückgrat-Konformation syn-anti (bezüglich der N-glycosidischen Bindung der Base). Im Falle von d(GCGCGC) befinden sich alle Guanosine in der syn- und alle Cytidine in der anti-Konformation. Entlang der Helixachse, die in diesem Fall mit der kristallographischen c-Achse übereinstimmt, wiederholt sich die aus zwei Basenpaaren bestehende Einheit entsprechend einer Translations-Rotations-Funktion von etwa 7,5 Å und -60° , entsprechend einer 6_5 -Schraubenachse. Nach 6 Basenpaaren wird somit eine halbe Umdrehung der Helixachse erreicht.

Im Kristall befindet sich eine DNA-Duplex in der asymmetrischen Einheit und wird von sechs parallelen Nachbarhelices sowie von je einer entlang der Helixachse in gleicher Orientierung ausgerichteten, aber um 180° gedrehten Helix umgeben. Durch diese Anordnung ergibt sich eine scheinbar unendliche Z-DNA-Helix entlang der c-Achse, die lediglich dadurch von einem entsprechenden Makromolekül abweicht, daß jeweils nach sechs Basenpaaren der Phosphodiesterrest fehlt. An dieser Stelle befindet sich jedoch jeweils ein Wassermolekül, das über Wasserstoffbrücken eine scheinbare Verbindung zwischen den terminalen O3'- und O5'-Hydroxylgruppen der benachbarten Helices herstellt.

Die einzelnen Z-DNA-Helices werden durch je eine Schraubenachse entlang der 3 kristallographischen Achsen ineinander überführt (parallel zur c-Achse bei: $x = 1/4, 3/4, \dots$, $y = 0, 1/2, \dots$, parallel zur a-Achse bei: $y = 1/4, 3/4, \dots$, $z = 0, 1/2, \dots$ und parallel zur b-Achse bei: $x = 0, 1/2, \dots$, $x = 1/4, 3/4$, Raumgruppe $P2_12_12_1$). Die Z-DNA-Doppelhelix liegt dabei auf der 2-zähligen Schraubenachse entlang z bei $x = 3/4$, $y = 1/2$ und erstreckt sich etwa von $z = 3/8$ bis $z = 7/8$. Diese spezifische und nicht nur im kristallographischen Sinne hochsymmetrische Anordnung der Z-DNA-Hexamere darf als Grund für die hohe Auflösung der meisten Z-DNA-Hexamer-Kristallstrukturen in dieser Raumgruppe angesehen werden.

Aufgrund der extrem hohen Auflösung der beiden analysierten Strukturen und der Möglichkeit, die Geometrie der chemische äquivalenten, je 6 G-C-Basenpaare in einer asymmetrischen Einheit zu mitteln und einer statistischen Analyse zu unterziehen, bot sich hier erstmals die Möglichkeit, die Geometrie der Nukleotide und der Basenpaare mit der von hochaufgelösten Röntgenkristallstrukturen kleiner Moleküle, wie der des Nukleotid-Dimers r(CG) (Rosenberg et al., 1976), zu vergleichen. Bei dieser Analyse stellte sich heraus, daß die Bindungslängen und -winkel zwischen den einzelnen Basenpaaren nur minimal variierten (mit Standardabweichungen zwischen 0,01 und 0,05 Å bzw. 1° und 3°). Lediglich bei den Bindungswinkeln der Phosphatreste fanden sich Standardabweichungen bis zu 7° . Auch in der anisotrop verfeinerten Struktur der $MgCl_2$ /Spermin-d(CGCGCG)-Kristalle wurden die größten Temperaturfaktoren, d.h. die größten Molekülschwingungen, im Bereich der Phosphatreste gemessen, wobei die bevorzugte Orientierung der Schwingungen auf eine Rotation der Phosphatgruppe um die Phosphodiesterbindung hinwies, wie sie in extremer Form in der Z_{II} -Konformation gefunden werden kann. Die Z_{II} -Konformation tritt an einer der vier in der Hexamer-Helix vorhandenen GpC-Phosphodiesterbindungen auf und wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert, welche die Phosphatgruppe mit einem Wassermolekül aus der Hydrathülle eines Magnesiumions verbindet, das direkt mit dem N7 des auf die GpC-Einheit folgenden Guanins koordiniert ist. Diese spezifische Interaktion führt ebenso wie andere Ionenbindungen und laterale Interaktionen mit parallelen DNA-Helices zu einem lokalen Absinken der Temperaturfaktoren.

Neben dem gerade beschriebenen Magnesiumaquokomplex, der in gleicher Form auch in der Spermin/ $MgCl_2$ -Form zu finden ist und dort ebenfalls eine Z_{II} -Konformation induziert, konnten in der reinen $MgCl_2$ -Form drei weitere Magnesiumaquokomplexe lokalisiert werden, von denen einer sich zwei

Wassermoleküle mit ersterem als Komplexliganden teilt und ebenfalls primär an O6 und N7 benachbarter Guanine gebunden ist. Die beiden verbleibenden Ionenkomplexe binden bevorzugt an die Phosphate des DNA-Rückgrates, wobei einer mit drei aufeinander folgenden Phosphatgruppen eines Stranges koordiniert, während der andere am Eingang der kleinen Furche sitzt und die Phosphatgruppen der beiden komplementären Stränge verbindet. Insgesamt kompensieren die 4 Magnesiumionen 8 der 10 negativen Ladungen der Phosphatgruppen. Es müssen sich daher noch weitere Kationen im Kristall befinden, die entweder aufgrund ihrer ungeordneten Hydrathülle nicht identifiziert werden können (wie z.B. Na⁺) oder im Falle von Magnesiumionen ungeordnet sind oder nur einen geringen Besetzungsgrad aufweisen.

In der Spermin/MgCl₂-Form konnten neben dem bereits genannten Magnesiumaquokomplex zwei Sperminmoleküle lokalisiert werden. Beide interagieren mit je drei parallelen DNA Helices, wobei ein Spermin preferentiell Wasserstoffbrücken mit den O2- und N7-Resten von Guaninen an der konvexen Oberfläche der Z-DNA, die der großen Furche der B-DNA entspricht, bildet, während das andere vor allem an Phosphatreste bindet. Interessant ist, daß fast alle nukleophilen Gruppen der DNA (Guanin-O6, und -N7, Cytosin-C4, Phosphatreste), die in der Magnesiumform Wasserstoffbrücken zu Magnesiumaquokomplexen bilden, auch in der MgCl₂/Spermin-Form Wasserstoffbrücken mit den Aminogruppen der Sperminmoleküle knüpfen. Da gleichzeitig die molekulare Geometrie beider Strukturen innerhalb der Standardabweichung ununterscheidbar ist, muß davon ausgegangen werden, daß die Koordinationsstellen von der DNA-Geometrie vorgegeben und von den jeweils hinzugefügten Kationen genutzt werden, die durchaus sehr unterschiedlicher Art sein können, wie der anorganische, labile Magnesiumaquokomplex und das organische Spermin, bei dem alle kationischen Aminogruppen kovalent verknüpft sind. Die extreme Stabilität des Spermis im Vergleich zum Magnesiumaquokomplex dürfte auch der Grund dafür sein, daß Spermin mehr als 100fach effektiver als MgCl₂ die Z-Konformation stabilisiert.

2.5 Z-DNA-Hydrathülle bei atomarer Auflösung

siehe beiliegende Publikation Nr. 4:

Comparative studies of high resolution Z-DNA crystal structures. Part 1: common hydration patterns of alternating dC-dG. R. Gessner, G.J. Quigley and M. Egli, J. Mol. Biol. 236, 1154-68, 1994

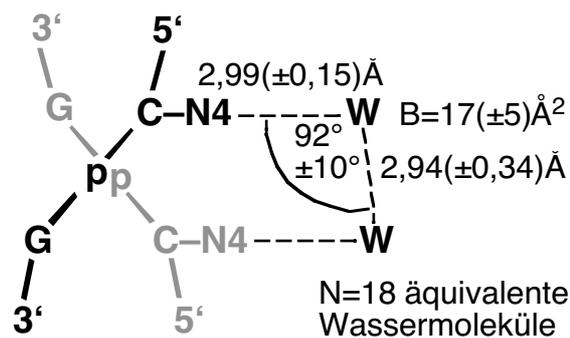
Bereits bei der Analyse der molekularen Geometrie von Z-DNA bei 1,0 Å Auflösung fielen spezifische Hydratmoleküle auf, die jedoch in dieser Arbeit (beigefügte Publikation Nr. 3) nicht näher beschrieben wurden. Um die Z-DNA-Hydrathülle möglichst detailliert untersuchen und die Konservierung der gefundenen invarianten Wassermoleküle genau bestimmen zu können, wurde eine weitere Röntgenkristallstruktur des gleichen DNA-Hexamers, die der reinen Sperminform, in die vorliegende Studie mit einbezogen (Egli et al., 1991, Bancroft et al., 1994). Diese dritte Struktur wurde anhand von Kristallen ermittelt, die ohne $MgCl_2$ mit Spermin und Na^+ als alleinige Kationen gezüchtet worden waren. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Strukturen des d(CGCGCG)-Hexamers war bei gleicher Raumgruppe und ungefähr gleichen Zelldimensionen die DNA-Helix jedoch um ihre eigene Achse rotiert und entlang dieser Achse verschoben, so daß eine völlig andere Umgebung bezüglich der parallelen Nachbarhelices entstand. Während mit einem Datensatz, der bei Raumtemperatur gesammelt worden war, nur ein Spermin-Molekül pro Einheitszelle eindeutig identifiziert werden konnte (Egli et al., 1991), gelang es mit einem weiteren Datensatz, der bei $-110^\circ C$ aufgenommen wurde, ein zweites Sperminmolekül zu lokalisieren (Bancroft et al., 1994). Letztere Struktur wurde in die hier beschriebene vergleichende Analyse der Z-DNA-Hydrathülle mit einbezogen.

Die zunächst überraschende Erkenntnis der Analyse war, daß in allen drei Strukturen an genau den gleichen Wasserstoffbrücken-bildenden DNA-Positionen invariante Wassermoleküle gefunden wurden, die nur dann fehlten, wenn die entsprechende Position durch eines der in den drei Strukturen unterschiedlichen Kationen besetzt waren. Die über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Basen der DNA verbundenen Wassermoleküle wiesen ausgesprochen niedrige Temperaturfaktoren von $20(\pm 9) \text{ \AA}^2$ auf und unterschieden sich damit eindeutig von den Wassermolekülen der zweiten Hydrathülle und den oft delokalisierten noch weiter von der DNA entfernten Wassermolekülen. Alleine auf die Basen bezogen wurden auf der konkaven Oberfläche der Z-DNA, die der großen Furche der B-DNA entspricht, zwei typische Wasserstrukturen und

in der tiefen (kleinen) Furche eine derartige Struktur gefunden, die im folgenden unter einer statistischen Auswertung der publizierten Daten näher beschrieben werden.

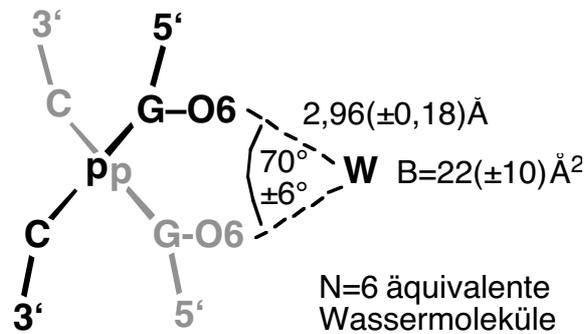
Auf der konkaven Oberfläche einer $d(\text{GC})_n$ -Helix finden sich als potentielle Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen Guanin-N7 und Guanin-O6 sowie als Wasserstoffbrückendonator Cytosin-O4. Aufgrund der Geometrie der Z-DNA-Helix befinden sich jedoch die Guanin-N7-Positionen sehr weit lateral, während die Guanin-O6-Reste der beiden komplementären Stränge in dem GpC-Repeat nur $3,60(\pm 0,28)$ Å voneinander entfernt sind. Fast genauso nah ($3,91(\pm 0,14)$ Å) kommen sich auch die Cytosin-N4-Reste der beiden komplementären Stränge in dem CpG-Repeat.

Das Cytosin-N4-Motiv wird in allen drei Strukturen durchgehend von Wassermolekülen verbrückt, wobei grundsätzlich zwei Wassermoleküle an der Brücke beteiligt sind.



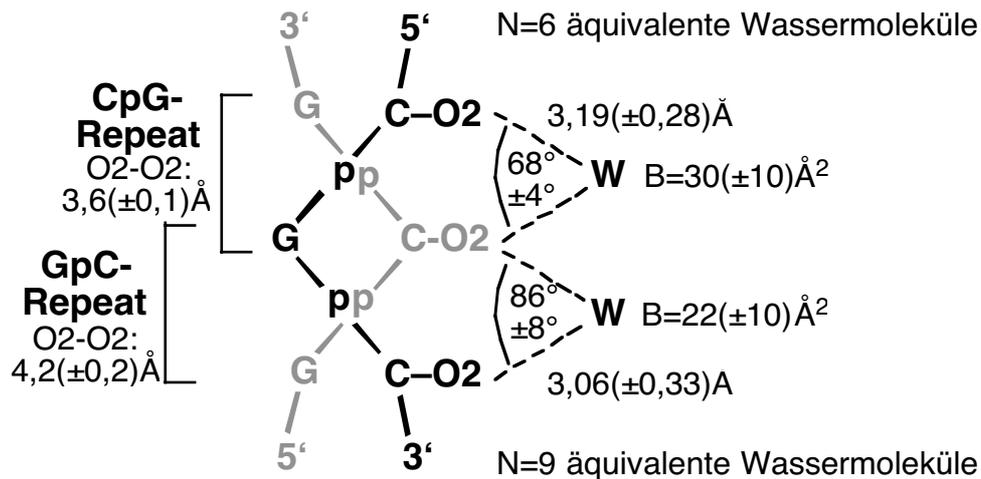
In der obigen Schemazeichnung sind die mittleren Bindungslängen und -winkel sowie der mittlere Temperaturfaktor B der drei Strukturen einschließlich der Standardabweichungen eingezeichnet, wobei zu beachten ist, daß beide Wassermoleküle (und beide N4-Reste) äquivalent sind. Bei der Beurteilung der angegebenen Werte ist zu bedenken, daß die Positionen der Wassermoleküle im Gegensatz zu den relativen Positionen der DNA-Atome nicht restrained wurden. Auffällig ist, daß die Standardabweichung der Wasserstoffbrückenlänge zwischen den beiden Wassermolekülen mit $0,34$ Å mehr als doppelt so groß ist als die zum N4-Rest ($0,15$ Å). Als Grund kann die Fixierung der Wassermoleküle an dem relativ rigiden DNA-Molekül angesehen werden, die vor allem die Distanz betrifft und damit eine seitliche Bewegung der Wassermoleküle erlaubt, welche sich wiederum in der größeren Varianz der Wasser-Wasser-Distanz niederschlägt.

Die nukleophilen O6-Reste der Guanine dienen auch potentielle Liganden für die im Kristall vorhandenen Kationen. Daher verwundert es nicht, daß in einigen Fällen die ansonsten geordnete Wasserstruktur durch Spermin und Magnesiumionen gestört wird. So verbrückt eine Sperminaminogruppe in der Spermin/MgCl₂-Struktur direkt zwei Guanin-O6-Reste und verdrängt mit seinem hydrophoben Anteil ein weiteres Wassermolekül. In der reinen Mg²⁺-Struktur dagegen wird ein verbrückendes Wassermolekül durch zwei Liganden eines Magnesiumhexaaquokomplexes ersetzt. Lediglich in der reinen Spermin-Struktur findet sich eine ungestörte Wasserstruktur entlang aller Guanin-O6-Reste der Z-DNA-Helix. Das folgende Schema zeigt die Mittelwerte aller drei Röntgenstrukturen für die Wasserstoffbrückenlängen und -winkel sowie für die Temperaturfaktoren der beteiligten Wassermoleküle einschließlich der Standardabweichungen:



In der tiefen Furche, an deren Eingang sich die Phosphatgruppen sehr viel näher kommen, als dies in der B-DNA-Struktur der Fall ist, liegen die O2-Reste der Cytosine beider DNA-Stränge in absoluter Nähe zu der Helixachse. Sie sind im CpG-Dinukleotid-Repeat $3,59(\pm 0,06) \text{ \AA}$ und im GpC-Repeat $4,37(\pm 0,19) \text{ \AA}$ voneinander entfernt. Auch hier findet sich eine regelmäßige Wasserstruktur, die im Falle der Mg²⁺-Struktur ideal ausgebildet ist, während in der Spermine/Mg²⁺-Struktur ein Wassermolekül fehlt und in der reinen Spermin-Struktur sogar vier von sechs, da sich in dieser Struktur ein Sperminmolekül durch die tiefe Furche windet und an zwei Stellen mit seinen Aminogruppen in nahezu identischer Geometrie Wasserstoffbrücken bildet sowie an zwei weiteren Stellen mit seinem aliphatischen Anteil alle Wassermoleküle aus diesem Bereich der Furche verdrängt. Die statistische Analyse, daß es durchaus Unterschiede zwischen den an sich ähnlichen Wasserstrukturen innerhalb des CpG- und des GpC-Dinukleotid-Repeats gibt. So scheint, wie die in der Schemazeichnung eingetragenen Mittelwerte und Standardabweichungen andeuten, der etwas größere O2-O2-Abstand von etwa $4,2 \text{ \AA}$ eine stabilere Wasserstruktur zu

ermöglichen, wie sich an den kurzen Wasserstoffbrücken-Bindungslängen und vor allem den wesentlich niedrigeren Temperaturfaktoren erkennen läßt. Zudem sind an dieser Stelle immer Wassermoleküle oder Aminoreste von Sperminen zu finden, obwohl an einer Stelle sogar eine Verbindung zwischen zwei nicht kovalent verknüpften Helices hergestellt wird. Im Bereich des wesentlich kürzeren O2-O2-Abstand des GpC-Repeats fehlen dagegen an 3 von 9 möglichen Stellen die erwarteten Wassermoleküle.



Eine weitere konservierte Wasserstruktur findet sich in der kleinen Furche zwischen den Guanin-N2-Resten und den 3'-gelegenen Phosphatgruppen. Beträgt der Abstand zwischen dem Guanin-N2-Stickstoff und dem nächstgelegenen Phosphatsauerstoff weniger als 5,5 Å, so verbrückt ein einziges Wassermolekül das Guanin mit dem Phosphatrest, ist der Abstand größer als 5,6 Å, so finden sich dort zwei Wassermoleküle. Im Übergangsbereich zwischen zwei Helices fehlt jeweils die verbindenden Phosphatgruppe – hier ist jedoch überraschenderweise die Wasserstruktur trotzdem erhalten und verbindet das Guanin-N2 statt dessen mit dem freien O5' oder in einem Falle auch mit einer Phosphatgruppe einer parallel gelegenen DNA-Helix. Hieraus kann geschlossen werden, daß diese spezifische Anordnung der Wassermoleküle in der kleinen Furche nur zum Teil durch die (sehr beweglichen) Phosphatgruppen und wahrscheinlich in wesentlicherem Maße durch die starrereren Basen bedingt ist. Allerdings wird die regelmäßige Wasserstruktur dort, wo die Phosphatgruppe des GpC-Dinukleotid-Repeats in die Z_{II}-Konformation rotiert ist, aufgehoben, weil dadurch der Abstand vom Guanin-N2-Stickstoff zum Phosphatsauerstoff auf mehr als 7,7 Å vergrößert wird und auch kein freier Hydroxylrest einer Ribose in der Nähe vorhanden ist.

Auch die Wasserstruktur vom Guanin-N2 zu der 5'-gelegenen Phosphatgruppe ist relativ regelmäßig ausgestaltet. Allerdings kann hier keine klare Grenze definiert werden, ab der statt einem zwei Wassermoleküle die Verbindung zwischen Base und Phosphatgruppe herstellen. So scheinen im Bereich zwischen 5,8 Å und 6,0 Å beide Optionen möglich zu sein, wobei in der Nähe gelegene Kationen einen nicht unwesentlichen Einfluß auf die Geometrie der Wasserstruktur haben dürften.

Schließlich finden sich auch entlang der Phosphatreste am Eingang zur kleinen Furche regelmäßige Wasserstrukturen, die im Detail zu erläutern allerdings den Rahmen dieser Kurzfassung sprengen würde, zumal zu ihrem Verständnis zunächst die spezifische 3-dimensionale Struktur im Bereich der kleinen Furche erläutert werden müßte. Statt dessen soll an dieser Stelle nochmals betont werden, daß alle Details darauf hindeuten, daß vor allem die Anordnung der funktionellen Gruppen der DNA in der großen und kleinen Furche die Geometrie der Wasserstruktur bestimmen. Aufgrund der extrem hohen Auflösung der drei analysierten Kristallstrukturen und dem wiederkehrenden Dinukleotidmotiv, das jeweils sechsmal in der asymmetrischen Einheit der Kristalle zu finden ist, war es möglich, wiederkehrende Struktur motive klar zu erkennen und ihre Geometrie statistisch auszuwerten. Hieraus kann zweierlei geschlossen werden:

Zum einen sollte auch in anderen DNA-Konformationen, wie der B-DNA und A-DNA-Struktur, und bei unregelmäßigen Sequenzen die Abfolge der funktionellen Gruppen die Geometrie der Hydrathülle in stärkerem Maße bestimmen als die wiederkehrende Abfolge der Ribose-Phosphatreste, ohne daß dies jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden einfach zu erkennen wäre.

Zum anderen kann aus der hohen Konservierung der Hydrathülle und den niedrigen Temperaturfaktoren insbesondere der basengebundenen Wassermoleküle geschlossen werden, daß in reziproker Weise auch die Hydrathülle wesentlich zur Konformation der DNA beiträgt und es daher illegitim ist, bei Modellrechnungen von Nukleinsäurestrukturen die Interaktion mit den Solventmolekülen zu vernachlässigen.

2.6 Konformationsspezifische elektronische Interaktionen

siehe beiliegende Publikation Nr. 5:

Stereoelectronic effects of deoxyribose O-4' on DNA conformation. M. Egli and R. Gessner, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 180-4, 1995

Charakteristisch für Z-DNA ist, wie bereits weiter oben beschrieben, eine alternierende Folge von syn- und anti-Orientierungen der die Base mit der Ribose verbindenden N-glycosidischen Bindung. Hierdurch wird zum einen die Z-DNA-typische alternierende Geometrie des Ribose-Phosphat-Rückgrat bedingt und zum anderen eine abwechselnde Kombination einer geringen Verdrehung zweier aufeinander folgender Basenpaare ("Twist") mit einer starken Verschiebung entlang der langen Achse der Basenpaare ("Slide") sowie im nächsten Dinukleotidrepeat einer starken Drehung mit einer geringen Verschiebung bewirkt. Dies führt im Falle einer alternierenden dC-dG-Sequenz, wie sie den oben beschriebenen hochaufgelösten Kristallstrukturen des d(CGCGCG)-Hexamers zugrunde liegt, zwar zu einer der B-DNA nicht unähnlichen, relativ guten Überlappung ("Stacking") der Basen eines jeden Stranges im GpC-Repeat, verhindert aber selbige komplett im darauf folgenden CpG-Repeat. Durch den starken Slide-Effekt in diesem Repeat kommt es zwar zu einer gewissen Überlappung der in die Mitte verschobenen Cytosin-Ringe der beiden komplementären Stränge, aber die Guanine sind so weit nach außen verschoben, daß sie nicht mit dem jeweils anderen Basenpaar überlappen können. Da das "Stacking" der delokalisierten π -Elektronensysteme der Basen erheblich zur Stabilisierung der DNA-Struktur beiträgt (Referenz), sollte die mangelnde Überlappung der Basenpaare im Bereich des CpG-Repeats die Z-DNA-Konformation destabilisieren.

Eine genaue Untersuchung der molekularen Geometrie des d(CGCGCG)-Hexamers führte jedoch zu der Entdeckung neuer molekularer Interaktionen in der Z-DNA, die nicht unwesentlich zur Stabilisierung dieser ausgesprochen rigiden DNA-Konformation (Thomas & Bloomfield, 1983) beitragen dürften. So fällt auf, daß sich der Sechsring des nach lateral verschobenen Guanins des CpG-Repeats grundsätzlich über dem O4' des fast senkrecht zu der Basenebene stehenden Riboserings des 5'-gelegenen Cytidins befindet. Gleichzeitig kommt es zu einem sehr engen mittleren Kontakt von 2,70 Å zwischen dem O4' und dem C6 des an die Ribose gebundenen Cytosinrings in allen drei bereits im vorangegangenen Abschnitt analysierten, hochaufgelösten Kristall-

strukturen des d(CGCGCG)-Hexamers. Wenn das in der Röntgenstruktur auch bei 1,0 Å Auflösung nicht sichtbare, an das Cytosin-C6 gebundene Wasserstoffatom generiert wird, so erhält man zwischen diesem Wasserstoff und dem O4' der Ribose einen für C–H...O Wasserstoffbrücken typischen Abstand von 2,4 Å und einen ebenfalls passenden C–H...O Winkel von knapp 100°.

Zur weiteren Analyse der spezifischen Interaktionen des Ribose-O4' wurde zunächst die Geometrie der beiden freien Elektronenpaare unter Annahme einer hypothetischen Länge von 1 Å und einem idealen tetraedrischen Winkel generiert. Bei einer zufällig gewählten Bezeichnung der beiden freien Elektronenpaare als "α" und "β" wurde offensichtlich, daß das "β-Elektronenpaar" die Wasserstoffbrücke mit dem Cytosin-H6 bildete, während das "α-Elektronenpaar" senkrecht in den aromatischen Guaninring des CpG-Repeats zeigte. Schon der mit weniger als 2,9 Å äußerst geringe Abstand des O4' von der Basenebene des Guanins deutete auf eine spezielle Interaktion hin. Betrachtet man dazu die Orientierung des freien Elektronenpaars bezüglich der Ringatome des Guanins, so stellt sich heraus, daß es dem C2 am nächsten kommt und mit diesem einen fast tetraedrischen Winkel (etwa 105°) zu dessen Substituent N2 bildet. Diese Orientierung ist in Übereinstimmung mit einem $n \rightarrow \pi^*$ -Hyperkonjugationseffekt und könnte durchaus ebenfalls zur Stabilisierung der Z-DNA-Konformation beitragen.

Es stellt sich bei dieser Analyse die Frage, ob die Interaktion des freien Elektronenpaars des O4' mit dem Guaninring im Bereich des C2 und N2 durch weitere Effekte stabilisiert wird. Hier fällt auf, wie bereits in der Kurzbeschreibung der Publikation Nr. 2 diskutiert, daß Kationen bevorzugt mit den O6- und N7-Positionen des Guanins interagieren und mehr Wasserstoffbrückenbindungen zu diesen knüpfen als zu den negativ geladenen Phosphatgruppen. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß der Guaninring dergestalt polarisiert ist, daß die N7 und O7 eine negative Partialladung bekommen. Dies wäre wiederum in Übereinstimmung mit der in Abschnitt 2.5 und der Publikation Nr. 4 beschriebenen Ausbildung von Wasserstoffbrücken über ein bis zwei Wassermoleküle von dem Guanin N2 sowohl zu der 5'- als auch der 3'-gelegenen Phosphatgruppe. Hinzu kommt schließlich die in den Kurzfassungen bisher nicht beschriebene räumliche Nähe des Guanin C8 zu Phosphatgruppen benachbarter DNA-Helices im Kristall. Ein so erklärbares negative Polarisierung der Guanine auf der Außenseite (N7 und O6) sowie positive Polarisierung auf der Innenseite (N2) würde die Interaktion des freien Elektronenpaars des Ribose O4' mit dem π -Elektronensystem des Guanins im Bereich des C2 auf

jeden Fall verstärken. Eine unabhängige Unterstützung für diese Hypothese findet sich zudem in der bei Z-DNA beobachteten, gegenüber anderen G-C-Basenpaaren wie in der r(GC)-Struktur (Rosenberg et al., 1976) und in der B-DNA des Decamers d(CCAACGTTGG) (Prive et al., 1991; Chiu & Dickerson, 2000), verlängerten C1'-C1'-Distanz, die mit einer Verlängerung der Guanin-N2...Cytosin-O2 und einer Verkürzung der Guanin-O6...Cytosin-N4 Wasserstoffbrückenbindungen einhergeht. Die oben beschriebene positive Polarisierung des N2 und negative Polarisierung des O6 würde nämlich erstere Wasserstoffbrückenbindung schwächen und letztere verstärken.

2.7 2D-NMR-Analyse der Konformationsvariabilität nicht-selbstkomplementärer DNA-Fragmente

siehe beiliegende Publikationen Nr. 6 und 7:

DNA structure in which an adenine-cytosine mismatch pair forms an integral part of the double helix, M.H. Sarma, G. Gupta, R.H. Sarma, R. Bald, U. Engelke, S.L. Oei, R. Gessner and V.A. Erdmann, *Biochemistry*, 26, 7707-15, 1987

DNA hairpin structures in solution: 500-MHz two-dimensional ^1H -NMR studies on d(CGCCGCAGC) and d(CGCCGTAGC). G. Gupta, M.H. Sarma, R.H. Sarma, R. Bald, U. Engelke, S.L. Oei, R. Gessner and V.A. Erdmann, *Biochemistry*, 26, 7715-23, 1987

Mittels Einkristall-Röntgenstrukturuntersuchung lassen sich Moleküldynamiken nur schwer erfassen. In seltenen Fällen gelingt es jedoch, Kristalle unter geringfügig unterschiedlichen Solvent-Bedingungen zu züchten, in denen das untersuchte Biomolekül verschiedene Konformationen einnimmt, die sich im Hinblick auf seine biologische Funktion interpretieren lassen (Müller et al., 2002). Eine noch idealere Situation entsteht, wenn sich mehrere identische Biomoleküle in der asymmetrischen Einheit befinden und in den verschiedenen Positionen ihre konformelle Variabilität entfalten können (Anderson et al., 1999, 2000). Aber selbst in diesen seltenen Fällen ist es unmöglich, die proportionale Verteilung der verschiedenen Konformere in Lösung zu erfassen oder gar die Dynamik ihrer Umwandlung zu bestimmen. Auch kann nicht definitiv bestimmt werden, ob beobachtete konformellen Varianzen in jedem Fall auch in Lösung auftreten oder durch die Kristallpackung induziert werden.

Hochauflösende Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) erlaubt dagegen, die Konformation von Biomolekülen direkt in Lösung zu bestimmen und Konformationsänderungen zu erfassen, die durch die Bindung von Liganden induziert werden (Ottiger et al., 1997). Aus Kristallstrukturuntersuchungen war bekannt, daß innerhalb von ansonsten selbstkomplementären kurzen DNA-Helices auch Basenpaare, die nicht dem Watson-Crick-Schema entsprachen, wie G-T und A-G, toleriert werden (Kennard, 1985). Inwieweit diese energetisch ungünstigeren, erzwungenen Basenpaare die DNA-Struktur destabilisierten und alternative Strukturen, wie z.B. die Hairpin-Konformationen von Einzelsträngen mit terminal palindromischen Sequenzen begünstigten, konnte mit den zu dieser Zeit durchgeführten Röntgenkristallstrukturuntersuchungen nicht beantwortet werden.

Vor diesem Hintergrund wurde ein DNA-Nonamer analysiert, das initial für einen anderen Zweck synthetisiert worden war: d(CGCCGCAGC). Unter dem Aspekt der Toleranz von 2 Mismatches sogar in DNA-Hexameren konnte angenommen werden, daß dieses Molekül DNA-Helices mit einem 5'-dC-Überhang und zwei internen C-A-Mismatches bilden kann. Der Duplex würde durch insgesamt 6 G-C-Basenpaare stabilisiert werden, die, wie aus Lösungsstudien des Hexamers d(CGCGCG) bekannt war, ohne die Anwesenheit von Mismatches bei Raumtemperatur zur Ausbildung einer stabilen DNA-Duplex völlig ausreichen. Da jedoch initiale spektroskopische Untersuchungen Messungen des d(CGCCGCAGC)-Nonamers keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, wurde der pH auf 4,5 gesenkt und die NMR-Untersuchung bei einer DNA-Konzentration von 8 mM, bei 500 mM NaCl und einer Temperatur von 5°C durchgeführt. Der niedrige pH wurde aus der Überlegung gewählt, daß bereits in zwei DNA-Kristallstrukturen eine Protonierung des Cytosin-N3 beobachtet worden war und daher ein niedriger pH die Ausbildung eines C-A-Basenpaares erleichtern könnte.

Unter diesen Bedingungen konnten im Iminobereich drei Resonanzen identifiziert werden, die aufgrund des niedrigen Feldes (~13 ppm) mindestens drei Iminoprotonen basengepaarter Guanine (H1) oder weiterer, protonierter, basengepaarter Purin-Iminopositionen (Purin-N7⁺H in Hoogsteen-Konformation oder Adenin-N1⁺H) entsprechen konnten. Durch die Zuordnung der Ringprotonen der Basen und der Ribose H1' mittels COSY und NOESY konnte gezeigt werden, daß die Riboseresste sowohl des Adenosins (A7) als auch des wahrscheinlich mit ihm basengepaarten Cytidins (C4) integrale Bestandteile einer regelmäßigen DNA-Helix sein mußten. Zudem fanden sich im NOESY eindeutig Crosspeaks zwischen A7-H8 und einem G-H8 (G8) sowie zwischen zwei benachbarten C-H6, die nur C3 und C4 entsprechen konnten. Obwohl über ein 1D-NOE-Experiment eine räumliche Nähe des A7-H2 zu zwei Purin-Iminoprotonen nachgewiesen werden konnte, ließ dieses Experiment keinen Rückschluß darauf zu, ob es sich dabei um ein (mit C4 über 2 Wasserstoffbrücken verbundenes) protoniertes A7-N1 und das benachbarte G8-H1 oder aber um die im Falle eines (mit C4 über nur eine Wasserstoffbrücke verbundenes) nicht-protonierten A7-N1 beide in den Bereich von 3,5 Å gerückten G8-H1 und G5-H1 (des Gegenstranges) handelte. Aufgrund der Präsenz von NOESY-Crosspeaks zwischen benachbarten Purin-H8 und Pyrimidin-H6 sowie zwischen diesen Protonen und den H1'-Protonen der 5'-gelegenen Ribosen sowie den H2'-Protonen der eignen und 5'-gelegenen Ribosen konnte auf eine B-DNA-Konformation geschlossen werden, für die

unter Annahme der beiden alternativen Möglichkeiten eines A-C-Basenpaars zwei Modelle abgeleitet wurden, die mit allen gemessenen NMR-Daten in Übereinstimmung waren (siehe Publikation Nr. 6).

Bei neutralem pH (7,0), niedriger Salz- (20 mM NaCl) und DNA-Konzentration (0,5 mM) fanden sich im Iminobereich wiederum 3 Resonanzen, von denen jedoch nur zwei bei etwa 13 ppm lagen und damit einem basengepaarten Guanin-H1 entsprachen, während die dritte nur eine Verschiebung von weniger als 11 ppm aufwies, wie sie typisch für Iminoprotonen nicht-basengepaarter Guanine und Thyminen ist. Aus diesem Befund wurde bereits der Verdacht abgeleitet, daß die DNA eine Hairpin-Konformation angenommen haben könnte, bei der sich die inneren vier Nukleotide (C4-G5-C6-A7) im Loop befanden. Da die DNA eine ungewöhnlich hohe Schmelztemperatur von $59(\pm 2)^{\circ}\text{C}$ unter diesen Salz- und pH-Bedingungen aufwies und daher die Vermutung nicht ausgeräumt werden konnte, daß auch unter diesen Bedingungen eine DNA-Duplex vorlag, wurde ein zweites DNA-Nonamer in die Untersuchung mit eingeschlossen, bei dem das in der Duplex-Form an der Ausbildung der beiden inneren G-C-Basenpaare beteiligte C durch ein T ausgetauscht war: d(CGCCGTAGC). Die Beobachtung, daß dieses Nonamer mit $58(\pm 3)^{\circ}\text{C}$ eine identische Schmelztemperatur aufwies, schloß bereits eine Beteiligung des internen G-C-Dinukleotids an der Stabilisierung der DNA-Struktur unter den experimentellen Bedingungen aus. Im NMR-Spektrum lag die zusätzliche Resonanz des Thymin-H3 ebenfalls bei weniger als 11 ppm direkt neben der des dritten Guanin-H1 und ließ daraus ebenfalls schließen, daß diese Base ungepaart vorlag.

Die Annahme einer Hairpin-Konformation wurde weiterhin durch die Beobachtungen gestützt, daß bei steigender Temperatur zuerst die Resonanzen der beiden inneren G-H1 schwächer wurden und bei pH 8,5 völlig verschwanden, so wie es für Basen in Loopstrukturen bereits früher gezeigt worden war (Haasnoot, 1983). Zudem konnte kein NOE zwischen den G-H1 bei 13 ppm und denen bei unter 11 ppm gefunden werden; im DNA-Duplex wären die betreffenden Basen in ausreichender Nähe um einen Energietransfer zuzulassen, nicht aber bei der Stem-Loop-Struktur eines DNA-Hairpins. Mittels COSY und NOESY konnten wie bereits zuvor kurz beschrieben die alle nicht austauschbaren Protonen des Basen sowie jeweils das H1' und die beiden H2' aller Ribosen zugeordnet werden. Aus den NOEs zwischen den Basen- und Ribose-Protonen jedes Nukleotids konnte geschlossen werden, daß sich alle Ribose-Reste in der C2'-endo-Konformation befanden und ausschließlich anti-Konformationen der N-glycosidischen Bindung vorlagen. Mit dieser Annahme

konnte unter Einbeziehung der Abstandsdaten und der unvollständigen Solvent-Zugänglichkeit der nicht-basengepaarten Iminoprotonen (G5-H1 und T6-H1) ein mögliches molekulares Modell für eine Hairpinstruktur der beiden untersuchten DNA-Nonamere aufgestellt werden, das alle beobachteten NMR-Daten erklärte. In diesem Modell bilden G2 und C3 mit G8 und C9 einen kurzen Stem-Bereich in B-DNA-Konformation; der Loop wird durch die vier Nukleotide C4-G5-C6-A7 bzw. C4-G5-T6-A7 gebildet, wobei die Basen der letzteren drei Nukleotide eine relativ gute Überlappung (Stacking) zeigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die vorliegenden NMR-Studien eindeutig belegen, daß ein-und-dasselbe DNA-Nonamer in Abhängigkeit von Konzentration, pH, Ionenstärke und Temperatur in zwei grundsätzlich unterschiedlichen Konformationen vorliegen kann, nämlich bei hoher Konzentration in einer dimeren Form als DNA-Doppelstrang mit zwei internen Basen-Mismatches und bei niedriger Konzentration als DNA-Hairpin mit lediglich zwei G-C-Basenpaaren und einer Loop-Konformation, die offensichtlich nicht unwesentlich zur Stabilität beiträgt und für den ungewöhnlich hohen Schmelzpunkt eines derart kleinen DNA-Fragments von fast 60°C mitverantwortlich ist. Allerdings war es zu der damaligen Zeit nicht möglich, molekulare Modelle mit einer vergleichbaren Genauigkeit und Sicherheit, wie sie durch Röntgenstrukturanalysen gewonnen werden kann, aufzustellen. Dennoch ist es bemerkenswert, daß in der einzigen bislang publizierten Röntgen-Kristallstruktur einer DNA-Hairpin-Struktur (Chattopadhyaya, 1988) die dort im Loop befindlichen Thyminen ebenfalls miteinander überlappen (stacken).

3. Struktur und Ligandenbindung des humanen Transferrinrezeptors

3.1 Einleitung, Fragestellung und Diskussion

Der humane Transferrinrezeptor (hTfR) ist ein homodimeres 190 kd Typ II Membranprotein, dem eine zentrale Rolle bei der Regulation der zellulären Eisenaufnahme zukommt. Sein Ligand, das 80 kd Serumprotein Transferrin (Tf) bindet mit hoher Affinität freie Fe^{3+} -Ionen und wird nach Bindung an den TfR mittels Endocytose in die Zelle aufgenommen (Abb. 3.1). In der sauren Umgebung der frühen Endosomen verringert sich die Affinität von Tf für Eisenionen, welche nach Dissoziation und Reduktion zu Fe^{2+} in das Zellinnere transportiert werden (Aisen et al., 2001). Der Komplex aus eisenfreiem apoTf und TfR wird nach der Separation von anderen endosomalen Proteinen vermutlich über tubuläre Strukturen zur Zelloberfläche zurücktransportiert (Hopkins et al., 1994).

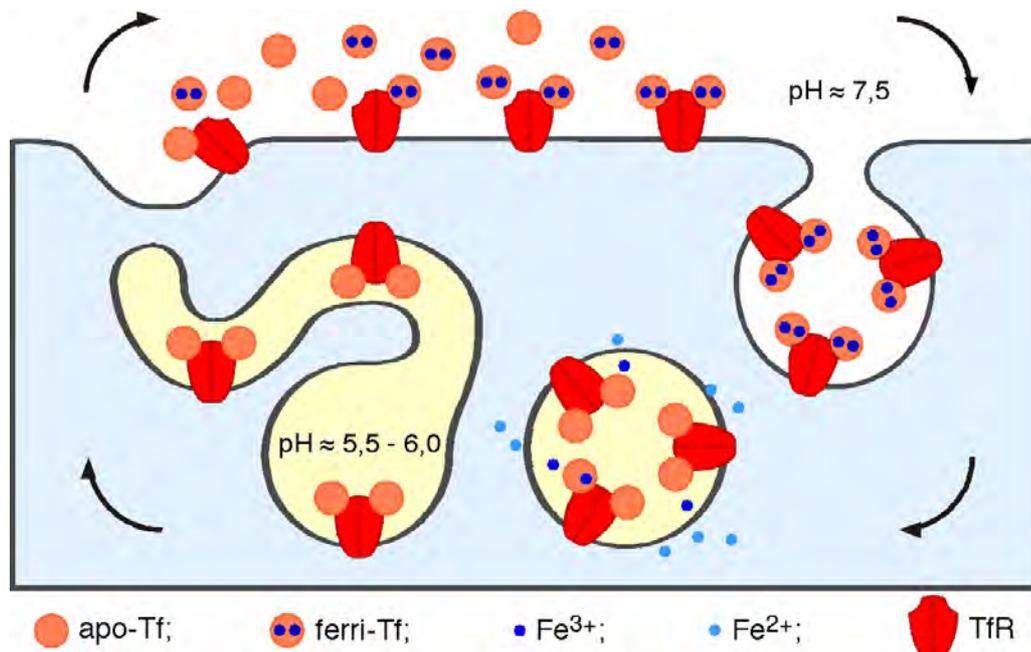


Abb. 3.1: Endocytose-Zyklus des Transferrinrezeptors bei der zellulären Eisenaufnahme: Schematisch dargestellt ist in hellblau eine Zelle, in deren Plasmamembran sich zahlreiche Transferrinrezeptoren (TfR) befinden. Diese binden im neutralen pH-Bereich präferentiell ferri-Transferrin und werden gemeinsam mit diesem endosomal aufgenommen. In den frühen Endosomen verringert sich der pH und die Fe^{3+} -Ionen werden unter Reduktion zu Fe^{2+} durch die endosomale Membran in das Cytoplasma transportiert. Das eisenfreie apo-Tf kehrt im Komplex mit dem TfR an die Zelloberfläche zurück und steht dort nach Austausch des apo-Tf gegen ferri-Tf für einen erneuten Endocytosezyklus zur Verfügung.

Da proliferierende Zellen einen erhöhten Eisenbedarf haben, exprimieren sie verstärkt den auf Translationsebene regulierten TfR, der deshalb auch unter der Bezeichnung CD71 als Proliferationsmarker in der Tumordiagnostik Bedeutung erlangte (Goding & Burns, 1981; Schuurman et al., 1989). Die höchste TfR-Expression zeigen erythropoietische Zellen, die schnell proliferieren und auch extrem große Mengen des Eisenproteins Hämoglobin synthetisieren. Auf der Stufe der Retikulozyten verlieren diese Zellen nicht nur ihren gesamten Proteinbiosyntheseapparat, sondern auch den membranständigen TfR. Dies geschieht im allgemeinen durch Exkretion kleiner Rezeptoraggregate, Exosomen genannt (Johnstone et al., 1991), beim Menschen jedoch überwiegend durch proteolytische Spaltung (Woith et al., 1993). Der bei der Proteolyse in die Extrazellulärflüssigkeit abgegebene große extrazelluläre Teil des TfR (Serum-Transferrinrezeptor oder sTfR genannt) dient in der klinischen Diagnostik als wichtiger Indikator der Erythropoese (Feelders et al., 1999).

Die ersten klaren Evidenzen für die Existenz eines saturierbaren, mit eisenfreiem Transferrin (Tf) kompetierbaren, proteasesensitiven und energieabhängigen zellulären Aufnahmesystems für eisenbeladenes (ferri-) Transferrin auf humanen Retikulozyten wurden bereits 1963 von Jandl & Katz beschrieben, wobei die Autoren jedoch trotz ihrer überzeugenden experimentellen Daten sehr sachlich nur von einem Hinweis, nicht aber einem Beweis für die Existenz eines Transferrinrezeptors sprachen. Interessant ist, daß bereits in diesem Artikel die stärkere Bindung von ferri-Tf im Vergleich zu eisenfreiem apo-Tf sowie die mit dem System gekoppelte Ablösung der Eisenionen vom Transferrin und deren Aufnahme in die Zelle beschrieben wurden. Die erste Isolierung des funktionellen Komplexes aus TfR und Tf sowie eine korrekte Beschreibung der Größe des offensichtlich dimeren TfR folgte 1978 durch Hu & Aisen, die cDNA-Klonierung, Sequenzierung und Sequenzanalyse 1984 durch Ruddle et al. und die Aufklärung der genauen Genstruktur 1997 durch Evans & Kemp.

Die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Protein-Struktur (Abb. 3.2) weist den humanen Transferrinrezeptor als ein Typ-II-Membranprotein aus, bei dem die Transmembrandomäne (Aminosäuren 68-88) gleichzeitig als Signalpeptid dient (Zerial et al., 1986). Die intrazelluläre aminoternale Domäne kann an Serin-24 phosphoryliert werden (Davis et al., 1986) und trägt direkt vor der Transmembrandomäne zwei über eine Thioesterbindung mit Cystein 62 und 69 verbundenen Acylreste (Alvarez et al., 1990). Direkt hinter der Transmembrandomäne sind extrazellulär zwei Cysteine (89 und 98) lokalisiert, die über Disulfidbrücken die beiden Rezeptordimere kovalent verbinden (Jing & Trowbridge, 1987). Ein O-Glycanrest findet sich an Threonin 104 (Do et al., 1990).

und drei N-Glycanreste an den Argininen 251, 317 und 727 (Orberger et al., 1992).

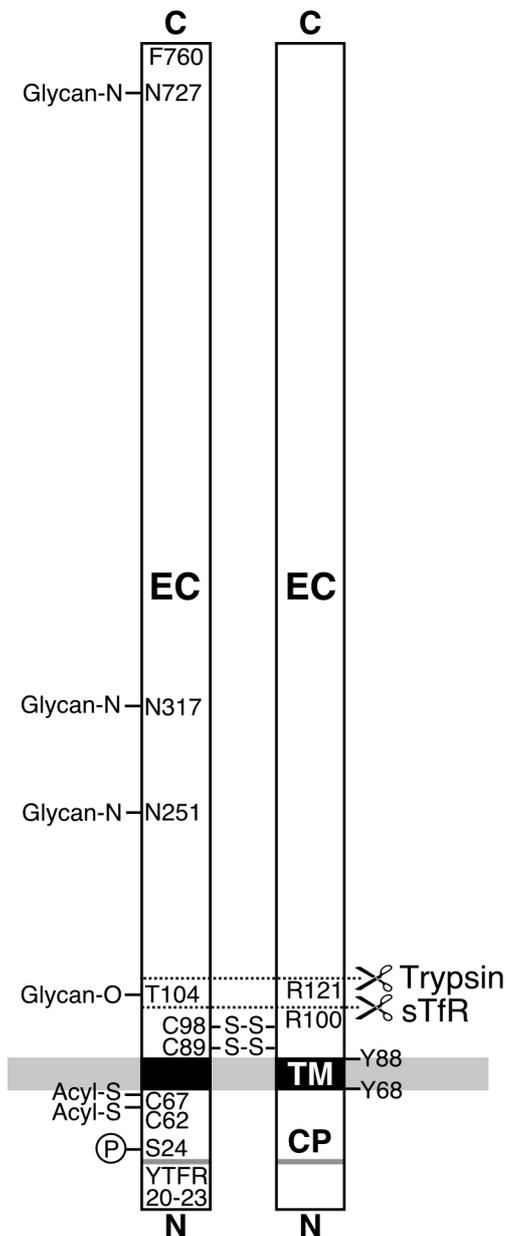


Abb. 3.2: Primärstruktur des humanen Transferrinrezeptors einschließlich posttranslationaler Modifikationen. EC: extrazelluläre und CP: cytoplasmatische Domäne. Details siehe Text.

Im Serum des Menschen wurde eine lösliche, trunkierte Form des Transferrinrezeptors (sTfR) nachgewiesen, der die Aminosäuren 1-100 fehlen (Shih et al., 1990). Da die Spaltung offensichtlich konstitutiv und nahezu unbeeinflusst von Entzündungsprozessen erfolgt, folgt die sTfR-Konzentration im Blutplasma in linearer Weise der Gewebeexpression des TfR (R'zik & Beguin, 2001). Das Verhältnis aus der sTfR- und der Ferritin-Serumkonzentration gilt daher als wichtige Kenngröße zur Unterscheidung zwischen Eisenmangelanämie und entzündungsbedingter Anämie (Malope et al., 2001). Die physiologische Spaltstelle des TfR liegt offensichtlich in einem gut zugänglichen Bereich des Moleküls, da sich auch der gereinigte humane Transferrinrezeptor mit Trypsin effizient hinter Arginin 121 spalten läßt (Turkewitz et al., 1988).

Die bereits früh beobachtete schnelle Hochregulation der TfR-Expression bei zellulärem Eisenmangel (Chitambar et al., 1983) führte zunächst zur Erkenntnis, daß der 3'-untranslatierte Bereich (3'-UTR) der mRNA essentiell für diesen Effekt war (Owen & Kuhn, 1987). In der Folge wurden in diesem

Bereich fünf typische RNA-Hairpin-Strukturen entdeckt, die notwendig und hinreichend für die eisenabhängige Regulation der TfR-Expression sind (Casey et al., 1988). Ähnliche Hairpin-Strukturen (mit Loops oder Bulges im Stem-Bereich) wurden praktisch zeitgleich auch in der 5'-UTR der mRNA beider

Ketten des intrazellulären Eisenspeicherproteins Ferritin (Theil, 1990) sowie später auch bei weiteren, an der Eisenstoffwechselregulation beteiligten Proteinen gefunden (s. Tabelle 3.1). An diese relativ heterogenen Iron-responsive-elements (IRE) genannten mRNA-Strukturen binden mit unterschiedlichen Affinitäten zwei Iron-regulatory proteins (IRP-1, IRP-2), die zu der Aconitase-Gen-superfamilie gehören (Cairo & Pietrangelo, 2000). Interessanterweise findet sich auch in der 5'-UTR der mitochondrialen Aconitase ein IRE; hieraus kann auf eine Verbindung zwischen dem Eisenstoffwechsel und dem Citratzyklus und damit dem zellulären Energiehaushalt geschlossen werden. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, führt ein Eisenmangel in der Tat zu einer Verringerung der Konzentration von Aconitase und Citrat in den Mitochondrien isolierter Hepatocyten, ohne jedoch die Aktivität des Citratcyclus zu verringern (Ross & Eisenstein, 2002). Oxidativer Streß (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$) und NO^{\cdot} führen über zu einem Aktivitätsverlust der IRP und damit sowohl zu einer verminderten Transferrinrezeptorvermittelten zellulären Eisenaufnahme als auch einer vermehrten Ferritin-Synthese. Auf diese Weise wird die zelluläre Menge an freien Eisenionen reduziert (Cairo & Pietrangelo, 2000).

Frühzeitige Versuche, die genetisch bedingte Eisenspeicherkrankheit Hämochromatose mit der Expression des Transferrinrezeptors (Ward et al., 1984) oder mit Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) des TfR-Gens und der beiden Ferritin-Gene zu korrelieren (Sampietro et al., 1987) blieben erfolglos und legten den Schluß nahe, daß weitere Proteine an der Eisenstoffwechselregulation beteiligt sind. Umgekehrt hatten schon vorher Linkage-Analysen einen Bezug der Hämochromatose zum HLA-Locus nahegelegt (Walters et al., 1975). Trotzdem konnte erst wesentlich später das verantwortliche Gen identifiziert und die funktionsinhibierende Mutation (C282Y) nachgewiesen werden (Feder et al., 1996). Das identifizierte Protein war homolog zu den HLA Klasse I-Proteinen, bildete wie dieses einen Komplex mit β 2-Mikroglobulin und wurde daher sowie aufgrund seiner Lage im HLA-Gencluster zunächst als HLA-H bezeichnet, jedoch kurze Zeit später in HFE umbenannt (Mercier et al., 1997). Bereits ein Jahr nach der Entdeckung von HFE als Hämochromatosegen konnte gezeigt werden, daß HFE einen ternären Komplex mit β 2-Mikroglobulin und dem Transferrinrezeptor bildet (Parkkila et al., 1997). In den folgenden Jahren wurde in schneller Folge nicht nur viele weitere, an der Regulation des Eisenstoffwechsels beteiligte Proteine entdeckt, kloniert, sequenziert und funktionell charakterisiert (s. Tabelle 3.1), sondern auch die dreidimensionalen Strukturen des HFE-Proteins (Lebron et al., 1998), des Transferrinrezeptors (Lawrence et al., 1999) und des Komplexes aus HFE und TfR

(Bennett et al., 2000) mittels Röntgenkristallstruktur-Analyse aufgeklärt. Lediglich die auf Proteinebene gut charakterisierten Komplexe aus TfR und Tf sowie aus TfR, HFE und Tf widerstanden lange allen Versuchen, ihre räumliche Strukturen mit physikalischen Methoden aufzuklären. Erst Anfang dieses Jahres gelang es schließlich, die Struktur des Tf-TfR-Komplexes mittels Kryoelektronenmikroskopie aufzuklären (Cheng et al., 2004).

Vor wenigen Jahren wurde zufällig bei der Suche nach neuen Transkriptionsfaktoren auf cDNA-Ebene ein zum TfR homologes Protein entdeckt, das von den Autoren als TfR2 bezeichnet wurde und mit Abstand am stärksten in der Leber exprimiert wird (Kawabata et al., 1999). TfR2 bildet wie TfR1 über Cysteinreste kovalent verknüpfte Homodimere, bindet Tf und vermittelt über Endocytose eine zelluläre Eisenaufnahme. Allerdings fehlen in seiner mRNA jegliche IRE-Sequenzen, so daß eine Regulation der Expression über IRPs ausgeschlossen werden kann; dies wurde später auch experimentell nachgewiesen (Tong et al., 2002). Der TfR2 kann jedoch wichtige Funktionen des TfR1 nicht ersetzen, wie die Analyse von TfR^{-/-}-Knockout-Mäusen zeigte, welche bereits während der Embryonalentwicklung eine starke Anämie und schwere neurologische Entwicklungsstörungen aufwiesen und vor dem Tag E12,5 intrauterin starben (Levy et al., 1999).

Obwohl über 80% aller Patienten mit labormedizinisch gesicherter Hämochromatose homozygot für die C282Y-Mutation des HFE-Proteins sind (Bacon et al., 1999; Åsberg et al., 2001), wurde bald klar, daß dieses Protein nicht selbst an der Resorption von Eisenionen im Gastrointestinaltrakt beteiligt ist, sondern eher die Funktion eines Sensors für die Plasmaeisenionen-Konzentration ausübt. Von den in der täglichen Nahrung enthaltenen 20 mg Fe³⁺-Ionen wird, nach Reduktion zu Fe²⁺ durch das duodenale Cytochrom B (Dcytb), etwa 1 mg durch den ebenfalls apical gelegenen divalenten Metallionentransporter (DMT1, auch divalenter Kationentransporter (DCT1) oder, aus historischen Gründen, NRAMP2 (natural resistance-associated macrophage protein) genannt) in die Enterocyten transportiert. Dort werden die Eisenionen entweder in Ferritin gespeichert oder aber an der basolateralen Seite durch den eisenregulierten Transporter 1 (IREG1, auch Metall-Transportprotein 1 (MTP1) oder Ferroportin genannt) wieder aus der Zelle ausgeschleust. Das ebenfalls in den basolateralen Membranbereichen der Enterocyten lokalisierte Hephaestin, ein dem Coeruloplasmin verwandtes Protein, oxidiert die Fe²⁺-Ionen nahezu simultan, so daß sie umgehend von dem im Blutplasma und der Extrazellulärflüssigkeit vorliegenden Transferrin komplexiert werden können. Bei Eisenmangel werden neben dem TfR auch Dcytb, DMT1 und IREG1 hochreguliert – alle diese

Proteine außer Dcytb enthalten, ebenso wie Ferritin, IRE-Sequenzen in den untranslatierten Bereichen ihrer mRNAs (Philpott, 2002). Eine schematische Darstellung der Eisenresorption im Darm und der Regulation des Eisenstoffwechsels findet sich in Abb. 3.3.

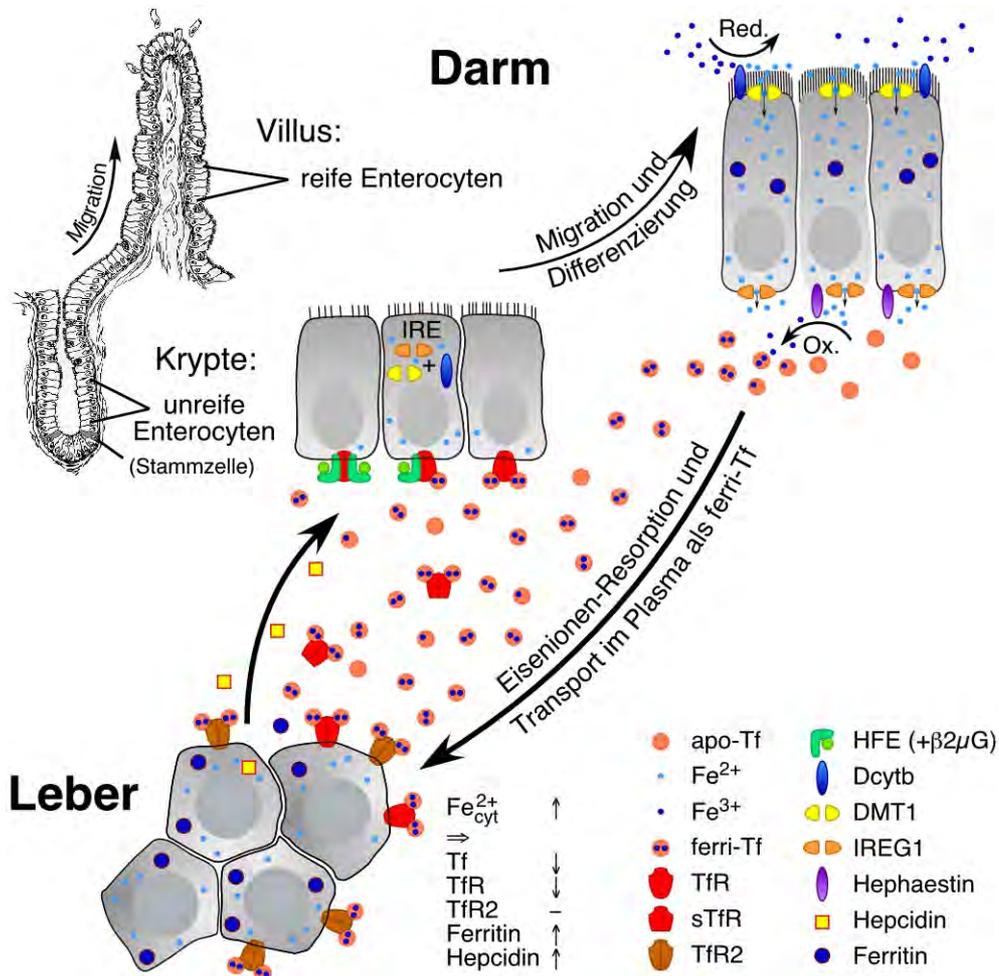


Abb 3.3: Eisenaufnahme in den Enterocyten und Regulation des Eisenstoffwechsels in Darmepithel und Leber. Im apicalen Bereich der reifen Enterocyten befinden sich Dcytb, welches luminales Fe³⁺ zu Fe²⁺ reduziert, und DMT1, das die Eisenionen in das Cytoplasma transportiert. Basal werden die Eisenionen durch IREG1 aus den Zellen hinaus transportiert und im Extrazellularraum durch Hephaestin zu Fe³⁺ oxidiert. Im Plasma werden die Eisenionen quantitativ an Tf angebunden und über den induzierbaren TfR1 in die Zielzellen aufgenommen. In den Hepatocyten, die auch TfR2 exprimieren, wird bewirkt vermehrtes Fe²⁺ über IRP und IRE eine Reduktion der Tf- und TfR-Synthese sowie eine vermehrte Synthese von Hepcidin, das in das Plasma abgegeben wird. Auf der basolateralen Seite unreifer Enterocyten kompetiert HFE mit Tf um die Bindung an den TfR1 und reguliert so die Aufnahme von ferri-Tf und damit indirekt über IRP und IRE die Synthese von Dcytb und DMT1.

Die Gene der an dem Eisenstoffwechsel beteiligten Proteine und einige mit ihnen verbundene Erbkrankheiten sind in der Tabelle 3.1 aufgeführt.

Gen bzw. Genprodukt	Locus & OMIM-Nr.	Funktion des Genprodukts	Phänotyp bei Gendefekten
Tf, Transferrin, <i>TF</i>	3q21 190000	Plasma-Eisentransportprotein, bindet zwei Fe ³⁺ -Ionen	Atransferrinämie
TfR, TfR1, CD71, Transferrin-Rezeptor 1, <i>TFR1</i> , <i>TFR2</i>	3q29 190010	Endocytoserezeptor für Tf, Homodimer, bindet 2 Tf- oder 2 HFE-Moleküle, IRE in 3'-UTR, bei Eisenmangel verstärkt exprimiert	
TfR2, HFE3, Transferrin-Rezeptor 2, <i>TFR2</i>	7q22 604720 604250	Endocytoserezeptor für Tf, 45% Sequenzidentität mit TfR1 in der EC-Domäne, preferentiell in der Leber exprimiert, keine IRE, bei Eisenmangel nicht verstärkt exprimiert	Hämochromatose: Y250X, E60X, M172K, Q690P (Einzelbeschreibungen von Familien)
<i>HFE</i> , HLA-H	6q21.3 235200	"Eisensensor", bindet an TfR1, kompetiert mit Tf um TfR1, bindet nicht an TfR2	Hämochromatose: C282Y, H63D, S65C (alle häufig)
β2-Mikroglobulin, <i>B2M</i>	15q21-22 109700	Assoziiert mit MHC I und HFE, essentiell für Transport dieser Proteine an die Zelloberfläche	
HFE2, Hemojuvelin, <i>HJV</i> , <i>JH</i>	1q21 602390	Funktion des Genproduktes unbekannt, reguliert Eisenaufnahme; Expression Leber, Herz und Skelettmuskel	Juvenile Hämochromatose
<i>Dcytb</i> , <i>DCYTB</i>	2q31.1 605745	Duodenales Cytochrom B, reduziert Fe ³⁺ zu Fe ²⁺ (Ferroreduktase), wird in HFE-k.o.-Mäusen hochreguliert	
Coeruloplasmin <i>CP</i>	3q23-24 117700	Kupfer-assoziierte Eisenoxidase, beteiligt an Fe ²⁺ -Fe ³⁺ -Oxidation	Acoeruloplasminämie, Anämie
Hephaestin, <i>HEPH</i>	Xq11-q12 300167	Kupfer-assoziierte Eisenoxidase, homolog zu Coeruloplasmin	
DMT1, DCT1, NRAMP2, <i>SLC11A2</i>	12q13 600523	Divalenter Kationen/Metallionen-Transporter, preferentiell im Darmepithel exprimiert, in Enterocyten apical lokalisiert, zwei Transkripte, eines mit und eines ohne IRE, verstärkte Expression bei Eisenmangel	
IREG1, FPN1, Ferroportin MTP1, HFE4, <i>SLC11A3</i> , <i>SLC40A1</i>	2q32 604653	Eisen-regulierter Transporter 1 oder auch Metall-Transportprotein 1, basolateral auf Enterocyten, transportiert Fe ²⁺ aus den Enterocyten heraus, IRE in 5'-UTR	autosomal dominante Hämochromatose; erhöhtes Serumferritin

Gen bzw. Genprodukt	Locus & OMIM-Nr.	Funktion des Genprodukts	Phänotyp bei Gendefekten
Hepcidin, HEPC, LEAP1, <i>HAMP</i>	19q13 606464	Kurzes (25 Aminosäuren), vor allem in der Leber synthetisiertes Peptid mit antimikrobieller Wirkung, reguliert negativ Eisenresorption	Verlust: juvenile Hämochromatose; Überexpression: Anämie
Ferritin heavy chain, H-Ferritin, <i>FTH1</i>	11q13 134770	Intrazelluläres Eisenspeicherprotein, hat Ferrioxidaseaktivität, IRE in 5'-UTR, bei Eisenmangel vermindert exprimiert	Hämochromatose
Ferritin light chain, L-Ferritin, <i>FTL</i>	19q13.3-13.4 134790	Intrazelluläres Eisenspeicherprotein, katalysiert Fe ³⁺ -Aggregatbildung, IRE in 5'-UTR, bei Eisenmangel vermindert exprimiert	Hyperferritinämie (IRE-Mutationen)
IRP1, IREBP, <i>ACO1</i>	9p22-13 100880	Iron-response-element-Bindungsprotein 1, cytoplasmatische Aconitase	
IRP2, <i>IREB2</i>	15q24.1 147582	Iron-response-element-Bindungsprotein 2, stärkste Expression in Darm und Gehirn, 57% identisch mit IRP1	
<i>ALAS2</i> , XLSA, ASB	Xp11.21 301300	Retikulocytäre 5-Aminolävulinsäure-Synthase, Schlüsselenzym für die Häm-Synthese, IRE in 5'-UTR	hereditäre sideroblastische Anämie bei diversen Punktmutationen
<i>ACO2</i>	22q11.21-13.31 100850	mitochondriale Aconitase, konvertiert Citrat in Isocitrat, IRE in 5'-UTR	

Tabelle 3.1: Genetische und funktionelle Daten der an der Eisenstoffwechselregulation beteiligten Proteine. Die offiziellen Genbezeichnungen sind in der Spalte "Gen(produkt)" kursiv gesetzt.

Die C282Y-Mutation des HFE-Proteins liegt in der Bindungsstelle für β 2-Mikroglobulin, verhindert die Bildung des funktionellen Komplexes beider Proteine und inhibiert so deren Transport an die Zelloberfläche (Bennett et al., 2000). HFE wird am stärksten in den Krypten des Darmepithels exprimiert, in denen sich die epithelialen Stammzellen teilen und zum Teil als differenzierte Enterocyten in nur wenigen Tagen zur Spitze des Villus wandern, um dort in das Darmlumen abgestoßen zu werden. Da HFE zudem einen ternären Komplex mit dem TfR und Tf eingehen kann, wird angenommen, daß dieser Komplex in den Kryptenzellen, die noch nicht resorptiv tätig sind, endocytiert wird und so deren intrazelluläre Fe²⁺-Konzentration mit der Ferritransferrin-Konzentration im Plasma in Bezug setzt. Bei niedriger intrazellulärer Fe²⁺-Konzentration, d.h. bei

einem physiologischen Eisenmangel, könnten die an der Eisenresorption beteiligten Proteine in den gerade differenzierenden Enterocyten hochreguliert werden und in den folgenden Tagen in den reifen Enterocyten eine verstärkte Eisenresorption bewirken (Philpott, 2002). Mutiertes HFE, das nicht mehr an die Zelloberfläche gelangt, verhindert die Bildung des ternären Komplexes, kann dadurch die Eisenaufnahme in die enteralen Stammzellen stören und dort einen Eisenmangel vortäuschen.

Auch Mutationen des TfR2 führen zu Hämochromatose (Mattman et al., 2002). Da TfR2, dessen primärer Expressionsort die Leber ist, auch in Darmkrypten zu finden ist, könnte es in den gleichen Mechanismus wie HFE eingreifen (Philpott, 2002). Völlig anders wirkt dagegen Heparin, ein kurzes, hauptsächlich in der Leber exprimiertes antimikrobielles Peptid (daher auch LEAP1 genannt). In Mäusen führt eine Suppression von Heparin zu einer Eisenüberladung, seine Überexpression dagegen zu einer starken Anämie (Nicolas et al., 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß Heparin ein Hormon ist, das die Eisenaufnahme negativ reguliert. In diesem Jahr konnte schließlich gezeigt werden, daß zwei Mutationen im Heparin Gen (inzwischen als HAMP bezeichnet), die eine Deletion des Carboxyterminus bzw. eine Frameshiftmutation verursachen, eine besonders schwere Form der juvenilen Hämochromatose bedingen (Roetto et al., 2004).

Obwohl bereits zu Beginn des hier beschriebenen Projektteils über 1000 Publikationen erschienen waren, die den Transferrinrezeptor zum Gegenstand hatten, war zu diesem Zeitpunkt seine dreidimensionale Struktur, im Gegensatz zu der seines Liganden Transferrin, nicht bekannt. Gleichzeitig wichen die Literaturangaben für die Dissoziationskonstante der Tf-TfR-Bindung um mehr als 2 Zehnerpotenzen voneinander ab. Um vor diesem Hintergrund die für den Eisenstoffwechsel sehr wichtige Interaktion von Tf und TfR besser beschreiben zu können, sollten primär zwei Ziele verfolgt werden: Einerseits sollte der humanen Transferrinrezeptor isoliert, solubilisiert und in künstliche Phospholipidmembranen rekonstituiert werden, um eine Strukturanalyse mittels hochauflösender, elektronenmikroskopischer Verfahren zu ermöglichen. Andererseits sollte die Ligandenbindung des TfR in vitro unter Verwendung gereinigter Komponenten mit möglichst hoher Genauigkeit gemessen werden, um so die Basis für weitergehende funktionelle Analysen zu schaffen.

Im Abschnitt 3.2 (Publikation 8) wird die Reinigung des humanen Transferrinrezeptors und seine Membranrekonstitution beschrieben. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der negativkontrastierten Proben wurden über-

raschend zwei ungewöhnliche Strukturen entdeckt: Zum einen gingen von Vesikeln, in die der TfR rekonstituiert worden war, oft lange, tubuläre Strukturen aus, die ebenfalls den Rezeptor enthielten. Die Bildung der Tubuli wurde offensichtlich durch den TfR induziert und kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß der TfR mödie Ausbildung von tubulären Strukturen begünstigt, die zuvor im Zusammenhang mit dem Endocytoseprozess als ultrastrukturelles Korrelat beschrieben worden waren (Hopkins et al., 1994). Zum anderen bildete der TfR selbst in der Anwesenheit von Phospholipiden stabile, rosettenartige Strukturen aus, die auch den Hauptbestandteil der ohne Detergens über viele Monate bei 4°C stabilen Lösung des isolierten TfR darstellten, in der Gelfiltration eine Masse von über 1.000 kd aufwiesen und von uns als Proteopartikel bezeichnet wurden. Die für ein Membranprotein ungewöhnlich hohe Löslichkeit in der Abwesenheit von Detergenzien konnte nur dadurch erklärt werden, daß sich in den Proteopartikeln die hydrophoben Transmembrandomänen des TfR in einer Micelle zusammenlagern und die hydrophilen extrazellulären Domänen nach außen gerichtet sind.

Diese angenommene Struktur der Proteopartikel konnte in der im Abschnitt 3.3 (Publikation 9) beschriebenen Studie bestätigt werden, welche die Untersuchung der Struktur des isolierten und membranrekonstituierten humanen TfR mit elektronenmikroskopischen Verfahren zum Gegenstand hatte. Dabei konnte zunächst mittels Scanning-Transmissions-Elektronenmikroskopie (STEM) die Konformation der bei diesem Verfahren unkontrastierten Proteopartikel verifiziert werden. Gleichzeitig ermöglichte die STEM ein sehr genaue Massenanalyse einzelner Partikel und erlaubte so den Nachweis, daß die Proteopartikel im Mittel aus 9 TfR-Dimeren aufgebaut sind, wobei jedoch die Anzahl der integrierten Rezeptormoleküle recht variable ist und mit einer Standardabweichung von 3 um den Mittelwert streut. Durch die kryoelektronenmikroskopische Analyse des lipidrekonstituierten Rezeptors konnten seine wichtigsten Dimensionen bestimmt und auf dieser Grundlage ein erstes Strukturmodell aufgestellt werden: Die globuläre Ektodomäne des TfR-Dimers besitzt demzufolge einen Abstand von 2,9 nm von der Membran, weist eine Höhe von 6,4 nm und je nach Orientierung eine Breite von 7,5 bis 10,5 nm auf. Aufgrund der geringen phylogenetischen Konservierung der auf die Transmembrandomäne folgenden 30 bis 65 Aminosäuren kann angenommen werden, daß diese Region primär als Abstandhalter für die globuläre Domäne dient. Dieses zwar nur sehr grobe Strukturmodell des TfR war jedoch hilfreich für die Lösung der Röntgenkristallstruktur der TfR-Ektodomäne (Lawrence et al., 1999), die bereits etliche Jahre zuvor erfolgreich kristallisiert worden war (Borhani & Harrison, 1991). Außerdem

lieferte die Studie die bis heute einzigen strukturellen Daten zur Orientierung der globulären Ektodomäne in Bezug auf die Membran und wird daher häufig zitiert, wie z.B. auch in einer kürzlich von Philip Aisen publizierten Übersichtsarbeit zum Transferrinrezeptor 1 (Aisen, 2004).

Um die Tf-TfR-Bindung möglichst genau charakterisieren zu können, wurde zunächst, wie in Abschnitt 3.4 (Publikation 10) beschrieben, ein neuer Festphasen-Assay aufgebaut und validiert, der im Gegensatz zur klassischen Scatchard-Analyse (Scatchard, 1949) ohne eine Markierung der löslichen Komponente auskommt. Bei dieser Methode wird der gebundene Ligand wie beim klassischen ELISA mit einem spezifischen Antikörper und einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Da der klassische ELISA jedoch nur ein relatives Signal liefert, kann damit nicht die Menge an gebundenem Liganden absolut quantifiziert werden und daher auch keine Dissoziationskonstante mittels Scatchard-Analyse berechnet werden. Zur Lösung dieses Problems, wurde der den nicht gebundenen Liganden enthaltende Überstand sukzessiv in weitere Vertiefungen einer mit dem Rezeptor beschichteten Mikrotiterplatte übertragen, um nach und nach unter gleichen Bedingungen den Liganden komplett zu binden und so durch Bezug zur eingesetzten Gesamtmenge den initial gebundenen Anteil absolut quantifizieren zu können. Für dieses als direkt-kalibrierten ELISA (dcELISA) bezeichnete Verfahren wurde eine umfangreiche theoretische Betrachtung durchgeführt, welche auch die Kinetik der Reaktion berücksichtigt, da aufgrund der experimentell limitierten Bindungszeiten keine Gleichgewichtsbedingungen erreicht werden können. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Übertragung des Überstandes nach wenigen Schritten aufgrund der abgeleiteten Gesetzmäßigkeit abgebrochen und auf Unendlich extrapoliert werden kann. Durch verschiedene Linearisierungen lassen sich die experimentell gewonnenen Daten im Prinzip ohne technische Hilfsmittel leicht auswerten und liefern im Vergleich zu den gängigen Verfahren sehr gute Resultate.

Im Abschnitt 3.5 (Publikation 11) wird die Anwendung des Verfahrens zur Charakterisierung der Bindung von Tf an den TfR beschrieben. Im Vergleich zu einer parallel durchgeführten Scatchard-Analyse zeigte sich, daß die dazu erforderliche kovalente Markierung mit Jod-125 zu einer Verringerung der Bindungsstärke führte. Wurde Tf markiert, so stieg die Dissoziationskonstante von $K_d = 0,215 \text{ nM}$ um den Faktor 4,7 auf $K_d = 1,01 \text{ nM}$, wurde dagegen Tf immobilisiert, so resultierte bei unmarkiertem TfR eine Dissoziationskonstante von $K_d = 0,233 \text{ nM}$, die infolge der Jodierung um den Faktor 2,8 auf $K_d = 0,66 \text{ nM}$ stieg. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß wahrscheinlich viele unter Ver-

wendung kovalent markierter Proteine gewonnene Dissoziationskonstanten mit ähnlich großen Fehlern behaftet sind.

Um den neuen Assay im Vergleich zur Scatchard-Analyse (Scatchard, 1949) und zum Verfahren nach Liliom (Liliom et al., 1991) auf seine Fehleranfälligkeit zu untersuchen, wurde, wie in Abschnitt 3.6 (Publikation 12) beschrieben, eine umfangreiche Computersimulation durchgeführt. Dazu wurden für eine kinetisch und thermodynamisch definierte, vorgegebene Bindung Serien von Meßwerten generiert, die jeweils unterschiedliche zufällige oder systematische Fehler aufwiesen. Für jeden Datensatz wurden mit den drei genannten Verfahren Dissoziationskonstanten ermittelt und diese mit dem vorgegebenen Wert verglichen. Hierbei ergab sich, daß alle Methoden anfällig gegenüber den untersuchten Fehlern waren. Überraschend war, daß jede Methode auf andere Fehlern besonders sensibel reagierte; der neue Assay stellte sich dabei insgesamt als recht robust dar. Aufgrund der nicht unerheblichen Anfälligkeit aller Verfahren auf statistische Streuungen der Meßwerte und auf übliche systematische Fehler (z.B. bei der Kalibrierung des Assays und der Bestimmung des Sättigungswertes) sollten experimentell ermittelte Dissoziationskonstanten generell nicht hinsichtlich ihrer Genauigkeit überschätzt werden und möglichst ebenso wie die Wasserstoffionenkonzentration (pH) oder die Dissoziationskonstante von Säuren (pKs) in Form des negativ-dekadischen Logarithmus angegeben werden, der als pKd bezeichnet werden könnte.

3.2 Membranrekonstitution des Transferrinrezeptors

siehe beiliegende Publikation Nr. 8:

Functional reconstitution of the human placental transferrin receptor into phospholipid bilayers leads to long tubular structures proceeding from the vesicle surface. H. Fuchs, R. Geßner, R. Tauber, R. Ghosh, *Biochemistry* 34, 6196-207, 1995

Zum Zeitpunkt des Beginns des hier beschriebenen Projektes lagen zwar bereits umfassende und in mehreren tausend Publikationen dokumentierte Daten zur Funktion des Transferrinrezeptors bei der zellulären Eisenaufnahme, zur Regulation seiner Synthese und seiner Elimination sowie zu seiner Primärstruktur und verschiedenen posttranslationalen Modifikationen vor, aber weder war seine räumliche Struktur aufgeklärt noch die Bindungsstelle für seinen Liganden Transferrin definiert worden. Infolgedessen war, abgesehen von einem gut charakterisierten intrazellulären Sequenzmotiv als Erkennungssignal für die Endocytose (Jing et al., 1990), auch nichts über die Bedeutung der Struktur des TfR für seine Funktion bekannt.

Vor diesem Hintergrund sollte versucht werden, den humanen Transferrinrezeptor zum einen zu kristallisieren, um eine Röntgenstrukturanalyse zu ermöglichen, und zum anderen in Phospholipidmembranen zu rekonstituieren, um seine Struktur mittels Elektronenmikroskopie und Elektronenbeugung aufklären zu können. Da zu diesem Zeitpunkt bereits die Kristallisation der durch Trypsinverdau abgespaltenen extrazellulären Domäne des humanen TfR (Aminosäuren 121-760) beschrieben worden war (Borhani & Harrison, 1991), die Struktur aber mit den damit erhaltenen Datensatz aufgrund der relativ geringen Auflösung und der vielen Einzelmoleküle pro Einheitszelle nicht lösbar erschien, sollten hier bei der Kristallisation zwei andere Wege beschritten werden:

Ziel war zum einen, den intakten Rezeptor unter Verwendung verschiedener Detergenzien als intaktes Molekül in der Hoffnung zu kristallisieren, daß eine Kristallform erhalten werden kann, bei der sich nur ein Molekül in der asymmetrischen Einheit befindet. Zum anderen sollte ein einfaches und effektives Expressionssystem für den humanen Transferrinrezeptor etabliert werden, das es ermöglicht, gezielt hergestellte Mutanten des Rezeptors im präparativen Maßstab zu exprimieren. Da die Reinigung des Rezeptors mittels Ligandenaffinitätschromatographie bereits etabliert war und sehr saubere Proteinpräparationen ermöglichte (s. beiliegende Publikationen 8 und 11), mußte nur ein geeignetes eukaryontisches Expressionssystem gefunden werden, in dem sich der

humane TfR funktionell, d.h. membraninsertiert und zur Bindung von Transferrin befähigt, exprimieren ließ. Die Wahl fiel auf die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, da in diesem System genetische Variationen leicht durchgeführt werden können und es sich für die Herstellung großer Proteilmengen ideal eignet. In einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Christine Lang, Technische Universität Berlin, gelang es, den humanen Transferrinrezeptor in der Hefe zu exprimieren und die Bindung seines Liganden Transferrin nachzuweisen (Terng et al., 1998, siehe auch Verzeichnis der eigenen Publikationen).

In einem alternativen Ansatz wurde das Ziel verfolgt, den gereinigten humanen TfR in künstliche Phospholipidmembranen zu rekonstituieren. Eine erste Voraussetzung hierfür war, in Anwesenheit eines Detergens gereinigten, aber erstaunlicherweise auch ohne Detergens im reinen Zustand für viele Monate haltbaren Rezeptor so mit einem geeigneten Detergens zu solubilisieren, daß er als Einzelmolekül, d.h. als kovalent über Disulfidbrücken verknüpftes Homodimer mit 190 kd molekularer Masse vorliegt. Bei der Untersuchung der Wirkung fünf verschiedener Detergenzien auf das isolierte Protein mittels Elektronenmikroskopie und Gelfiltration wurde festgestellt, daß nur das unpolare 8-POE (Octyl (polydispers)oligooxyethylen) und das ionische LDAO (Lauryldimethylaminoxid) in der Lage sind, eine komplette Solubilisierung zu erreichen. Gleichzeitig wurde beobachtet, daß ohne Zusatz von Detergenzien der gereinigte TfR in der Gelfiltration eine apparente molekulare Masse von weit über 1.000.000 Dalton zeigt und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Oberflächenadsorption und Negativkontrastierung in Form kleiner Aggregate aus durchschnittlich knapp 10 Einzelpartikeln imponiert, die in der Folge als Proteopartikel bezeichnet werden.

Für die anschließenden Rekonstitutionsexperimente wurde ausschließlich 8-POE aufgrund seiner nicht-ionischen Eigenschaften und seiner guten Dialysierbarkeit gewählt. Im nächsten Schritt mußten experimentell in verschiedenen Versuchsserien folgende unabhängige Parameter optimiert werden: 1. die Rekonstitutionsmethoden (4 alternative Verfahren), 2. das verwendete Phospholipid bzw. Phospholipidgemisch (4 Alternativen) und das 3. das Lipid/Protein-Verhältnis (beliebig variierbar). Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden die Rekonstitutionsansätze zunächst in der Ultrazentrifuge sedimentiert, wieder in Puffer aufgenommen, homogenisiert und an einen Kohlefilm absorbiert, um schließlich die erhaltenen Strukturen nach Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop beurteilen zu können. Die besten Ergebnisse wurden mit Phosphatidylcholin im 100fachen Masseüberschuß gegenüber dem Rezeptorprotein und einer Dialyse zur Entfernung des Detergens erzielt.

Überraschenderweise fanden sich in den Rekonstitutionsansätzen neben den erwarteten Lipidvesikeln und unspezifischen Proteinaggregaten auch tubuläre Strukturen, die oft aus den Vesikeln herauszuwachsen schienen. Außerdem waren auf fast allen Aufnahmen in unterschiedlicher Menge die bereits initial beobachteten kleinen Proteopartikel zu erkennen, die jetzt aber besser beurteilt werden konnten, da sie oft separat lagen und ein Größenvergleich zu den vesikulären Strukturen möglich war.

Mit dem Ziel, die einzelnen Komponenten voneinander zu separieren, wurden weitere Rekonstitutionsansätze mittels Ultrazentrifugation über einen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und in jeder Fraktionen die Menge an funktionellem TfR mittels Transferrinbindungssassay bestimmt. Von einer repräsentativen Anzahl von Fraktionen wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. Im Dichtegradienten konnten bezüglich der TfR-Konzentration meist drei Gipfel identifiziert werden, die einem flotierenden lipidreichen Anteil, einer unbekannt Population mittlerer Dichte mit offensichtlich höherem Proteinanteil und einem nahezu durchsedimentierten Teil aus Proteinaggregaten entsprechen sollten. Bei einer Erhöhung des Lipid/Protein-Verhältnisses stieg, wie erwartet, der relative Anteil an TfR in den leichteren Fraktionen. Leider konnte über die Dichtegradientenzentrifugation keine vollständige Separation erzielt werden. In den Fraktionen geringster Dichte fanden sich primär rekonstituierte Vesikel, von denen je nach Rekonstitutionsbedingung entweder kurze knospenartige Strukturen oder auch längere Membrantubuli ausgingen. Neben diesen eindeutig lipidbasierten Strukturen konnten auch vereinzelt Proteopartikel gefunden werden. Da diese Fraktionen meist etwa 1/3 des funktionellen TfR enthielten, mußte in den vesikulären und/ oder tubulären Membranstrukturen ein nicht unwesentlicher Anteil des Rezeptors integriert sein.

In den Fraktionen mittlerer Dichte dominierten eindeutig die Proteopartikel über vereinzelte kleine vesikuläre Strukturen und in den Fraktionen höchster Dichte befanden sich nahezu ausschließlich große Aggregate. Durch eine Phospholipidbestimmung wurde in ausgewählten Fraktionen zusätzliche das Phospholipid/TfR-Verhältnis ermittelt. Dabei zeigte sich, daß der Phospholipidanteil gegenüber den Ausgangsbedingungen in der leichtesten Fraktion meist gering gestiegen, in den mittleren Fraktionen gering gefallen und in der dichtesten Fraktion stark gefallen war. Überraschenderweise enthielt auch der gereinigte Rezeptor einen geringen Massenanteil Phospholipide, der einem stöchiometrischen Verhältnis von knapp 2 Phospholipidmolekülen pro Rezeptormonomer entsprach. Dieses Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, daß die Proteopartikel, die offensichtlich die stabilste Konformation des gereinigten TfR

darstellen, in ihrem Inneren einen hydrophoben Kern besitzen, der aus den Transmembrandomänen der integrierten TfR-Dimere und den oben nachgewiesenen Phospholipiden besteht, und physikalisch einer Micelle entspricht. Dieses Modell würde auch erklären, daß sich die nachgewiesenen Phospholipide nicht durch Detergentien extrahieren lassen, möglicherweise deshalb, weil in dem durch die Transmembrandomänen geometrisch vorgegebenen hydrophoben Bereich sich Phospholipide sterisch besser integrieren lassen als die im großen Überschuß vorhandenen Detergensmoleküle.

Um die Orientierung des TfR in den rekonstituierten vesikulären und tubulären Strukturen bestimmen zu können, wurde eine entsprechende Fraktion mit Trypsin verdaut, welches den zellständigen TfR nahe der Membran spaltet und so ein großes extrazelluläres Fragment mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 80 kd freisetzt. Als Kontrolle diente ein paralleler Ansatz, dem Triton X-100 zugesetzt war, welches die Membran solubilisiert, aber die proteolytische Aktivität des Trypsins nicht beeinträchtigt. Ohne Detergenszusatz blieb etwa 1/3 des TfR unverdaut, mit Detergens erfolgte eine vollständige proteolytische Spaltung. Da sicherlich ein Teil der Rezeptormoleküle nicht in Membranen integriert waren, sondern in Proteopartikelform oder als Einzelmoleküle vorlagen, kann davon ausgegangen werden, daß etwa 50% des Rezeptors gegen den Proteaseverdau geschützt waren und sich damit im Inneren der Vesikel und/oder der Tubuli befunden haben müssen.

In der oben zusammengefaßten Untersuchung konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, den gereinigten humanen Transferrinrezeptor in künstliche Lipidmembranen zu rekonstituieren. Damit wurde gleichzeitig die Voraussetzung für weitergehende Struktur- und Funktionsuntersuchungen geschaffen (siehe die im folgenden beschriebene Publikation Nr. 9). Eine überraschende Entdeckung war, daß der gereinigte, detergensfreie humane TfR in Form kleiner Proteinaggregate (Proteopartikel) vorliegt, die einen kleinen Anteil an Phospholipiden besitzen und sich auch in Anwesenheit von Phospholipiden unter Rekonstitutionsbedingungen bilden. Völlig unerwartet war auch die Entdeckung tubulärer Strukturen, die denen ähneln, die an dem intrazellulären Transport des endocytiierten Transferrinrezeptors beteiligt sind (Hopkins et al., 1994). Da die verwendeten Rekonstitutionsbedingungen denen gleichen, die auch für andere Membranproteine verwendet werden und dabei nie tubuläre Strukturen beobachtet wurden, muß die Induktion dieser Strukturen eine spezifische Eigenschaft des Transferrinrezeptors sein, die auch bei seiner physiologischen Endocytose und intrazellulären Sortierung eine wichtige Rolle spielen könnte.

3.3 Strukturmodell des membraninsertierten Transferrinrezeptors

(siehe beiliegende Publikation Nr. 9)

Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin receptor derived by electron microscopy. H. Fuchs, U. Lücken, R. Tauber, A. Engel and R. Geßner, *Structure* 6, 1235-43, 1998

Aufbauend auf den in Publikation Nr. 8 beschriebenen Ergebnissen sollte im nächsten Schritt versucht werden, die Struktur des Transferrinrezeptor-Dimers näher zu charakterisieren. Da eine zweidimensionale Kristallisation des hTfR in Phospholipidmembranen nicht möglich war, mußten hierzu neue gedankliche und methodische Wege beschritten werden. So sollten zum einen die membranrekonstituierten Rezeptormoleküle mittels Kryoelektronenmikroskopie visualisiert werden, um auf diese Weise ein direktes Abbild der molekularen Struktur zu erhalten. Zum anderen sollte die regelmäßige Struktur der sich aus dem gereinigten Rezeptor mit einem minimalen Lipidanteil bildenden Proteopartikel genutzt werden, um aus ihr ebenfalls Rückschlüsse auf die Struktur des Rezeptordimers ziehen zu können.

Mit dieser Zielsetzung wurde zunächst eine verdünnte Lösung des gereinigten hTfR an ultradünne Kohlefilme adsorbiert und diese im Scanning-Transmissions-Elektronenmikroskop (STEM) untersucht. Bei dieser Methode werden die gestreuten Elektronen eines sehr fein fokussierten Elektronenstrahls ähnlich wie bei der üblichen Rasterelektronenmikroskopie gemessen, wobei jedoch nicht die Totalreflektion an einer metallisch beschichteten Oberfläche, sondern die elastische Beugung der Elektronen an der Elektronenhülle der sich im Strahlengang befindlichen Moleküle das Meßziel darstellt. Da die Signalstärke proportional zu der Anzahl der Elektronen pro Flächeneinheit ist, läßt sich bei bekannter chemischer Zusammensetzung und nach Subtraktion des durch den Kohlefilm bedingten Hintergrundes die molekulare Masse einzelner adsorbierter Partikel genau errechnen. Ein weiterer Vorteil der Methode ist, daß sie neben der Möglichkeit der quantitativen Auswertung auch ein Bild liefert, dessen Grauwerte der relativen Elektronendichte entsprechen (Müller & Engel, 2001).

Die Untersuchung des oberflächenadsorbierten, gereinigten hTfR zeigte klar, daß der größte Teil der Rezeptormoleküle in Proteopartikeln integriert war. Diese imponierten als rosettenähnliche Strukturen, waren aber nicht völlig regelmäßig, sondern enthielten eine variable Anzahl von Rezeptordimeren. Neben den Proteopartikeln ließen sich auch wesentlich kleinere Partikel identifizieren,

von denen angenommen wurde, daß sie isolierten Rezeptordimeren entsprachen. Eine statistische Analyse von 587 zufällig ausgewählten Partikeln ergab eine zweigipflige Massenverteilung mit Maxima bei 185,9 kd und 1669 kd, wobei die Mittelwerte Fehler von lediglich 4,2 kd bzw. 26 kd aufwiesen. Während der erste Wert sehr exakt mit den publizierten Angaben für die molekulare Masse des Rezeptordimers zwischen 186 (Hunt et al., 1989) und 190 kd (Omary & Trowbridge, 1981) übereinstimmte und damit die angenommene Identität der Partikel bestätigte, lies sich aus dem zweiten Wert eine durchschnittliche Anzahl von neun Rezeptordimeren pro Proteopartikel ableiten.

Die große Streuung der Einzelwerte der Proteopartikelmasse (Standardabweichung: 533 kd) entspricht einer Schwankung der Proteopartikelgröße um 9 ± 3 Rezeptordimere. Damit wurde statistisch die visuell beobachtete Heterogenität der Proteopartikel bestätigt. Aufgrund der offensichtlichen sphärischen Anordnung der großen globulären extrazellulären Anteile der Rezeptordimere um die nach innen gerichteten hydrophoben Transmembrandomänen erfüllten die Proteopartikel jedoch trotz der numerischen Heterogenität alle Voraussetzung für ihre Verwendung zur Ableitung eines Strukturmodells für den hTfR. Für diesen Einsatz waren vor allem zwei Eigenschaften der Proteopartikel von zentraler Bedeutung: Zum einen wurde aufgrund der Darstellung mittels STEM ein Abbild des Moleküls selbst und nicht einer dem Molekül abgepaßten Schwermetallhülle, wie sie bei den üblichen Kontrastierungen genutzt wird, erzeugt. Zum anderen konnte davon ausgegangen werden, daß alle Rezeptordimere in den Proteopartikeln in gleicher Weise orientiert waren und sich lediglich um ihre Längsachse (die zweizählige Drehachse des Dimers) drehen konnten. Nachteilig war dagegen, daß durch die Adsorption der Proteopartikel an den Kohlefilm die Konformation der Proteopartikel dahingehend verändert sein durfte, daß der Komplex abgeflacht wurde und dadurch die regelmäßige Orientierung der Rezeptordimere möglicherweise gestört war.

Eine hervorragende Alternative bot hier die kryoelektronenmikroskopische Darstellung von membranrekonstituiertem hTfR in amorphem Eis. Bei diesem Verfahren werden ebenfalls ungefärbte Proben visualisiert, wobei jedoch die Bildrekonstruktion in der Regel nicht numerisch wie beim STEM oder durch Fourier-Transformation wie bei der Elektronenbeugung, sondern konventionell durch magnetische Linsen erfolgt. Dies bedingt zum einen eine sehr geringe Tiefenschärfe und zum anderen ermöglicht es keine Massenbestimmung einzelner Partikel. Aufgrund der geringen Tiefenschärfe kann jedoch ein horizontaler Schnitt durch große dreidimensionale Objekte, wie Phospholipidvesikel, dargestellt werden. Hierzu wurde zunächst der gereinigte, 8-POE-solubilisierte

hTfR unter den in der Publikation Nr. 8 beschriebenen optimierten Bedingungen in präformierte Phospholipidvesikel rekonstituiert. Die Vesikelpräparation wurden mittels Ultrazentrifugation gereinigt, nach ihrer Resuspendierung an einen ultradünnen Kohlefilm adsorbiert und bei 90 K schockgefroren, um eine amorphe Struktur des gefrorenen Puffers zu garantieren. Die Darstellung der Präparate im mit flüssigem Stickstoff gekühlten Elektronenmikroskop ergab drei unterschiedliche Strukturen: Vesikel, die teilweise multilamellar waren, Proteopartikel, und, unerwarteter Weise, einzelne Membranfetzen, die meist vertikal zur ihrer Fläche angeschnitten waren.

Aus den Proteopartikeln konnte die Größe des extrazellulären Anteils der Rezeptordimere abgeschätzt werden; Partikel gleicher Größe fanden sich auch auf der Oberfläche und der Innenseite der meisten Phospholipidvesikel und auf beiden Seiten der isolierten Membranfetzen. Hieraus wurde geschlossen, daß in allen drei Strukturen der hTfR wie in seiner natürlichen Umgebung, der Plasmamembran, so integriert war, daß jeweils der große, globuläre extrazelluläre Teil (672 Aminosäuren) sich auf der einen und der sehr viel kleinere, im Elektronenmikroskop unsichtbare intrazelluläre Anteil (67 Aminosäuren) auf der anderen Seite der Membran befand. Im Gegensatz zur Plasmamembran befand sich der große extrazelluläre Anteil jedoch nicht nur auf der Außenseite der Vesikel, sondern in diesen wie auch in den Membranfetzen mit gleicher Häufigkeit auf beiden Seiten. Bei den Proteopartikeln lag eine besondere Situation vor. Da jedoch bereits gezeigt werden konnte, daß der gereinigte Rezeptor trotz intermediärer Detergensbehandlung mehr als drei Phospholipidmoleküle pro Dimer enthielt und zum größten Teil in der Proteopartikel-Konformation vorlag (Publikation Nr. 8), ist es naheliegend anzunehmen, daß die Proteopartikel innen einen micellenartigen, hydrophoben Bereich aus den Transmembrandomänen und Phospholipiden enthalten, um den herum die extrazellulären (und intrazellulären) Domänen rosettenförmig angeordnet sind.

Unter diesen Annahmen ließen sich aus 72 Einzelanalysen von kryo-elektronenmikroskopischen Abbildungen membraninsertierter Rezeptormoleküle durch Mittelung folgende Dimensionen ableiten: Das Rezeptordimer besitzt einen globulären extrazellulären "Kopf", der sich $2,9(\pm 0,8)$ nm von der Membran entfernt befindet, eine Höhe von $6,4\pm(0,8)$ nm und eine Breite von $9,0(\pm 1,5)$ nm besitzt. Da der Rezeptor um seine eigene 2-fache Rotationsachse frei rotieren kann, ist es möglich, daß die große Varianz der Breite durch die Überlagerung mehrerer Projektionen entsteht. Eine Berechnung unter Einbeziehung des erwarteten Volumens des Rezeptorkopfes ergab bei einer

statistischen Gleichverteilung aller Projektionen als wahrscheinlichste Lösung eine kurze Achse von etwa 7,5 nm und eine lange Achse von etwa 10,5 nm.

Figure 1 der folgenden Publikation:

Lawrence CM, Ray S, Babyonyshev M, Galluser R, Borhani DW, Harrison SC: Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. Science 286, 779-82, 1999

Figure 1 (Teil b und d) der folgenden Publikation:

Fuchs H, Lücken U, Tauber R, Engel A, Geßner R: Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin receptor derived by electron microscopy. Structure 6, 1235-43, 1998

Abb 3.4: (A) Primärstruktur des humanen TfR (weiß: cytoplasmatische Domäne, schwarz: Transmembrandomäne, grau: Hals-(Stalk)-Region) (B) Röntgenstruktur der Ektodomäne (Ribbon-Modell, α -Helices und β -Faltblätter hervorgehoben, aus Lawrence et al., 1999) (C) unkontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen des isolierten, intakten Rezeptors in Proteopartikel-Konformation (Raster-Transmissionselektronenmikroskopie, aus der beiliegenden eigenen Publikation Nr. 9)

Da der Kopf über einen in der elektronenmikroskopischen Aufnahme unsichtbaren, dünnen Halsbereich mit der Transmembrandomäne verbunden sein muß, stellte sich die Frage, welcher Sequenzabschnitt diesem Bereich entsprach. Eine vergleichende Analyse der vier zu diesem Zeitpunkt aus cDNA-Sequenzierungen bekannten Proteinsequenzen (Mensch, Maus, Hamster, Huhn) ergab, daß die ersten 38 (89-126) extrazellulär auf die Transmembrandomäne folgenden Aminosäuren sehr gering und die nächsten 29 (127-155) auch noch vergleichsweise gering konserviert waren. Hieraus konnte geschlossen werden, daß wahrscheinlich der erste oder sogar beide auf diese Weise identifizierten Bereiche an der Ausbildung des Halsbereiches beteiligt sind.

Dieses Modell erklärt auch, die gute Zugänglichkeit der bekannten Proteaseschnittstellen hinter den Aminosäuren 100 (Shih et al., 1990) und 121 (Turkewitz et al., 1988) sowie die Position des sich offensichtlich zum Schutz des Halsbereichs vor Proteolyse am Threonin 104 befindlichen O-Glycans (Rutledge & Enns, 1996).

Bereits ein Jahr nach der hier zusammengefaßten eigenen Arbeit, aber acht Jahre nach der ersten Beschreibung einer erfolgreichen Kristallisation der Ektodomäne (Aminosäuren 121-760) des humanen Transferrinrezeptors (Borhani & Harrison, 1991) wurde die Röntgenkristallstruktur der hTfR-Ektodomäne von der gleichen Arbeitsgruppe publiziert (Lawrence et al., 1999). Für die Lösung der Kristallstruktur waren die elektronenmikroskopisch ermittelten Dimensionen des TfR hilfreich (Harrison, persönliche Mitteilung, 2000). Die Röntgenstruktur hat eine Fülle von Informationen geliefert und das oben beschriebene Modell bestätigt. Insbesondere scheint der Halsbereich in der Tat bis etwa zur Aminosäure 120 zu gehen, da die erste α -Helix der proteaseähnlichen Domäne mit Tryptophan 124 beginnt.

Interessant ist aber vor allem, daß die schmetterlingsförmige Struktur des Transferrinrezeptors (Abb. 3.4A) bereits auf den mittels STEM erstellten Abbildungen ungefärbter Proteopartikel zu erkennen ist (Abb. 3.4B). Hieraus kann geschlossen werden, daß die elektronenmikroskopischen Aufnahmen noch wesentlich detaillierte Informationen enthalten als in der vorliegenden Untersuchung genutzt wurde. Insbesondere mit der in den letzten Jahren erreichten Steigerung der Auflösung bei STEM (Müller & Engel, 2001) und Kryo-EM (Unger, 2001; Orlova & Saibil, 2004) sollte es möglich sein, die lange umstrittene Lage der Transferrin-Bindungsstelle auf dem Transferrinrezeptor (West et al., 2001; Lawrence et al., 1999; Lebron et al., 1998) zu bestimmen. Anfang dieses Jahres wurde schließlich mittels Kryo-EM die Struktur des Komplexes aus der TfR-Ektodomäne und Transferrin gelöst und damit eindeutig gezeigt, daß Tf und HFE um die gleiche Bindungsstelle auf dem TfR kompetieren.

3.4 Quantifizierung von biomolekularen Assoziationen mittels direkt kalibriertem ELISA

(siehe beiliegende Publikation Nr. 10)

Direct calibration ELISA - a rapid method for the simplified determination of association constants of unlabeled biological molecules. H. Fuchs, G. Orberger, R. Tauber and R. Geßner, J. Immunol. Meth. 188, 197-208, 1995

Nahezu alle Funktionen von Biomolekülen sind eng an ihre Interaktion mit anderen (oder gleichen) Molekülen gebunden. Daher ist die Quantifizierung derartiger Interaktionen im Sinne der Bestimmung der Dissoziations- bzw. Assoziationskonstante eine vordringliche Aufgabe. Die mit Abstand bisher am häufigsten hierzu verwandte Methode ist die Scatchard-Analyse (Scatchard, 1949). Hierbei wird ein Biomolekül an einer Festphase immobilisiert und das zweite, meist radioaktiv markierte (Liganden-) Molekül in definierter Menge hinzugegeben, um nach Einstellung des Gleichgewichts beide Phasen zu trennen und über die spezifische Aktivität die Menge an gebundenem und ungebundenem Liganden zu ermitteln. Wird nun das Verhältnis zwischen gebundenem und ungebundenem Liganden über der absoluten Menge an gebundenem Liganden aufgetragen, so ergibt sich die Dissoziationskonstante (K_d) aus der Steigung (m) der Ausgleichsgeraden ($K_d = -1 / m$). Gleichzeitig gibt eine Abweichung von der Linearität Hinweise auf mehrere Bindungsstellen, kooperative Bindung etc.

Ein wesentlicher Nachteil der Methode liegt jedoch in der notwendigen Bestimmung der absoluten Menge an gebundenem Liganden. Im Falle einer kovalenten Markierung mit einem Radioisotop, wie I-125, läßt sich dies zwar leicht durch eine Berechnung der spezifischen Aktivität erreichen, als Nachteil wird jedoch in der Regel eine oft wenig gerichtete Modifikation des Liganden in Kauf genommen, die das Bindungsverhalten durchaus beeinflussen kann. Ein weiterer, wesentlicher Nachteil besteht darin, daß nicht-radioaktive Meßverfahren, wie z.B. die Detektion mit ligandenspezifischen Antikörpern, die sekundär über ihre Kopplung an Enzyme oder Fluorochrome sehr empfindlich und mit vergleichsweise geringem Aufwand spektroskopisch über Absorptions-, Fluoreszenz- oder Lumineszenzmessungen quantifizieren lassen, aufgrund der fehlenden Kalibrierbarkeit nicht eingesetzt werden können. So liefert zwar eine Enzymreaktion sehr gut reproduzierbare Werte, aufgrund der Abhängigkeit des Resultats von vielen weiteren Faktoren, wie Enzymalterung, Inkubationszeit, Tempe-

ratur etc., ist eine Kalibrierung in der Praxis jedoch nahezu unmöglich. Ähnliches gilt wegen des Verblässens ("Bleaching") auch für viele Fluorochrome.

Vor diesem Hintergrund erschien es mir sinnvoll, eine interne Kalibrierung zu schaffen, die bei der Durchführung einer Meßserie nur einmal durchgeführt wird und sich auf alle in analoger Weise durchgeführten Messungen einer Serie übertragen läßt. Diese Kalibrierung sollte sich auf alle Meßverfahren anwenden lassen, die nur innerhalb einer Meßserie hochreproduzierbare Werte liefern, wie z.B. die klassische ELISA-Technik. Folgende Überlegungen führten schließlich zu einer adäquaten Lösung: Wenn die Bindung von zwei Molekülen untersucht werden soll, so wird einer der beiden Bindungspartner (R, "Rezeptor") immobilisiert (z.B. auf einer Mikrotiterplatte) und der zweite (L, "Ligand") in gelöster Form hinzugegeben. Nach Einstellung des Gleichgewichts läßt sich die Menge an gebundenem Liganden (RL) z.B. mit einem Enzym-gekoppelten Antikörper und einer anschließenden Farbreaktion messen. Dabei ist innerhalb einer Versuchsreihe das gemessene Signal, z.B. ein Absorptionswert (A), proportional zu der gebundenen Menge an Liganden: $RL = c \cdot A$. Das Problem bestand nun darin, den Proportionalitätsfaktor c zu ermitteln. Hierzu hatte ich eine einfache Idee: Wenn man eine definierte Menge an gelöstem Liganden (L_0) in einem ersten Reaktionsgefäß an seinen immobilisierten Interaktionspartner (R_0) binden läßt, den Überstand nach Einstellung des Gleichgewichts in ein weiteres Gefäß transferiert und diesen Vorgang beliebig oft wiederholt, so sollte schließlich auch das letzte Ligandenmolekül gebunden werden. Addiert man nun alle gemessenen relativen Signale (A_i) so entspricht dieser Wert der initial eingesetzten Menge des Liganden:

$$L_0 = \sum_{n=1}^{\infty} RL_n = c \cdot \sum_{n=1}^{\infty} A_n \quad (1)$$

Sofern die Menge an immobilisiertem Rezeptor im Vergleich zur Menge an eingesetzten Liganden sehr groß ist ($R_0 \gg L_0$) und daher durch die Bindung des Liganden nur in vernachlässigbar geringer Weise reduziert wird ($R_n \approx R_0$), läßt sich leicht zeigen, daß die Menge an gebundenem Liganden bei jedem Transfer um einen konstanten Faktor (F) abnimmt und so einer geometrischen Reihe entspricht (s. Anhang A in Publikation Nr. 10):

$$RL_n = RL_1 \cdot F^{n-1} \quad \text{bzw.} \quad A_n = A_1 \cdot F^{n-1} \quad (2)$$

Hierbei wurde der Transferfaktor F definiert als:

$$F = (1 + K_a \cdot R_0)^{-1} \quad (3)$$

Dabei entspricht die Assoziationskonstante K_a dem reziproken Wert der sonst meist benutzten Dissoziationskonstante K_d ($K_a = 1/K_d$); sie wurde hier durch-

gehend verwendet, da sich dadurch die mathematische Darstellung vereinfachte. Ein dem obigen Modell entsprechendes Transferexperiment, bei dem der Logarithmus des gemessenen Signals ($\ln A$) über der Transferzahl aufgetragen wird, ergibt als Steigung der linearen Kurve $\ln F$. Zudem läßt sich in dieser Darstellung eine zu große initiale Ligandenkonzentration durch eine Abweichung von der Linearität in den ersten Transferschritten erkennen.

Durch Substitution von A_n in Gleichung (1) durch Gleichung (2) und Lösen der geometrischen Reihe läßt sich c als Funktion von L_0 , A_1 und F ausdrücken und damit aus dem Transferexperiment berechnen:

$$c = \frac{L_0}{A_1} \cdot (1 - F) \quad (4)$$

Während A_1 dem ersten Meßsignal entspricht, muß die Anfangskonzentration des Liganden L_0 zuvor in einem unabhängigen Experiment bestimmt werden.

Wird die Gleichung (3) nach K_a aufgelöst, so ergibt sich:

$$K_a = \frac{1 - F}{F \cdot R_0} \quad (5)$$

Da sich die Menge an bindungsfähigem immobilisierten Rezeptor (R_0) bei bekanntem c leicht durch eine Sättigungskurve ermitteln läßt, kann die Assoziationskonstante K_a auf diese Weise direkt ermittelt werden.

Alle bisherigen Berechnungen wurden allerdings unter der Annahme durchgeführt, daß bei jedem der sequentiellen Bindungsexperimente im Transferassay sich ein Gleichgewicht einstellen kann. Dies ist aus offensichtlichen Gründen jedoch nicht realisierbar, selbst wenn nur eine limitierte Anzahl von Transfers durchgeführt wird. Daher wurde in Anlehnung an die oben beschriebene Herleitung unter Einbeziehung der für solche Bindungsexperimente typischen Assoziationskinetik erster Ordnung eine zeitabhängige Ableitung durchgeführt (s. Anhang B in Publikation Nr. 10). Dabei ergab sich folgender Ausdruck für den von der konstanten Inkubationszeit t eines jeden sequentiellen Bindungsexperimentes abhängigen Transferfaktor F_t :

$$F_t = F + \left((R_0 \cdot K_a)^{-1} + 1 \right)^{-1} \cdot e^{-k_c \cdot t} \quad (6)$$

Aus dieser Gleichung ist leicht ersichtlich, daß sich das zeitunabhängige F durch Extrapolation der F_t für $t \rightarrow \infty$ ermitteln läßt. Zur experimentellen Realisierung wird daher nicht nur ein Transferexperiment, sondern eine Serie von Experimenten durchgeführt, bei denen der Zeitraum für die Bindung des Liganden variiert wird. In einer Darstellung von F_t über $\exp(-k_c \cdot t)$ ergibt sich eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Ordinate F ergibt. Ferner ergibt eine Grenzwertbetrachtung, daß für $t = 0$ der zeitabhängige Transferfaktor F_t den Wert 1 annimmt. Diese Randbedingung erleichtert die graphische Extrapolation. Aus dem

zeitunabhängigen F kann, wie oben gezeigt, bei bekanntem R_0 leicht K_a berechnet werden.

Die Methode der direkten Kalibrierung wurde in Kombination mit einer Standard-ELISA-Technik anhand der Bindung eines monoklonalen Antikörpers (OKT9) an sein Antigen (humaner Transferrinrezeptor) validiert (dcELISA). Dabei diente der hTFR als immobilisierter Rezeptor (R) und OKT9 als löslicher Ligand (L). Zum Vergleich wurde OKT9 mit I-125 kovalent markiert und seine Bindung mittels Scatchard-Analyse quantifiziert. Da die kovalente Modifikation von Tyrosinresten mit I-125 durchaus das Bindungsverhalten beeinträchtigen könnte und in diesem Falle prinzipiell nicht mehr zwischen diesem Effekt und einem systematischen Unterschied beider Methoden unterschieden werden kann, wurde zudem die Bindung des iodierten Antikörpers auch mittels dcELISA bestimmt. Während die beiden letzteren Methoden Assoziationskonstanten lieferten, die um weniger als 10% voneinander abwichen und damit innerhalb der Fehlergrenzen als identisch zu betrachten waren (RIA: $K_a = 2,71 \cdot 10^9$ l/mol bzw. $K_d = 0,369 \cdot \text{nM}$; dcELISA: $K_a = 2,96 \cdot 10^9$ l/mol bzw. $K_d = 0,338 \cdot \text{nM}$), ergab sich mittels dcELISA für den unmodifizierten Antikörper eine etwas kleinere Assoziationskonstante ($K_a = 2,15 \cdot 10^9$ l/mol bzw. $K_d = 0,465 \cdot \text{nM}$). Dies scheint darauf hinzudeuten, daß die für die radioaktive Markierung erforderliche kovalente Modifikation die Bindung des Antikörpers an sein Antigen geringfügig stört.

Der dcELISA ermöglicht es, mit einem sehr geringem Geräteaufwand das Bindungsverhalten von Biomolekülen, insbesondere von Proteinen, im Hinblick auf die Assoziationskonstante und die Bindungskinetik zu analysieren, sofern zumindest für einen der Interaktionspartner ein Antikörper mit hinreichender Affinität verfügbar ist und der andere Bindungspartner sich leicht immobilisieren läßt. Weiterhin muß auch sichergestellt sein, daß der Antikörper nicht die Bindung der beiden Reaktionspartner stört. Da diese Fragen in Vorexperimenten leicht geklärt werden können, eignet sich die beschriebene Methode vor allem für Labore mit geringer Geräteausstattung.

3.5 Transferrinrezeptor-Ligandenbindung wird durch kovalente Markierung signifikant verändert

(siehe beiliegende Publikation Nr. 11)

Iodination significantly influences the binding of human transferrin to the transferrin receptor. H. Fuchs and R. Geßner, *Biochim. Biophys. Acta* 1570, 19-26, 2002

Die Entwicklung des oben beschriebenen Verfahrens der direkten Kalibrierung von Bindungsassays ohne vorherige Markierung des jeweiligen Liganden eröffnete auch die Möglichkeit, die Bindung von Transferrin an seinen Rezeptor mit gereinigten Komponenten genau zu quantifizieren. Dieser für die Eisenaufnahme von Vertebratenzellen essentielle Schritt war zwar bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden, doch divergierten die publizierten Dissoziationskonstanten für den humanen TfR um mehr als 2 Zehnerpotenzen. Die schwächste Bindung wurde mit einer K_D von 20–29 nM für den membranständigen Rezeptor auf plazentaren Zellen (Brown et al., 1982) und die stärkste Bindung mit $K_D = 0,12$ nM für die Bindung von Transferrin an ein Membranlysat aus HL60-Zellen gemessen (Chitambar & Zivkovic, 1989). Weitere Arbeiten, die zu Dissoziationskonstanten zwischen diesen beiden Extremwerten geführt hatten, stützten sich meist auf die Messung der Bindung von I-125-markiertem Transferrin an hTfR-exprimierende Zellen.

Die in den jeweiligen Publikationen kaum diskutierten, nicht unwesentlichen Unterschiede in der Bindungsstärke können zum einen (bei Untersuchungen an lebenden Zellen) auf die Überlagerung von Bindung und Internalisierung, kombiniert mit einer partiellen intrazellulären Degradation des TfR-Tf-Komplexes und zum anderen (auch bei der Untersuchung von Zellextrakten) auf die Bindung des markierten Tf an andere Rezeptoren, wie den Asialoglycoproteinrezeptor und den kürzlich entdeckten TfR2 (Kawabata, 1999), zurückgeführt werden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß in den publizierten Studien die – sicherlich jeweils etwas unterschiedlich starke – Iodierung des Tf dessen Affinität für den Rezeptor beeinträchtigt hat.

Vor diesem Hintergrund sollte an gereinigten Komponenten (hTfR und hTf) sowohl mittels direkter Kalibrierung in einem "Enzyme-linked Assay for Receptor-Ligand Interactions" (EARLI) als auch nach kovalenter Markierung entweder des Liganden Tf oder des Rezeptors TfR mittels Scatchard-Analyse die Dissoziationskonstante möglichst genau bestimmt werden. Zunächst wurde hierzu die Reinheit der beiden Proteinkomponenten sowie die Liganden-Bindungsfähigkeit des isolierten hTfR und die kovalente Markierung beider

Proteine mit I-125 mittels SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie überprüft. Die für die direkte Kalibrierung erforderliche Analyse der Bindungskinetik wurde sowohl mit nativem, als auch mit kovalent (I-125) und nicht-kovalent (Fe-59) markiertem Transferrin durchgeführt und ergab eine nur etwa halb so schnelle Assoziationskinetik für das I-125-markierte Transferrin, während das unmodifizierte und das durch Bindung von Fe-59-(III)-Ionen markierte Transferrin sich praktisch gleich verhielten.

Nach einer eingehenden Überprüfung möglicher experimenteller Fehlerquellen, die durch ein Ablösen des immobilisierten Bindungspartners oder durch eine Instabilität der für die Analyse eingesetzten Antikörperkomplexe entstehen könnten, wurden eine Reihe von Transferassays mit unterschiedlichen Inkubationszeiten für den Tf-TfR-Komplex durchgeführt und aus einem F-Plot unter Einbeziehung der Ergebnisse der kinetischen Analyse und eines Ligandensättigungsexperimentes die Dissoziationskonstante berechnet. Für die Bindung von Tf an den immobilisierten TfR wurde eine Dissoziationskonstante von $K_D = 0,215$ nM ermittelt und für ein zur Kontrolle durchgeführtes reziprokes Experiment, bei dem Tf immobilisiert wurde und TfR in Lösung blieb, eine K_D von 0,233 nM. Die Bindung von I-125-markiertem Tf an immobilisierten TfR ergab dagegen in der Scatchard-Analyse eine wesentlich größere Dissoziationskonstante von $K_D = 1,01$ nM und das reziproke Experiment, unter Bindung von I-125-markiertem TfR an immobilisiertes Tf, eine ebenfalls erhöhte K_D von 0,66 nM. Eine numerische Auswertung der letzteren Bindungsdaten mit Hilfe des Programms "LIGAND" führte zu nahezu identischen Werten, wobei sich je nach Vorgabe des Modells geringfügige Unterschiede ergaben, die jedoch wesentlich kleiner waren als die Differenzen der Bindungskonstanten zwischen den unmodifizierten und den kovalent markierten Proteinen. Der negative Effekt der Iodierung war beim Tf (Faktor 4,7) wesentlich größer als beim TfR (Faktor 2,8); offensichtlich beeinträchtigt die Modifikation von Tyrosinresten die Geometrie der Bindungsstelle des Tf stärker als die des TfR.

3.6 Fehleranalyse der Messung biomolekularer Interaktionen

(siehe beiliegende Publikation Nr. 12)

The result of equilibrium-constant calculations strongly depends on the evaluation method used and on the type of experimental errors. H. Fuchs and R. Geßner, *Biochem J.* 359, 411-8, 2001

Um die Zuverlässigkeit der oben beschriebenen Methode zur Bestimmung der Bindungsstärke zwischen makromolekularen Interaktionspartnern (EARLI) im Vergleich zu anderen, lange etablierten Methoden, wie der Scatchard-Analyse, zu evaluieren, sollte eine umfassende Fehleranalyse im Rahmen einer Modellrechnung durchgeführt werden. Hierzu wurden virtuelle Datensätze generiert, die aus realistischen Randbedingungen abgeleitet und jeweils von einer definierten Fehlergröße überlagert wurden.

Als typische Ausgangsbedingung wurde eine Dissoziationskonstante von $K_d = 1$ nM, eine initiale Konzentration des immobilisierten "Rezeptors" von $R_0 = 2$ nM und acht verschiedene initiale "Liganden"-Konzentrationen im Bereich von $L_0 = 0,35$ bis $L_0 = 16$ nM angenommen. Für jeden der acht Datenpunkte wurden zum einen die erwarteten Konzentrationen der unter Gleichgewichtsbedingungen gebildeten Rezeptor-Liganden-Komplexe (RL_e) für jede Ligandenkonzentration ermittelt. Zum anderen wurde die scheinbare Konzentrationen der Rezeptor-Liganden-Komplexe (RL_d) unter Einbeziehung systematischer Abweichungen ("Deviations") sowie zufälliger Fehler berechnet und die Auswirkung dieser definierten Fehler auf die mit unterschiedlichen Auswerteverfahren ermittelten Dissoziationskonstanten ermittelt. Für die Auswertung mittels direkter Kalibrierung (s.o.) wurde zusätzlich eine Bindungskinetik erster Ordnung mit einer Zeitkonstante von $k_c = 0,0001$ s⁻¹ simuliert.

Folgende systematische Fehlerquellen wurden in die Untersuchung einbezogen: Additiver Fehler des Meßwertes (falsche Leerwertsubtraktion), linearer Fehler (durch falsche Kalibrierung, d.h. Fehler bei der Bestimmung von L_0), Sättigungsfehler (systematische Unterschätzung hoher Meßwerte von RL) sowie Fehler durch Nichterreichen des Gleichgewichts. Schließlich wurden in einem weiteren Simulationsexperiment zu jedem "Meßwert" ein zufällig erzeugter, gleichverteilter Fehler addiert, der jedoch in seinen Extremwerten begrenzt war.

Jeder dergestalt erzeugte virtuelle Datensatz wurde mit drei verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstante analysiert: Nach Scatchard (Scatchard, 1949), Liliom (Liliom et al., 1991) und mittels direkter Kalibrierung (s.o., Publikationen 10 und 11). Die virtuelle Analyse ergab einige überraschende Ergebnisse, die im folgenden kurz zusammengefaßt werden sollen.

In einer ersten Simulation wurden die idealen Daten mit zwei typischen systematischen Fehlern versehen: Einem Kalibrierungsfehler von +20% (d.h. linear zu hohe Meßwerte) und einem progressiven Sättigungsfehler, der bei dem erwarteten Sättigungswert von R_L ein um 30%, bei 1/5 des Sättigungswert aber ein nur um 1% verringertes Meßsignal liefert. Statt des erwarteten K_d von 1 nM erhält man unter diesen experimentell durchaus möglichen Fehlerbedingungen mittels Scatchard-Analyse einen K_d von 0,46 nM, nach Liliom 0,55 nM und durch direkte Kalibrierung 0,73 nM. Eine genaue Analyse aller einzelnen Auswerteschritte ergibt, daß die direkte Kalibrierung deshalb vergleichsweise robust gegen die untersuchten Fehler ist, weil zum einen lineare Fehler keinen Einfluß auf die Auswertung haben (im Transfer-Assay wird der Logarithmus über der Anzahl an Transfers aufgetragen und die Steigung ermittelt) und zum anderen Sättigungsfehler hohe Meßwerte wesentlich stärker betreffen als niedrige, aber aufgrund der kurzen Bindungszeiten bei der direkten Kalibrierung kaum hohe Meßwerte auftreten. Im Gegensatz zu den beiden anderen Methoden führt allerdings die direkte Kalibrierung aufgrund der bei ihrer Ableitung angenommenen Approximationen auch ohne die Einbeziehung systematischer Fehler zu einer Abweichung des berechneten K_d -Wertes von dem erwarteten Wert um knapp +1%.

In einer zweiten Serie von Simulationen wurde jeweils eine Fehlergröße in kleinen Schritten variiert und die Abweichungen der mit den drei Methoden ermittelten K_d Werte von dem erwarteten Wert über der Fehlergröße aufgetragen. Hierbei wurden auch solche Fehler analysiert, die nur für die direkte Kalibrierung relevant sind, wie z.B. die initiale Ligandenkonzentration L_0 im Transferassay. Da die mathematische Ableitung der direkten Kalibrierung auf der Annahme basiert, daß $L_0 \ll R_0$ ist (s. Text unter Gleichung 1 in Publikationen 10), wurde ein großer Fehler erwartet, wenn diese Bedingung nicht erfüllt wird. In der Tat weicht der für K_d berechnete Wert bei $L_0 > R_0 / 40$ um mehr als 1% und bei $L_0 > R_0 / 4$ um mehr als 10% vom wahren Wert ab. Solange die Bedingung $L_0 < R_0 / 40$ eingehalten wird, erzeugt jedoch selbst eine Variation der Menge an immobilisiertem Rezeptor R_0 oder der wahren Dissoziationskonstante K_d um mehrere Zehnerpotenzen keine Fehler von über 1%.

Eine langsame Assoziationskinetik bewirkt, ebenfalls erwartungsgemäß, bei der Auswertung nach Scatchard und Liliom wesentlich größere Fehler als bei der direkten Kalibrierung, da letztere die Assoziationskinetik in die Berechnung einbezieht. So ergibt sich z.B. bei einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_C = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ selbst bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden in der Scatchard- und Liliom-Auswertung ein um 45% bzw. 40% zu großer Wert für K_D , bei der direkten Kalibrierung jedoch nur von weniger als 5%. Während Kalibrierungsfehler, wie bereits initial beschrieben, bei der direkten Kalibrierung nur einen unwesentlichen Einfluß auf K_D haben, bedingt ein solcher Fehler bei den beiden anderen Auswerteverfahren einen nahezu linearen, fast doppelt so großen inversen Fehler von K_D (etwa -10% Abweichung bei einem Kalibrierungsfehler von 6%). Fehlerhafte Leerwert-Korrekturen wirken sich dagegen bei allen drei Verfahren verheerend aus: Ein um nur 3% zu hoch angesetzter Leerwert bewirkt Abweichungen von K_D um +12% (Liliom), -19% (direkte Kalibrierung) und +28% (Scatchard). Bei der direkten Kalibrierung läßt sich dieser Fehler wesentlich verringern, wenn im Transferassay lediglich die ersten 4 Schritte berücksichtigt werden (mit den größten Signaldifferenzen). Allerdings steigt bei wenigen Datenpunkten wiederum die durch die statistische Streuung realer Meßwerte bedingte Ungenauigkeit.

Als Sättigungseffekt wurde eine mit der Signalintensität überproportional zunehmende Unterschätzung der Meßwerte für RL um den Faktor $C_{S(RL)}$ definiert (Gleichung 7). Beschrieben wird diese Abweichung durch ihren maximalen Wert C_S (im Zustand der Sättigung) und durch einen zweiten Parameter, S , der eine exponentielle Abhängigkeit dieser Abweichung von der erwarteten Signalstärke RL_e bedingt (Gleichung 8).

$$RL = C_{S(RL)} \cdot RL_e \quad (7)$$

$$C_{S(RL)} = C_S \cdot \left(\frac{RL_e}{R_0} \right)^S \quad (8)$$

Die Simulationsrechnung zeigt, daß sich mit zunehmendem C_S (bei $S = 1$) der scheinbare Wert für RL immer weiter verringert. Dieser Effekt ist bei der Auswertung nach Liliom am geringsten und bei der direkten Kalibrierung am stärksten ausgeprägt; die Scatchard Analyse liegt zwischen den beiden Extremen. Die Progression des Sättigungseffektes wird durch den Exponenten S beschrieben (Gleichung 8) oder (bildhafter) durch den Grenzwert C_ε , unterhalb dessen der vorgegebene Fehlerfaktor C_S kleiner wird als ein vorgegebenes ε (Gleichung 8).

$$C_\varepsilon = \frac{RL_e}{L_0} = \left(\frac{\varepsilon}{C_S} \right)^{\frac{1}{S}} \quad (9)$$

Wird nun C_ε über den gesamten möglichen Bereich von 0 bis 1 variiert (bei $C_S = 0,1$), so zeigt sich, daß die ohnehin geringe Verminderung von K_d (maximal 10%) ein Minimum von 0,25 bis 0,4 (je nach Auswertemethode) hat. Dabei fällt auf, daß die direkte Kalibrierung am geringsten und die Auswertung nach Liliom am stärksten von der Variation von C_ε beeinflusst wird. Insgesamt ist jedoch der durch Sättigungseffekte verursachte Fehler bei der Berechnung von K_d gering im Vergleich zu anderen Einflußgrößen.

Als letztes wurde der Einfluß zufälliger Fehler (Rauschen) durch ein Simulationsexperiment ermittelt. Dabei wurde zu jedem einzelnen Datenpunkt ein zu dessen Erwartungswert proportionaler, normalverteilter Zufallswert addiert (Gleichung 10). Selten auftretende Extremwerte wurden bei dieser Simulation durch eine Begrenzung der Zufallswerte $\vartheta(\lambda)$ ausgeschlossen ($0 \leq \vartheta(\lambda) \leq 0,4997$ oder $\lambda(\vartheta) \leq \pi$).

$$RL_d = RL_e \pm \lambda(\vartheta) \cdot C_D \cdot \frac{RL_e}{2} \quad (10)$$

Mit dem Ziel, eine möglichst realistische Auswertung zu simulieren, wurden sieben unabhängig generierte Datensätzen mit allen drei Methoden analysiert und jeweils der maximale und minimale Wert für K_d sowie dessen Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Um eine größere Sicherheit bei dem Vergleich der drei Methoden zu erreichen, wurde dieses "Experiment" insgesamt 12mal durchgeführt. Bei einer statistischen Streuung der "Meßwerte" für RL mit einer Standardabweichung von 10% bezogen auf den Erwartungswert RL_e ($C_D = 0,2$) ergaben sich bei allen drei Methoden systematisch zu hohe Werte für K_d , die im Mittel aller 12 "Experimente" bei der direkten Kalibrierung um 3% (-1% bis +7%), bei der Scatchard Analyse um 5% (-2% bis +12%) und bei der Auswertung nach Liliom um 87% (+53% bis +120%) über dem Erwartungswert lagen. Eine anschließende Variation der Streustärke der Meßwerte ergab, daß bereits eine Streuung der Meßwerte mit einer Standardabweichung von 5% ($C_D = 0,1$) bei der Auswertung nach Liliom eine starke Abweichungen der aus der Mittelung von je 7 Datensätzen errechneten Werte für K_d im Bereich von -5% bis +16% (Standardabweichung) ergab.

Diese erste systematische Analyse des Einflusses verschiedener möglicher Fehlerquellen auf die Ermittlung von Dissoziationskonstante zeigt, daß sowohl systematische Fehler als auch eine statistische Streuung der Meßwerte das Ergebnis nicht unwesentlich verfälschen können. Auffällig war hierbei, daß die drei untersuchten Methoden unterschiedlich sensitiv auf die verschiedenen

simulierten Fehler reagiert haben: So ist zwar die Auswertung nach Liliom robuster bei falschen Leerwertkorrekturen, dafür reagiert sie ausgesprochen sensitiv auf eine statistische Streuung der Meßwerte. Die direkte Kalibrierung zeigt nicht unerhebliche Abweichungen, wenn das Verhältnis R_0 / L_0 zu gering wird; daher sollte auf der Basis von Vorversuchen dieses Verhältnis grundsätzlich auf einen Wert größer 40 eingestellt werden, um den dadurch bedingten Fehler unter die 1%-Grenze zu drücken. Auf der anderen Seite ist diese Methode aufgrund ihrer kinetischen Analyse sehr robust gegenüber einer langsamen Assoziationskinetik und zeigt auch die besten Ergebnisse bei einer statistischen Streuung der Daten.

Da bei allen drei Methoden die statistische Analyse weniger Einzelexperimente eine scheinbar zu hohe Genauigkeit des Ergebnisses suggerierte, sollten auf jeden Fall mehr als 3, besser sogar wie in dieser Simulation 7 unabhängige Einzelmessungen durchgeführt werden. Auch die Leerwertsubtraktion ist bei allen untersuchten Methoden von zentraler Bedeutung: Eine um nur 3% überhöhte Leerwertsubtraktion führt bei der Scatchard-Analyse zu einer Überschätzung von K_d um über 35%, bei der Auswertung nach Liliom von immerhin 13% und bei der direkten Kalibrierung zu einer Unterschätzung von K_d um mehr als 20% (ohne Reduktion der Transferzahl). Bei einer zu geringen Leerwertsubtraktion sind die Fehler zwar etwas kleiner, aber dennoch sollte durch eine mehrfache (mindestens vierfache) Bestimmung des Leerwertes und durch einen geeigneten experimentellen Aufbau dieses Problem möglichst minimiert werden. Bei der direkten Kalibrierung kann zusätzlich erwogen werden, die Anzahl der Transferschritte zu reduzieren, doch würden dadurch wiederum statistische Streuungen stärker ins Gewicht fallen.

Abschließend sei noch angemerkt, daß in Anbetracht der nicht unerheblichen Fehler bei der Bestimmung von K_d der ermittelte Wert im Hinblick auf seine Genauigkeit nicht durch Angabe mehrerer Kommastellen überbewertet, sondern unter Angabe der experimentell ermittelten Fehlergrenzen als negativ dekadischer Logarithmus in Analogie zu der Dissoziationskonstante von Säuren (pK_s) und Basen (pK_b) als " pK_d " angegeben werden sollte.

4. Struktur- und Funktionsanalyse der 7D-Cadherine

4.1 Einleitung, Fragestellung und Diskussion

Spezifische Zell-Zellinteraktionen sind nicht nur essentiell für den statischen Zusammenhalt von Zellen zum Erhalt der Gewebeintegrität im adulten Organismus, sondern auch für dynamische Vorgänge wie bei der Gewebedifferenzierung und der Embryogenese, dem Umbau von Zellverbindungen, der Zellmigration, der Regulation von Zellwachstum und -proliferation und der Apoptose. Cadherine, die im Gegensatz zu anderen Zelladhäsionsmolekülen, wie Integrinen, Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAMs) und Selektinen, überwiegend homotypisch aneinander binden, spielen hierbei eine zentrale Rolle. Sie sind aufgrund ihrer homotypischen Bindungseigenschaft in idealer Weise in der Lage, gleichartige Zellen, die denselben Cadherintyp exprimieren, aneinander zu binden und von anderen Zellen zu segregieren (Takeichi, 1988; Nose et al., 1990).

Entdeckt wurde der erste Vertreter dieser inzwischen aus über hundert Mitgliedern bestehenden Proteinsuperfamilie, das in nahezu allen Epithelien exprimierte E-Cadherin, anfang der 80er Jahre von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander aufgrund seiner unterschiedlichen Funktionen: Zum einen als essentielles Molekül in der frühen Embryonalentwicklung der Maus, dessen Inhibition mit spezifischen Antikörpern die Kompaktierung der Morula verhinderte, und das daher Uvomorulin genannt wurde (Kemler et al., 1977; Peyri ras et al., 1983; Damsky et al., 1983; Imhof et al., 1983; Vestweber & Kemler, 1984; Behrens et al., 1985), und zum anderen als Ca^{2+} -abhängiges Adhäsionsprotein, das aufgrund dieser beiden Eigenschaften als Cadherin, bezeichnet wurde (Takeichi, 1977; Yoshida-Noro et al., 1984). Die cDNA-Klonierung von E-Cadherin (Nagafuchi et al., 1987) und Uomorulin der Maus (Ringwald et al., 1987) sowie L-CAM des Huhns (Gallin et al., 1987) und arc-1 des Hundes (Behrens et al., 1985; 1989) zeigte, daß es sich dabei um identische Proteine bzw. homloge Proteine aus verschiedenen Spezies handelte. In den folgenden Jahren wurden eine Reihe paraloger Proteine entdeckt, die entsprechend ihrer Gewebeverteilung als N-Cadherin (neuronal, Hatta & Takeichi, 1986), P-Cadherin (plazentar, Nose et al., 1987), K-Cadherin (Kidney, Xiang et al., 1994) etc. bezeichnet wurden und heute aufgrund ihrer initialen Beschreibung und ihrer einheitlichen molekularen Struktur aus 5 extrazellulären Homologiedomänen von je etwa 110 Aminosäuren Länge (Cadherin-Repeats), einer einzigen Trans-

membrandomäne und einer etwa 150 Aminosäuren langen, carboxyterminalen cytoplasmatischen Domäne als "klassische Cadherine" bezeichnet werden (Abb. 4.1). Innerhalb der klassischen Cadherine wird oft weiter unterschieden zwischen den oben genannten Typ I-Cadherinen und den sich in ihrer Sequenz leicht unterscheidenden Typ II-Cadherinen, zu denen das VE-, OB- und MN-Cadherin gezählt werden (Patel et al., 2003).

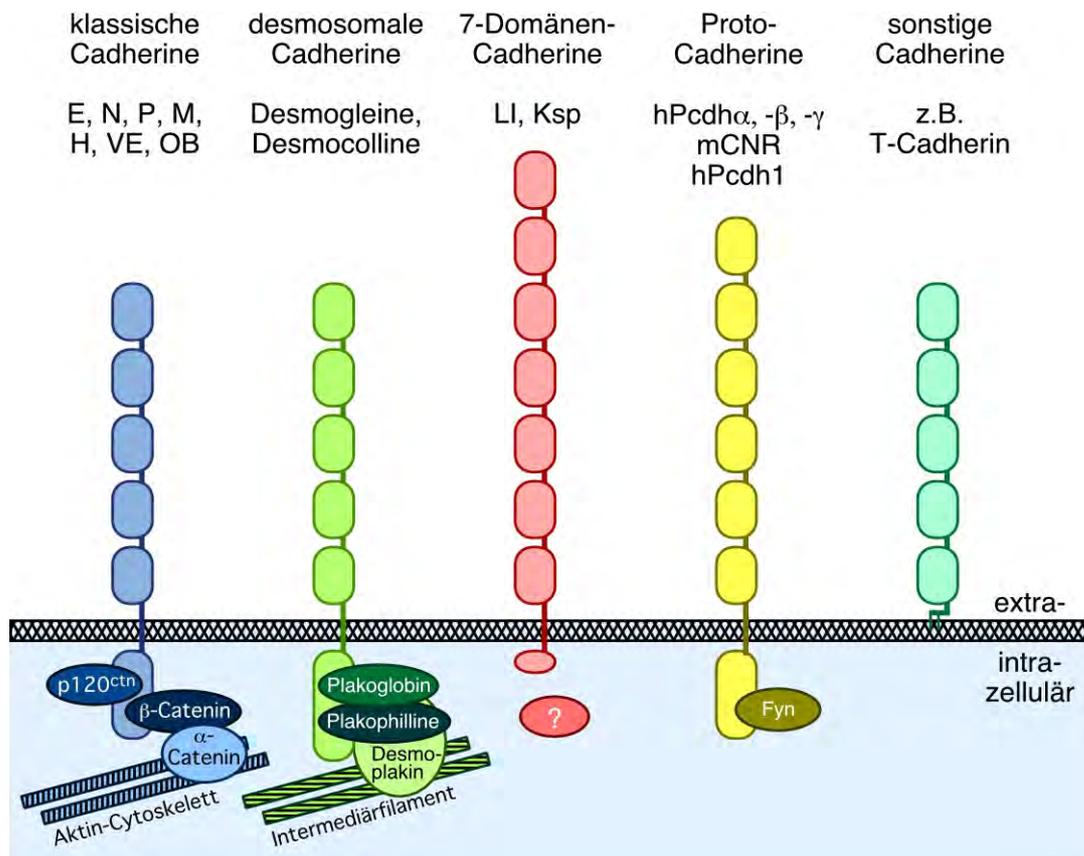


Abb. 4.1: Unterschiedliche Cadherin-Familien sind durch die Anzahl ihrer strukturell definierten, aminoterminalen, extracellulären Cadherin-Repeats sowie die Größe und molekularen Interaktionen ihrer cytoplasmatischen Domänen charakterisiert. Unter den jeweiligen Familien sind jeweils einige typische Vertreter, ggf. mit ihren Kurzbezeichnungen aufgeführt.

Die cytoplasmatische Domäne der klassischen Cadherine bindet über einen konservierten Sequenzbereich an β -Catenin, ein Mitglied der Armadillo-Proteinfamilie, und sekundär über α -Catenin, ein mit Vinculin verwandtes Protein, an das Aktin-Cytoskelett (Ozawa et al., 1989; 1990a; Huber & Weis, 2001). Auf diese Weise werden die Kräfte, die durch die homotypische Bindung der extrazellulären Domäne an gleichartige Moleküle auf benachbarten Zellen entstehen, im Zellinneren verteilt. Gleichzeitig kann sich das Aktin-Cytoskelett entsprechend den extrazellulären Interaktionen ausrichten und so die räumliche Integration der Zelle in den Gewebeverband erleichtern.

Die desmosomalen Cadherine, Desmoglein und Desmocollin, besitzen eine zu den klassischen Cadherinen homologe extrazelluläre, aber eine sehr unterschiedliche cytoplasmatische Domäne, die nicht an β -Catenin, sondern ausschließlich an Plakoglobin bindet, welches über Desmoplakin eine Verbindung zum Intermediärfilament herstellt. In dem cytoplasmatischen Komplex finden sich zudem Plakophiline, die ebenso wie β -Catenin, p120^{ctn} und Plakoglobin, zu den Armadilloproteinen gehören. Von Desmoglein und Desmocollin existieren jeweils drei Paraloge, deren relativer Anteil spezifisch für unterschiedliche Gewebearten ist. Die mechanische Verbindung zwischen Herzmuskelzellen wird in den interkalierenden Scheiben ebenfalls von desmosomalen Cadherinen vermittelt, wobei hier jedoch nur Desmoglein 2 und Desmocollin 2 vorkommen (Wheelock & Johnson, 2003).

Unter dem Begriff "Protocadherine" wurden initial verschiedene, vergleichsweise wenig charakterisierte Cadherine mit 6 oder 7 extrazellulären Cadherin-Repeats zusammengefaßt, die nur im Zentralnervensystem exprimiert werden. Durch die Entdeckung von drei großen Protocadherin-Genclustern zunächst im humanen (Wu & Maniatis, 1999) und anschließend auch im murinen Genom (Wu et al., 2001) rückten die Protocadherine in das Zentrum der Cadherinforschung. Im Gegensatz zu allen anderen Cadherinen enthalten die drei Cluster der α -, β - und γ -Protocadherine – ähnlich wie die Immunglobulin-Gencluster – jeweils eine Anzahl variabler Abschnitte, die keine Introns besitzen und für den gesamten extrazellulären Teil sowie die Transmembranregion und den ersten Teil der cytoplasmatischen Domäne kodieren, und einen konstanten, intronhaltigen Abschnitt, der den kodierenden Bereich für den verbleibenden cytoplasmatischen Anteil enthält. Wie die Prozessierung der genetischen Information im einzelnen erfolgt, ist noch ungeklärt; es gilt jedoch als sicher, daß es keine genomische Reorganisation wie im Bereich der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Gencluster gibt (Tasic et al., 2002; Wang et al., 2002).

E-Cadherin ist nicht nur von zentraler Funktion für die frühe embryonale Differenzierung sondern auch für die physiologische Ausbildung nahezu aller Epithelien. Je zwei Moleküle bilden ein laterales Homodimer (cis-Dimer), welches in einer reißverschlußähnlichen Weise mit gleichen Molekülen auf einer Nachbarzelle eine trans-Interaktion eingeht. Der durch cis- und trans-Interaktionen gebildete Cluster aus vielen Einzelmolekülen wird cytoplasmatisch durch die sequentielle Bindung von β -Catenin, α -Catenin und Aktin weiter stabilisiert und bildet eine Adherens Junction (AJ, Zonula adherens), welche in Kombination mit der induzierten cytoplasmatischen Reorganisation des Aktincytoskeletts die Zellen im Epithelverband ringförmig stabilisiert (Fukata & Kaibuchi, 2001; Conacci-Sorrell

et al., 2002). Da andere Membranproteine die so gebildete Barriere kaum überwinden können, wird der apikale vom basolateralen Membranbereich getrennt und eine Polarisierung der Zellen induziert (mesenchymal-epitheliale Transition). Trotz der cytoplasmatischen Stabilisierung wird jedoch nur etwa die Hälfte der E-Cadherin-Moleküle in die AJ eingebunden – der Rest verteilt sich über die verbleibende basolaterale Membranfläche (Fukata & Kaibuchi, 2001).

Bei invasiv wachsenden und metastasierenden malignen Tumoren wird häufig eine Störung der AJ beobachtet, sei es durch Punktmutationen oder Deletionen im E-Cadherin- oder α -Catenin-Gen, oft in Kombination mit Verlust der lokalen chromosomalen Heterozygotie (LOH), oder durch Hypermethylierung des E-Cadherin-Promoters (Conacci-Sorrell et al., 2002). β -Catenin ist nur im Komplex mit E-Cadherin stabil – freies cytosolisches β -Catenin wird aufgrund seiner raschen Serin-Phosphorylierung durch Glycogensynthase-Kinase-(GSK)-3 β (im Komplex mit APC und Axin) und die dadurch induzierte Ubiquitinylierung schnell proteasomal abgebaut und liegt daher nur in sehr geringer Menge vor. Erst die während der Embryonalentwicklung genau geregelte Aktivierung heptahelikaler Rezeptoren der Frizzled (Frz)-Familie durch die löslichen Wnt-Faktoren führt über eine durch Dishevelled (Dsh) vermittelte Blockade von GSK-3 β zu einem Anstieg der Menge an freiem β -Catenin, welches im Komplex mit Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie in den Zellkern wandert und dort proliferationsinduzierende Gene wie Cyclin D1 und c-Myc aktivieren kann (Behrens et al., 1996; Conacci-Sorrell et al., 2002). Wird in Tumorzellen der Abbau von β -Catenin durch inaktivierende Mutationen von APC oder Axin oder durch Punktmutationen von β -Catenin, welche seine Phosphorylierung verhindern, gestört, so resultiert dadurch eine konstitutive Proliferationsaktivierung (Conacci-Sorrell et al., 2002). Dies ist bei einem der häufigsten malignen Tumore des Menschen, dem Colocarcinom, oft der Fall. Da inaktivierende Mutationen des E-Cadherins und des APC bei vielen malignen Tumoren gefunden wurden, werden beide Proteine als typische Tumorsuppressorgene bezeichnet.

Durch zahlreiche weitere, in den letzten Jahren beschriebene molekulare Interaktionen wird die Verzahnung der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion mit Signaltransduktionswegen noch komplexer: So findet sich APC nicht nur im Komplex mit Axin und GSK3 β , sondern auch an der Spitze von Mikrotubuli, und Axin bindet auch Komponenten des c-Jun-Kinase-(Jnk)-Signalwegs (Juliano, 2002). Das Signalübertragungsmolekül Dsh wiederum assoziiert mit Aktin-Filamenten und möglicherweise im Bereich fokaler Adhäsionen mit Paxillin und Integrin-linked Kinase (ILK). Auch direkte Interaktionen der cytoplasmatischen Domäne

von E-Cadherin mit der α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine der G12-Familie sind beschrieben worden (Juliano, 2002). Sowohl über ILK, welches GSK3 β phosphorylieren und damit den Wnt-Signalweg aktivieren kann, als auch über verschiedene andere molekulare Interaktionen können sich Cadherin-, Integrin- und Ig-CAM-vermittelte Zelladhäsionen wechselseitig beeinflussen (Juliano, 2002).

Schließlich kann die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion direkt über eine verstärkte Endocytose und eine proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne negativ beeinflusst werden. Ersteres kann durch HGF/SF und Hakai, eine Ubiquitin-Ligase, induziert und letzteres durch membranassoziierte Metalloproteinasen bewirkt werden (Fukata & Kaibuchi, 2001).

Im Gegensatz zu E-Cadherin ist über die Regulation der durch andere Cadherine vermittelten Zell-Zelladhäsion und deren Beteiligung an der Entwicklung und Ausbreitung maligner Tumore nur wenig bekannt. Überraschend ist allerdings, daß N-Cadherin, welches eine knapp 80%ige Sequenzidentität zu E-Cadherin auf Proteinebene aufweist, die Aktivität von Tyrosinkinasen verstärkt und so die Zellmotilität, das invasive Wachstum von Tumoren und deren Metastasierungspotential erhöht (Conacci-Sorrell et al., 2002). Von dem spezifisch im Gefäßendothel exprimierten VE-Cadherin, das ebenso wie E-Cadherin und N-Cadherin cytoplasmatisch β -Catenin, Plakoglobin und p120^{ctn} bindet, wurde nachgewiesen, daß es essentiell für das VEGF-A-vermittelte Überleben der Endothelzellen während der Embryonalentwicklung ist und daß daran die CP-Domäne des VE-Cadherins, β -Catenin, PI3K und der vaskulär-endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (VEGFR-2) beteiligt sind (Juliano, 2002).

Der Mechanismus der durch klassische Cadherine vermittelten Zell-Zelladhäsion wurde bereits in den 80er Jahren mit Zelladhäsions- und Zellsegregationsexperimenten analysiert. Aus der Beobachtung, daß Zellen, die unterschiedliche klassische Cadherine exprimierten, separate Cluster bildeten, wurde geschlossen, daß Cadherine nur streng homotypisch an identische Moleküle auf den Nachbarzellen binden ("Trans-Interaktion"). Aus dem Adhäsionsverhalten, das chimäre Proteine, welche unterschiedliche große homologe Bereiche der extrazellulären Domäne von murinem E- und P-Cadherin enthielten, nach Transfektion in L-Zellen induzierten, wurde außerdem geschlossen, daß die Spezifität der Adhäsion alleine durch den ersten, N-terminalen Cadherin-Repeat (EC1) vermittelt wird. Da Peptide, welche ein in der EC1 der klassischen Cadherine konserviertes Sequenzmotif, HAV, enthielten, typische Cadherin-vermittelter zellulärer Phänomene (Kompaktierung von Mausembryonen im 8-Zellstadium

und Neuritenwachstum auf Astrocyten) inhibieren konnten, wurde weiterhin gefolgert, daß dieses Sequenzmotiv direkt an der homotypischen Trans-Interaktion beteiligt ist. Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre an Zellen, die unterschiedliche klassische Cadherine exprimierten, haben jedoch gezeigt, daß in einem gewissen Umfang auch heterotypische Interaktionen möglich sind, und haben damit die initialen Annahmen relativiert (Niessen & Gumbiner, 2002).

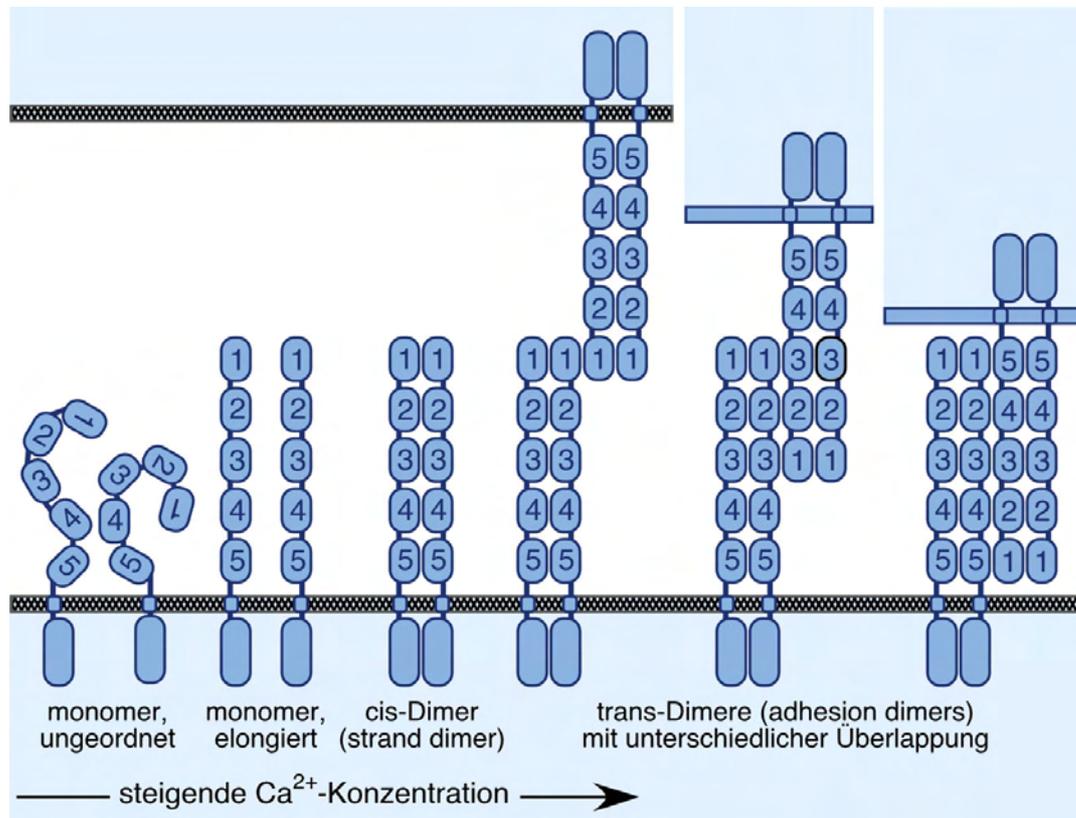


Abb. 4.2: Modelle der Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion. Die einzelnen Subdomänen der Cadherine sind in diesem Schema als miteinander verbundene Ovale dargestellt: Extrazelluläre (ec) Cadherin-Repeats 1 bis 5, die Transmembrandomänen und die cytoplasmatischen (cp) Domänen. Verdeutlicht wird, von links nach rechts, der Einfluß Ca^{2+} -Konzentration auf die Konformation der Ectodomänen, die cis-Interaktion von zwei Cadherinen auf einer Zelle und die trans-Interaktion mit gleichen Cadherinen auf einer zweiten, in diesem Schema von oben kommenden, Zelle (Pertz et al., 1999; Troyanovsky et al., 2003). Im rechten Teil der Abbildung wird die Möglichkeit einer unterschiedlich starken Überlappung der Ectodomänen in trans (Sivasankar et al., 2001; Chappuis-Flament et al., 2001; Leckband, Structure, 2002) verdeutlicht.

Detaillierte Modelle der Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion wurden jedoch erst aufgestellt, als die molekulare Struktur einzelner Cadherin-Repeats durch Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt worden war. Aus den in den Kristallstrukturen beobachteten molekularen Interaktionen wurde geschlossen, daß die N-terminalen Cadherin-Repeats sowohl zu einer "Cis-Interaktion" mit benachbarten, paral-

lenen Molekülen auf der gleichen Zelle ("Strand Dimer") als auch zu einer "Trans-Interaktion" mit gleichen Molekülen auf der Nachbarzelle ("Adhesive Dimer") befähigt sind (Abb. 4.2). Die Cis-Interaktion wurde in der Röntgenstruktur durch die Insertion einer Tryptophan-Seitengruppe in eine hydrophobe Tasche des Nachbarmoleküls stabilisiert (Boggon et al., 2002; Chappuis-Flament et al., 2001), während die Interaktionsfläche der Trans-Bindung das zuvor funktionell identifizierte HAV-Motif enthielt (Leckband & Sivasankar, Curr Opin Cell Biol 12, 587-592, 2000). Aus dieser Überlegung wurde wiederum das zu Anfang erwähnte Modell einer Reißverschlußartigen Interaktion von dimeren Cadherinen auf der Oberfläche benachbarter Zellen abgeleitet (Leckband & Sivasankar, 2000). Allerdings paßten nicht alle strukturellen Daten, die in der Folge durch Röntgenstrukturanalysen von Repeat-Dimeren und die elektronenmikroskopische Darstellung von pentameren Fusionsproteinen aus EC1-5 des murinen E-Cadherins und dem "Cartilage Oligomeric Matrix Protein" (COMP) der Ratte gewonnen werden konnten, zu diesem Modell (Leckband & Sivasankar, 2000).

Im Surface-Force-Apparatus (SFA) können zwischen zwei Lipid-Bilayern adhäsive und repulsive Oberflächen-Kräfte sehr genau als Funktion des Abstands gemessen werden. An kompletten Ektodomänen von C-Cadherin, die über Linkermoleküle gerichtet an zwei gegenüberliegenden Lipid-Bilayer gebunden waren, konnten mit diesem Gerät insgesamt 3 Energieminima in Abhängigkeit des ebenfalls gemessenen Abstandes ermittelt werden. Der kürzeste Abstand und die dabei gemessene stärkste Bindung wurde dabei so interpretiert, daß die Ektodomänen dabei über ihre volle Länge und nicht nur über ihren terminalen Cadherin-Repeat verzahnt sind (Abb. 4.2, Leckband & Sivasankar, 2000). Die durch diese Experimente geäußerten Zweifel an der Relevanz des bisherigen Modells wurde durch die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur der gesamten C-Cadherin-Ektodomäne weiter verstärkt (Boggon et al., 2002). Überraschenderweise fand sich in dieser Kristallstruktur eine kontinuierliche Krümmung der Ektodomäne um etwa 90°. Zwar bildeten in dieser Struktur die EC1-Repeats in analoger Weise zu den früheren Strukturanalysen einen "Strand Dimer" aus, doch entsprach diese Interaktion aufgrund der Krümmung des Moleküls nicht wie zuvor angenommen einer Cis- sondern einer Trans-Bindung. Die initial beschriebenen "Adhesive Dimer" Bindung, an der auch das HAV-Motif beteiligt war, konnte dagegen nicht wiedergefunden werden. Dafür wurde eine neue Cis-Interaktion beobachtet, die sich zwischen der EC1 und EC2 zweier "paralleler" Moleküle ausgebildet hatte. Die Beteiligung der Linkerregion zwischen EC2 und EC3 an dieser Interaktion wurde dabei als Grund dafür vorgeschlagen, daß diese Interaktion nicht in den beiden publizierten Kristallstrukturen der EC1-2

Repeatdimere gefunden wurde. Gestützt wird diese Interpretation der Strukturdaten auch durch Funktionsuntersuchungen von C-Cadherin-Deletionsmutanten, die ergeben hatten, daß die drei N-terminalen Repeats EC1-3 essentiell für deren adhäsive Funktion ist (Chappuis-Flament et al., 2001).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte Entdeckung und molekulare Charakterisierung des LI-Cadherins hat das Forschungsgebiet nicht nur um ein weiteres Cadherinmolekül, sondern um eine neue Cadherinfamilie bereichert, wie in den folgenden Abschnitten gezeigt wird. Zunächst werden in dem Abschnitt 4.2 einige wesentliche, unpublizierte Vorarbeiten zusammengefaßt, welche die Grundlage für die folgenden Untersuchungen bilden. Hierzu gehört vor allem die initiale Isolierung und Charakterisierung des zunächst nur durch einen monoklonalen Antikörper identifizierbaren Proteins und die anschließende Induktion hochaffiner polyklonaler Antikörper.

Obwohl bereits Partialsequenzen des Proteins durch den Edman-Abbau von CNBr-Fragmenten erhalten werden konnten, gelang es erst durch die in Abschnitt 4.3 (Publikation Nr. 13) beschriebene Expressionsklonierung der korrespondierenden cDNA der Ratte und die anschließende Sequenzanalyse, das unbekannte Protein eindeutig der Cadherinsuperfamilie zuzuordnen. Allerdings entsprach seine molekulare Struktur weder der der klassischen Cadherine, noch der irgendeiner anderen bekannten Cadherin-Familie. Auffällig war im Vergleich zu den klassischen und desmosomalen Cadherinen vor allem die Präsenz von zwei zusätzlichen extrazellulären Homologiedomänen und die nur 20 Aminosäuren umfassende cytoplasmatische Domäne. Aufgrund seiner eindeutigen Expression in Leber und Darm der Ratte wurde das neue Protein von uns als Liver-Intestine- oder kurz: LI-Cadherin bezeichnet. Durch seine Expression in *Drosophila* S2-Zellen konnte gezeigt werden, daß LI-Cadherin eine Ca^{2+} -abhängige, homotypische und durch spezifische Antikörper blockierbare Zelladhäsion vermittelt.

Im nächsten Schritt, der im Abschnitt 4.4 vorgestellten Publikation Nr. 14, wurde die zelladhäsive Funktion des LI-Cadherins weiter charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß LI-Cadherin im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen weder mit Cateninen interagiert noch eine Reorganisation des Aktincytoskeletts bewirkt. Da LI-Cadherin trotzdem auch in Säugerzellen eine eindeutige, Ca^{2+} -abhängige, homotypische Zelladhäsion vermittelt und zudem eine Änderung des zellulären Phänotyps induziert, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob LI-Cadherin im Gegensatz zu klassischen Cadherinen in der Lage ist, dies auch ohne die Bindung an cytoplasmatische Komponenten zu bewerkstelligen. Eine

zu diesem Zweck konstruierte GPI-verankerte Mutante, die lediglich über ihren Lipidanker von außen mit der Plasmamembran verbunden war, vermittelte erstaunlicherweise eine dem Wildtyp-Protein hinsichtlich der Aggregationsfähigkeit und der Bindungsspezifität vergleichbare Zell-Zelladhäsion. Hieraus kann geschlossen werden, daß dem LI-Cadherin eine gegenüber dem im Darmepithel co-exprimierten E-Cadherin komplementäre Funktion zukommt, die sich auch in seiner Verteilung außerhalb der spezifischen Zellverbindungen, wie Adherens Junctions und Desmosomen, widerspiegelt.

Nachdem auch die cDNA des humanen LI-Cadherin kloniert und Antikörper gegen überexprimierte Partialstrukturen generiert worden waren (Zitt, 1997), wurde zunächst die Expression des Proteins im menschlichen Organismus untersucht. Hierbei stellte sich erstaunlicherweise heraus, daß LI-Cadherin beim Menschen im Gegensatz zur Ratte nur im Darm, nicht aber in der Leber exprimiert wird (Zitt, 1997). Eine identische Gewebeverteilung wurde später auch für die Maus nachgewiesen (Angres et al., 2001). Bei der immunhistochemischen Analyse gastrointestinaler Tumore wurde überraschendweise eine starke Expression von LI-Cadherin bei Adenocarcinomen des Magens entdeckt, obwohl LI-Cadherin im gesunden Magenepithel nicht nachgewiesen werden kann. Im weiteren Verlauf dieser im Abschnitt 4.5 vorgestellten Arbeit (Publikation Nr. 15) wurde herausgefunden, daß LI-Cadherin nicht nur in tubulären und mucinösen Adenocarcinomen eine starke, typisch membranständige, bezüglich des Magens ektopische Expression aufweist, sondern bereits in den als frühe Vorstufe des Adenocarcinoms angesehenen intestinalen Metaplasie des Magenepithels eine ähnliche Expression aufweist. Für diese, prinzipiell noch reversible morphologische Veränderung erwies sich LI-Cadherin als empfindlicherer und spezifischerer histologischer Marker als bisherige Markerproteine wie Villin und Sucrose-Isomaltase. Auf der anderen Seite ließen sich undifferenzierte Magencarcinome nur sehr schwach oder gar nicht mit LI-Cadherin-spezifischen Antikörpern anfärben – insofern kann LI-Cadherin als Differenzierungsmarker für Adenocarcinome des Magens angesehen werden.

In den folgenden Jahren wurde der Nutzen von LI-Cadherin als Marker für gastrointestinale Tumore von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Ein Jahr nach Erscheinen der Publikation Nr. 15 wurde bei einer globalen Untersuchung von Veränderungen der Genexpression bei Magencarcinomen mittels Oligonukleotid-Microarrays unter 6800 Genen LI-Cadherin als in seiner Transkription bei Adenocarcinomen vom intestinalen Typ stark hochreguliertes Protein entdeckt, dem die Autoren aufgrund seiner physiologischen Expression im Darm eine Rolle als intestinaler Differenzierungsmarker zusprachen (Hippo et al., 2002). In

2003 wurde analog zu den eigenen Ergebnissen eine ektope Expression von LI-Cadherin in ductalen Adenocarcinomen des Pancreas entdeckt (Takamura et al., 2003). Im laufenden Jahr erschien schließlich eine Publikation, in der eine verringerte Expression von LI-Cadherin mit einer signifikant höheren Invasivität von colorectalen Carcinomen und signifikant häufigeren Lymphknotenmetastasen assoziiert wurde (Takamura et al., 2004), und eine zweite, in der in umgekehrter Weise eine Überexpression von LI-Cadherin mit einer vermehrten Lymphknotenmetastasen vergesellschaftet war (Ko et al., 2004). Schließlich wurde kürzlich auch eine induzierte Expression von LI-Cadherin in primären Leberzellcarcinomen beschrieben (Wong et al., 2003).

Da nicht nur beim LI-Cadherin der Ratte, sondern auch beim homologen Protein des Menschen mehrere für die Ca^{2+} -Bindung verantwortliche saure Aminosäuren im Übergangsbereich zwischen dem 2. und 3. Cadherinrepeat (EC2 und EC3) fehlten, stellte sich die Frage, ob in diesem Bereich des Moleküls die für die elongierte Struktur der Cadherine (Pokutta et al., 1994) und für ihre adhäsive Funktion (Ozawa et al., 1990b) essentielle Bindung von Ca^{2+} -Ionen überhaupt noch stattfinden kann. Um diese Frage experimentell zu klären, wurden, wie in Abschnitt 4.6 beschrieben (Manuskript 16), die Repeat-Dimere EC1-2 und EC2-3 des humanen LI-Cadherins in *E. coli* überexprimiert, gereinigt und mittels Gleichgewichtsdialyse im Hinblick auf ihre Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit und mittels CD-Spektroskopie auf die Abhängigkeit ihrer Konformation von der Ca^{2+} -Konzentration untersucht. Da nur das Repeatdimer EC1-2, das eine vollständige Ca^{2+} -Bindungstasche enthält, unter physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen 2-3 Calciumionen band und dabei das CD-Spektrum wesentlich änderte, während sich das Repeatdimer EC2-3 sowohl bezüglich der Bindung von Calciumionen als seiner Konformation völlig inert verhielt, darf geschlossen werden, daß auch im intakten LI-Cadherin im Übergangsbereich zwischen dem 2. und 3. Cadherinrepeat keine Ca^{2+} -Bindung erfolgt. Dies könnte zum einen bedeuten, daß dort die elongierte Konformation des Moleküls durch Ca^{2+} -unabhängige Protein-Protein-Interaktionen erfolgt oder sich dort analog zu den Antikörpern eine konformationsvariable Hinge-Region befindet. Eine derartige Eigenschaft des LI-Cadherins wäre geeignet, die simultane Bindung über LI- und E-Cadherin in den lateralen Membranbereichen der Enterocyten zu erklären, in denen beide Proteine co-exprimiert werden (Abb. 4.3). Zudem würde eine Hingeregion in begrenztem Umfang eine variable Öffnung des Interzellularspaltes in den Bereichen ermöglichen, in denen LI-Cadherin dominiert.

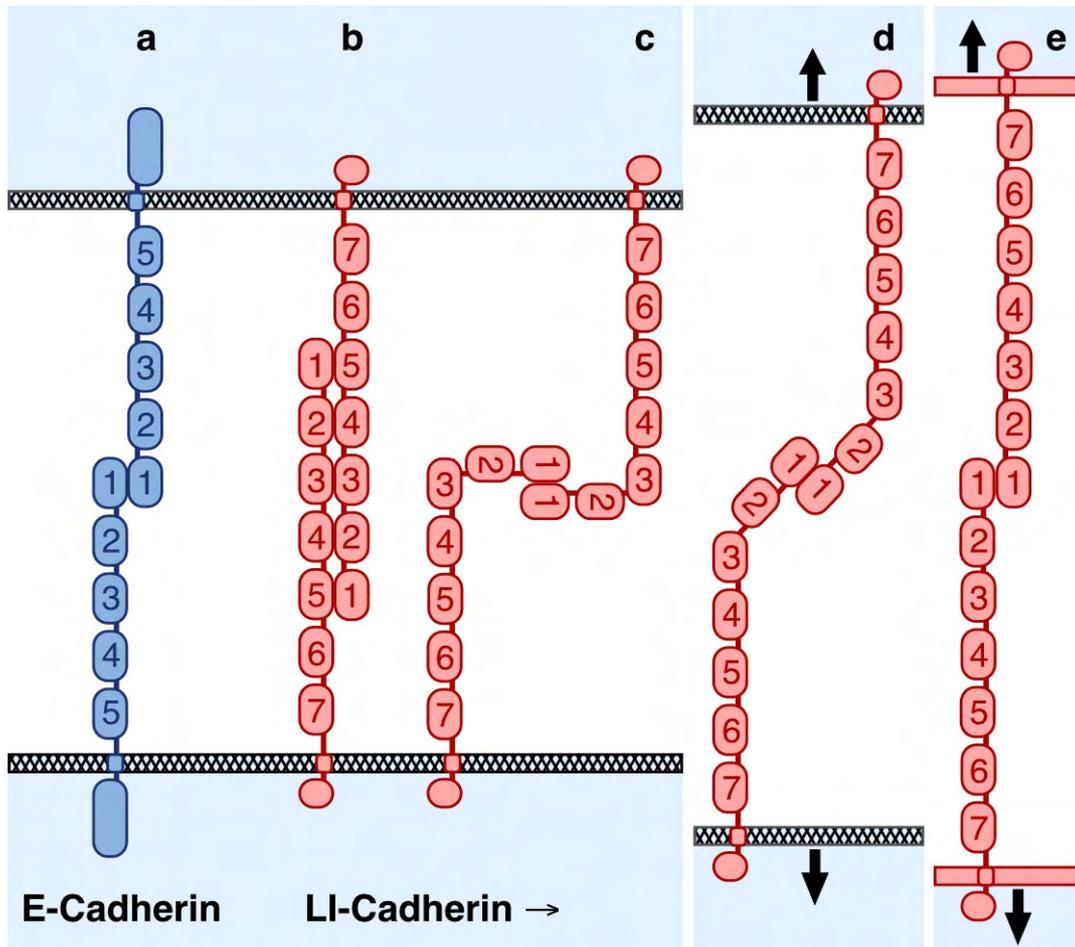


Abb. 4.3: Modell der homotypischen LI-Cadherin-Bindung unter Einbeziehung einer Hinge-Region. Zur Vereinfachung wurde in dieser schematischen Darstellung die Cadherine nicht als laterale Homodimere (s. Abb. 4.2), sondern als Monomere dargestellt. Für E-Cadherin wurde eine Bindung über seine N-terminalen EC1-Repeats beschrieben (a, Nose et al., 1990; Shapiro et al., 1995). Da LI-Cadherin in Enterocyten mit E-Cadherin in den gleichen lateralen Membranbereichen co-exprimiert wird, müßten sich die Repeats entweder weiter überlappen (b) oder in einer Hinge-Region abknicken (c), die im Übergang zwischen EC2 und EC3 aufgrund des Fehlens einer funktionellen Ca^{2+} -Bindungsstelle existieren könnte. Letzteres Modell würde auch eine dynamische Adaption des Interzellularspaltes in solchen Regionen ermöglichen, in denen LI-Cadherin dominiert (d, e).

Weil sich mit den in Publikation 16 zusammengefaßten Methoden die adhäsive Funktion des LI-Cadherins nicht untersuchen läßt und die in den Publikationen 14 und 19 beschriebenen Zelladhäsionsassays weder geeignet sind, sehr kleine Unterschiede in der Bindungsstärke zu messen, noch die Berechnung der Bindungsdaten von Einzelmolekülen erlauben und auf einen unphysiologischen Entzug von Calciumionen nicht nur mit einer Veränderung der Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion reagieren, wurde als geeignete Methode zur molekularen Charakterisierung der homotypischen Bindungseigenschaften von LI-Cad-

herin die Analyse von Einzelmolekülen mittels Atomic Force Microscopy (AFM) gewählt. Ein erstes aus den bereits teilweise abgeschlossenen Untersuchungen entstandenes Manuskript wird unter 4.7 beschrieben (Publikation 17).

Trotz des Fehlens einer funktionellen Ca^{2+} -Bindungsstelle zwischen den Cadherinrepeats EC2 und EC3 ist LI-Cadherin in der Lage, eine etwa gleich starke Bindung wie VE- und N-Cadherin zu vermitteln, die auf Einzelmolekülebene durch ein $t_{1/2} = 1,4$ s gekennzeichnet ist. Mittels einer homotypischen, analytischen Affinitätschromatographie (LI-Cadherin als immobilisierte und lösliche Komponente) konnte eine Gleichgewichtskonstante von etwa $K_d = 27$ mM ermittelt werden. Im Gegensatz zu dem klassischen N-Cadherin zeigte LI-Cadherin jedoch bezüglich der Variation der Ca^{2+} -Konzentration eine wesentlich höhere Kooperativität ($n_H = 12$ vs. $n_H = 2$). Dieses Ergebnis gibt Anlaß zu der Vermutung, daß die LI-Cadherin-vermittelte Zell-Zelladhäsion wesentlich sensibler auf kleine Änderungen der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reagiert als das in Enterocyten coexprimierte E-Cadherin und im Prinzip einem Ca^{2+} -abhängigen Schalter gleicht, der bei Absinken der Ca^{2+} -Konzentration unter etwa 0,7 mM mit einem kompletten Verlust der LI-Cadherin-vermittelte Zell-Zelladhäsion reagiert. Eine derartige Steuerung der lateralen Zell-Zelladhäsion der Enterocyten könnte das bei starker Flüssigkeitsresorption beobachtete Auseinanderweichen der Membranbereiche benachbarter Enterocyten (laterale Spaltbildung, Naftalin & Tripathi, 1986) erklären, weil dabei auch die Ca^{2+} -Konzentration im Interzellulärspalt absinkt.

Eine Frage, die sich schon kurz nach der Entdeckung des LI-Cadherins gestellt hatte, ist der Ursprung der zwei zusätzlichen Cadherin Repeats im Vergleich zu den klassischen Cadherinen. Wie in Abschnitt 4.8 gezeigt wird (Publikation 18), liefert bereits ein Vergleich der Proteinsequenz des LI-Cadherins mit dem klassischen Cadherine einen ersten Hinweis: Die ersten beiden Cadherin-Repeats (EC1-2) des LI-Cadherins und die nächsten beiden Repeats (EC3-4) sind den ersten beiden Repeats des klassischen E-Cadherin gleich ähnlich, während die folgenden drei LI-Cadherin Repeats (EC5-7) den folgenden drei des E-Cadherins (EC3-5) gleichen. Eine eindeutige Antwort lieferte schließlich die Klonierung und Analyse des LI-Cadherin-Gens: Die während der Evolution generell sehr gut konservierte Exon-Intron-Struktur einschließlich des Intron-Phasings war im Bereich der Repeats EC3-7 des LI-Cadherins bis auf ein zusätzliches Intron in der Prämembrandomäne und eine Phasenänderung in der EC4 absolut gleich zu der Genstruktur von E-, P- und N-Cadherin. Der die Repeats EC1-2 des LI-Cadherins kodierende Genbereich war völlig homolog zu dem der Repeats 3-4. Damit wurde es offensichtlich, daß LI-Cadherin durch

ein Vorläufermolekül mit 5 Cadherindomänen durch eine partielle Genduplikation entstanden sein muß. Dies erklärt auch den im Abschnitt 4.6 beschriebenen Verlust der Ca^{2+} -Bindungsstelle im Fusionsbereich zwischen den Repeats 2 und 3.

Ein Jahr nach unserer Veröffentlichung des LI-Cadherins wurde ein paraloges Protein in der Kaninchenniere auf der Suche nach einem $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter entdeckt (Thomson et al., 1995). Da dieses Protein selektiv in den Nierentubulus-Epithelien exprimiert wird, wurde es von den Autoren als Ksp-Cadherin bezeichnet. Obwohl die Wissenschaftler um Aronson und Igarashi Verteilung des Ksp-Cadherins in der sich entwickelnden Kaninchenniere untersucht haben (Thomson & Aronson, 1999), den Promoter dieses Proteins in der Maus eingehend charakterisiert haben (Thomson et al., 1998; Whyte et al., 1999; Igarashi et al., 1999; Bai et al., 2002), sind sie nie auf die Funktion des Ksp-Cadherins als Zell-Zelladhäsionsprotein eingegangen, sondern haben sogar spekuliert, daß dies nicht seine primäre Funktion sein kann (Thomson & Aronson, 1999). Vor diesem Hintergrund und der offensichtlichen strukturellen Ähnlichkeit der beiden Proteine, wurde, wie in Abschnitt 4.9 (Publikation 19) beschrieben, die zelladhäsive Funktion von Ksp-Cadherin mit der des LI- und E-Cadherins in transfizierten CHO-Zellen untersucht. Es stellte sich heraus, daß Ksp- ebenso wie LI-Cadherin eine spezifische, homotypische Zell-Zelladhäsion von vergleichbarer Stärke vermittelt und dabei nicht direkt mit β -Catenin interagiert. Beide 7D-Cadherine induzieren zudem in CHO-Zellen einen ähnlichen zellulären Phänotyp, der sich von dem durch E-Cadherin induzierten eindeutig unterscheidet.

Um die aufgrund der oben beschriebenen strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit von LI- und Ksp-Cadherin offensichtliche Abstammung von einem gemeinsamen Vorläufermodell phylogenetisch herleiten zu können, wurde, wie in Abschnitt 4.10 (Manuskript 20) erläutert, auch das Ksp-Cadherin der Maus kloniert und seine Genstruktur mit der des LI-Cadherins verglichen. Trotz der geringen Identität der Proteinsequenzen beider 7D-Cadherine im Bereich von 30% ist die Intron-Exon-Struktur sowie auch das Intron-Phasing vollständig konserviert. Während jedoch die meisten klassischen Cadherine sich in einem Gencluster mit E-Cadherin und Ksp-Cadherin auf dem Maus-Chromosom 8 befinden, liegt LI-Cadherin isoliert auf Chromosom 4. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß – abgesehen von den klassischen Cadherinen – beide chromosomale Regionen paralog sind und dies nicht nur für die Maus, sondern auch für die Ratte und den Menschen gilt. Da es im Zebrafisch (*Danio rerio*) und in den beiden Pufferfisch-Spezies *Takifugu rubripes* und *Tetraodon fluviatilis* orthologe Gene sowohl zu

Ksp- und LI-Cadherin als auch zu mehreren weiteren im paralogen Bereich befindliche Genpaare gibt, liegt es nahe zu schließen, daß LI- und Ksp-Cadherin aus einem gemeinsamen 7-Domänen-Vorläufermolekül durch die Duplikation eines großen Chromosomenabschnitts, eines ganzen Chromosoms oder sogar des gesamten Genoms entstanden sind und sich in der Folge unabhängig voneinander weiterentwickelt haben.

Ausgehend von dem LI-Cadherin der Ratte konnte in den hier beschriebenen Arbeiten die Struktur und die zelladhäsive Funktion des LI-Cadherins im Detail aufgeklärt werden und erste Hinweise auf Funktion spezifischer Strukturelemente, wie der fehlenden Ca^{2+} -Bindungsstelle zwischen EC2 und EC3 gewonnen werden. Durch die Einbeziehung des strukturell verwandten Ksp-Cadherins in die Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß beide Proteine einer gemeinsamen Cadherinfamilie, den 7D-Cadherinen, zuzuordnen sind und sich auch in ihrer Funktion bezüglich der Zell-Zelladhäsion und der Induktion eines spezifischen zellulären Phänotyps ähneln. Schließlich wurde durch die Aufklärung und vergleichende Analyse der Genstrukturen beider Proteine nachgewiesen, daß LI- und Ksp-Cadherin phylogenetisch durch eine mindestens regionale Genomduplikation vor über 120 Millionen Jahren aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül mit 7 Cadherin-Repeats entstanden sein müssen, welches wiederum mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Duplikation der ersten beiden Cadherin-Repeats eines noch älteren 5-Domänen Cadherins gebildet wurde. Die hierzu benutzten Verfahren sollten es in analoger Weise auch ermöglichen, die Phylogenie der gesamten Cadherin-Superfamilie aufzuklären.

Die bisherigen Arbeiten bilden die Grundlage zur weitergehenden Analyse der Funktion von LI- und Ksp-Cadherin bei der Carcinogenese und zur Bestimmung ihrer Eignung als Differenzierungsmarker für maligne und prä-maligne Prozesse. In diesem Zusammenhang wurde bereits damit begonnen, die Regulation der Expression von LI-Cadherin aufzuklären und über verschiedene Tiermodelle – einschließlich der Generierung einer LI-Cadherin-defizienten Maus – die Beteiligung von LI-Cadherin an anderen als rein zelladhäsiven zellulären Prozessen zu studieren. Außerdem werden derzeit die molekularen Interaktionen von LI-Cadherin mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems und unter Verwendung fluoreszierender Cadherin-Fusionsproteine analysiert.

4.2 Isolierung und molekulare Charakterisierung des LI-Cadherins

Das Projekt begann zunächst mit einem monoklonalen Antikörper, mAb 47.2, der in einer Balb/c Maus gegen ein gelelektrophoretisch aufgetrenntes, und folglich denaturiertes Protein aus Plasmamembranen des chemisch induzierten Morrishepatoms 7777 der Ratte (Morris & Criss, 1978) erzeugt worden war (Loch, 1992). Da der Antikörper in Schnitten von Tumor- und Lebergewebe hauptsächlich die Zellgrenzen und bei kultivierten Morrishepatomzellen die Zelloberflächen färbte, wurde vermutet, daß es sich bei dem Antigen um ein Membranprotein handelte, das primär in der Plasmamembran von Rattenhepatozyten und den daraus abgeleiteten Hepatomzellen exprimiert wird. Durch Western Blot-Analysen waren bereits das apparente Molekulargewicht (etwa 120 Kd), das Ausmaß der N-Glycosylierung (Reduzierung des apparenten Molekulargewichts auf etwa 97 Kd nach vollständiger Abspaltung der N-Glycane mit PNGase F), der isoelektrische Punkt (bei pH 4,5) und die Halblebenszeit (etwa 6-18 h) des nicht näher identifizierten Proteins bestimmt worden (Loch, 1992).

Eine über diese Vorarbeiten hinausgehende, weitere molekulare und funktionelle Charakterisierung konnte nur durch die Isolierung des Proteins und die Klonierung der cDNA erfolgen. Um dies zu erreichen, wurde zunächst der mAb47.2 über eine Protein-Sepharosesäule präparativ affinitäts gereinigt und anschließend selbst immobilisiert, um das unbekannte Proteine ebenfalls mittels Immunaффinitäts-Chromatographie isolieren zu können. Obwohl der mAb47.2 sowohl für Immunblots als auch für die Immunhistochemie gut geeignet war, wurde kein Protein an die Säule gebunden. Unter der Annahme, daß der gegen ein Detergens-denaturiertes Protein generierte Antikörper möglicherweise auch nur ein denaturiertes Antigen erkennen würde, entschied ich mich für eine sehr unkonventionelle und radikale Methode: Ich kochte das Ausgangsmaterial, isolierte Plasmamembranen von Morrishepatom-Zellen, zunächst für 10 min in 3% CHAPS, reduzierte die Detergensenkonzentration durch Verdünnen auf ein Zehntel, entfernte Präzipitate mittels Zentrifugation und lud den Überstand auf die Immunaффinitätssäule. Mittels pH-Gradient konnte nach dem Waschen der Säule eine geringe Menge reines Protein (weniger als 5% Kontaminationen) eluiert werden, das nach mehrfacher Wiederholung der Chromatographie ausreichte, um zwei Kaninchen erfolgreich gegen das weitgehend native Protein zu immunisieren.

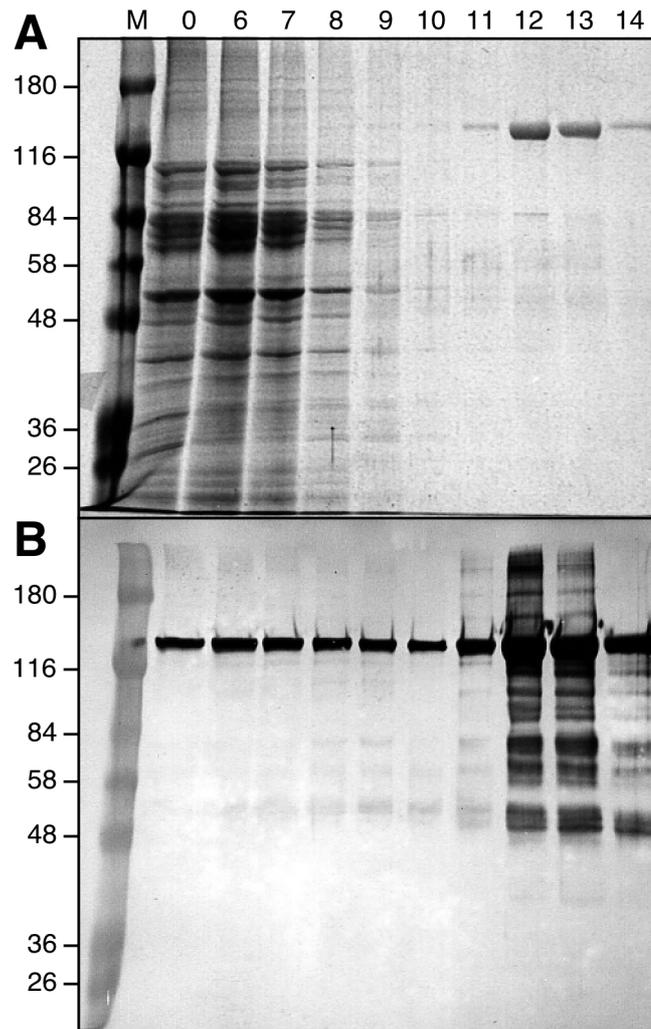


Abb. 4.4: Reinigung des unbekanntes Proteins mittels Immunaffinitäts-Chromatographie. Neben einem Proteinstandard (M) wurden auf identischen SDS-PA-Gelen der Durchfluß (0) der Immunaffinitätssäule, die mit dem neu generierten polyklonalen Antikörper hergestellt wurde, sowie fortlaufende spätere Fraktionen aus der Wasch (6-10) und Elutionaphase (11-14) aufgetrennt. In (A) ist eine Commassie-Färbung aller Proteine und in (B) ein Western-Blot mit dem gleichen polyklonalen Antikörper dargestellt, der aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit sowohl kleinste Mengen kovalenter Proteinaggregate oberhalb als auch Proteinfragmente unterhalb der eigentlichen Bande anfärbt.

Eines der beiden auf diese Weise induzierten Antiseren hatte einen sehr hohen Titer und war im Western Blot genauso spezifisch wie der monoklonale Antikörper, d.h. es zeigte keinerlei Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen der Ratte. Da das Serum auch hochaffin an das native Protein band, wurde es – meist in Form von Protein A-Sepharose-affinitätsgereinigtem IgG – für alle weiteren Untersuchungen, insbesondere für die Expressionsklonierung, die Immunfluoreszenz- und die Immunelektronen-Mikroskopie verwendet. Im Immunblot war der polyklonale Antikörper dem monoklonalen dadurch überlegen, daß er außer dem intakten Protein und einigen großen Fragmenten, die das mAb 47.2-

Epitop offensichtlich noch enthalten, auch eine Vielzahl kleiner Fragmente erkannte, eine Eigenschaft, die vor allem für die Detektion von heterolog exprimierten Partialsequenzen von Nutzen sein sollte.

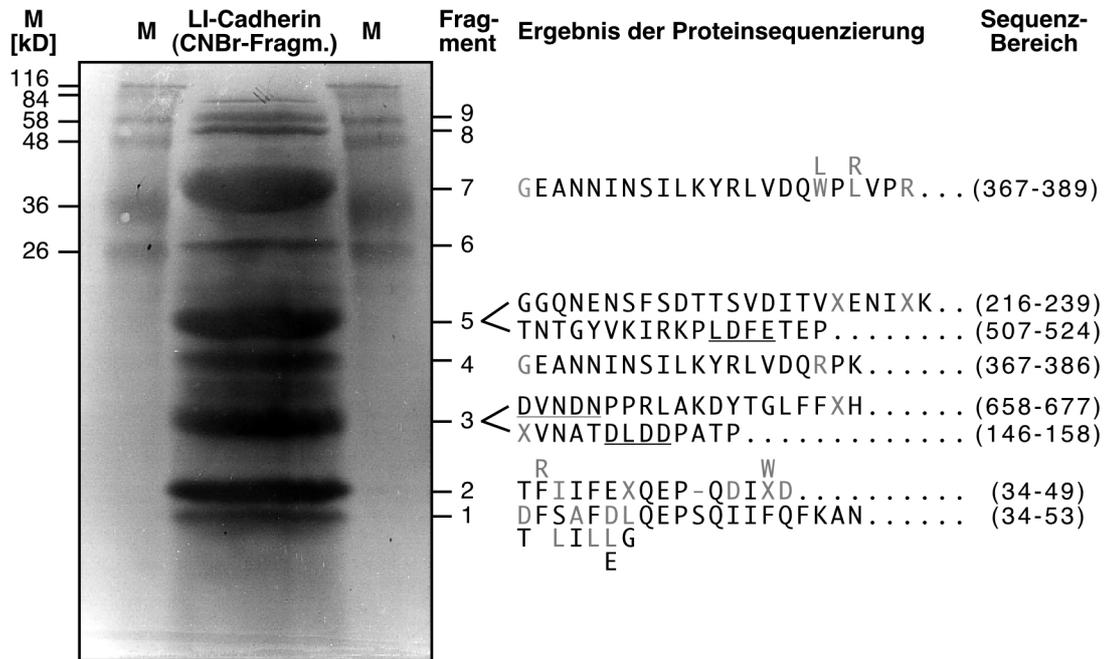


Abb. 4.5: Direkte Proteinsequenzierung von CNBr-Fragmenten. Nach einer CNBr-Spaltung wurden die erhaltenen Fragmente mittels Tricin-SDS-Gelelektrophoreses separiert, auf eine PVDF-Membran übertragen und mittels automatischem Edman-Abbau N-terminal ansequenziert. Auf dem Gel wurden beidseits Markerproteine (M) aufgetragen, deren molekulare Massen links neben der Photographie der Commassie-gefärbten PVDF-Membran angegeben sind. Sechs von neun untersuchten Fragmenten konnten erfolgreich sequenziert werden; in zwei Fällen konnte neben einer Hauptsequenz eine schwächere zweite Sequenz bestimmt werden, die unter die Hauptsequenz geschrieben wurde. An einigen Positionen ergab die Sequenzierung mehrere Lösungen, die entsprechend ihrer Signalstärke ebenfalls unter- oder oberhalb der Hauptsequenz aufgeführt sind. Korrekt identifizierte Aminosäuren sind schwarz, nicht identifizierbare (mit "X" bezeichnet) und falsch bestimmte Aminosäuren sind grau gedruckt.

Außerdem wurde das gereinigte IgG an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt und diente zur präparativen Aufreinigung des Proteins aus Triton X-100-solubilisierten Morris-Hepatom-Plasmamembranen. An 20 mg immobilisierten, affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern (pAb120) konnten pro Lauf etwa 80 µg des unbekanntes 120 Kd-Proteins gebunden und bei pH 3.0 eluiert werden (Abb. 4.4).

Um die Identität des untersuchten Proteins zu klären, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum einen wurde erhofft, über eine N-terminale Sequenzie-

rung des gereinigten Proteins eine Partialsequenz für Sequenzvergleiche und zur Herstellung von DNA-Sonden für die cDNA-Klonierung zu gewinnen, und zum anderen wurde versucht, die cDNA direkt aus einer λ -Expressionsbank unter Verwendung der polyklonalen Antikörper zu klonieren (s. Abschnitt 4.3). Trotz mehrfacher Versuche konnte jedoch auch unter Einsatz großer Mengen von gereinigtem Protein keine N-terminale Sequenz erhalten werden. Erst eine CNBr-Spaltung und Sequenzierung der mittels SDS-PAGE separierten Fragmente brachte den ersehnten Erfolg: Sechs der, wie sich später herausstellte, maximal zehn möglichen CNBr-Fragmente konnten in einer Länge von bis zu 20 Aminosäuren sequenziert werden (Abb. 4.5A). Eine Analyse der erhaltenen Partialsequenzen (Abb. 4.5B) zeigte, daß sie mehrere Sequenzmotive enthielten (DXD, DXNDN, LDXE), die innerhalb der Cadherinfamilie konserviert sind und als potentielle Bindungsstellen für Calciumionen beschrieben worden waren (Ringwald et al., 1987; Kemler et al., 1989; Ozawa et al., 1990b).

4.3 Klonierung und Expression des LI-Cadherins

(siehe beiliegende Publikation Nr. 13)

Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca^{2+} -dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. D. Berndorff, R. Gessner, B. Kreft, N. Schnoy, A.M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch and R. Tauber, *J. Cell Biol.* 125, 1353-69, 1994

Um die molekulare Struktur des von uns entdeckten Cadherins aufklären zu können, wurde mit Hilfe des polyklonalen, hochaffinen Antikörpers die korrespondierende cDNA in einer Rattenleber-cDNA-Expressionsbank identifiziert und sequenziert. Die cDNA enthielt nur einen großen offenen Leserahmen mit einer Länge von 2481 bp, aus dessen Sequenz eine Polypeptid aus 827 Aminosäuren abgeleitet wurde, das einen kurzen hydrophoben aminoterminalen Bereich besitzt, der als Signalsequenz interpretiert wurde, anschließend mehrere direkte Repeats, einen weiteren, offensichtlich einer Transmembrandomäne entsprechenden, hydrophoben Bereich und schließlich eine nur 20 Aminosäuren lange, putative cytoplasmatische Domäne.

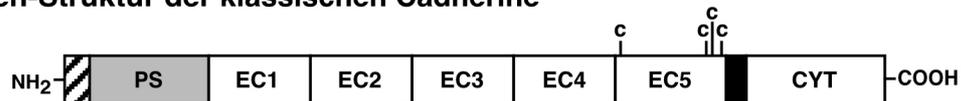
Der Abstand der direkten Repeats entsprach mit 110 Aminosäuren genau der Länge der für Cadherine frühzeitig beschriebenen, extrazellulären Sequenzwiederholungen, die auch als Homologiedomänen oder Cadherin-Repeats bezeichnet werden (Ringwald et al., 1987). Es war allerdings lange unklar, wo die Grenze zwischen benachbarte Domänen lag. Während die Arbeitsgruppen um Kemler (Ringwald et al., 1987) und Edelman (Gallin et al., 1987) die dritte Aminosäure nach dem konservierten DXD-Motif als Ende der jeweiligen Domänen definiert hatten, sah die Arbeitsgruppe um Takeichi die vierte Aminosäure hinter dem DXNDN-Motif als Grenze an (Nose et al., 1987). Eine strukturell korrekte Definition der Domänengrenze wurde jedoch erst sehr viel später durch die Aufklärung der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne des N-Cadherins möglich (Shapiro et al., 1995). Die Röntgenstrukturanalyse ergab ebenso wie die NMR-Strukturanalyse der N-terminalen Domäne des E-Cadherins (Overduin et al., 1995) und die Röntgenstrukturanalyse des N-terminalen Domänenpaares (EC1-EC2) des E-Cadherins (Nagar et al., 1996), daß das Sequenzmotif DXNDN die Linkerregion zwischen zwei aufeinander folgenden Cadherin-Domänen bildet und bestätigte so die Definition der Arbeitsgruppe von Takeichi.

GAATTCATTGGGCGCTGGGCAAACTCCGAAACGCTCTCTGCAGAGTCTGGTGTGAATGACACTGGGCGGTAGCACCCTGAACTGGCCATCTTGTTCAGGAAGTGAAGTCA	120
GTCTCCCTCCACCCGATGCTCGCTGTGCTCAGAGAAATTTGCTAAGGGGGTTGAAGGGAGAGTTAGAGGAGAGAGCAGGTTGAGGAAGTCTCTTTGGGGTCTTCAGCCACAG	240
CAAGTATCTCCACCGCTGAATGGAGACAAACGACTTTTAAGCAGTATTTCTTACTTACAGAAAGAGTCCAAGTGAAGAGACACATGGTCTCTGCCCAGCTTCACTTCTGTGCTT	360
M V S A Q L H F L C L	11
CTCACGCTTTATTTGACTGGGCGATATGGCCAGAAGGGAAGTTCAGCGGCCCTGAAACCCATGACATTTCTCTATTTTGAAGGCCAAGACCGAGTCAAATCATATTCAGTTTAA	480
L T L Y L T G A Y G Q E G K F S G P L K P Δ T F S I F E G Q E P S Q I I F Q F K	51
EC1	
GCCAAACCTCCAGCTGTGACTTTTGGCTAACAGGAGAGCCGGATGGTATATTTAAGATAGAAAGGATGGACTTCTTATACACAAGACTCCTGGACAGAGAAACAAGGGCGTTCAT	600
A N P P F A V T F E L T G E T D G I F K I E K D G L L Y H T R V L D R E T R A V H	91
CATCTGCAGCTTGCAGCTTGGATCTCAGGGAGCTATAGTGGATGGCCAGTCCCATCATAGAAAGTCAAGGACATCAATGACAACCGACTTACATTTCCAGACAAAATATGAA	720
H L Q L L A A L D S Q G A I V D G P V P I I I E V K D I N D N R P T F L Q T K Y E	131
EC2	
GGCTCAGTGGGAGAACTCTCGCCAGGAAGCCCTTCTATGTATGTCAATGCTACAGACTGGATGACCCGGCTACTCCCAATGGCCAGCTTTTTTATCAAATGTCAACAGCTTCCC	840
G S V R Q N S R P G K P F A Y V N A T D L D D P A T P N G Q L F Y Q I V I Q L P	171
AAAAACAATGTTATGACTTCCAGATCGACAACAACAGGGGCAATCTCGTTACCCAGAGGTTCTCAGGATTTGGATCCAAATAAGATCCGCTACTACAACCTGGTGGTCTCT	960
K I N N V Δ Y F Q I D N K T G A I S L T P E G S Q V L D P I K N P Y Y N L V V S	211
GTGAAGGACATGGGGGGCAGAAATCCCTTCAGCGTACCCACATCTGTGGATATTTACTCTCAGAGAGAACTCTGGAAAGCACCAGCCCTGTGGAGATTGCGAAAACTTAAT	1080
V K D Δ G G Q N E N S F S T S V D I T V R E N I W K A P E P V E I R N	251
EC3	
GATCCTCACCCATCAAATCACTCAGTGCAGTGGATGACCCAGGGGCCACTTCTTCTTAATCAACAAGGAGAGCTGCCACAGTTCCATTTCTGATCGACCAGAGGAAATATT	1200
D P H P I K I T Q V Q W N D P G A H Y S L I N K E K L P Q F P F S I D Q E G N I	291
TACGTGACTCAGCTTTGGACCTGAGGAAAAGGACTCTCATGTTTCTTTGGCCACTGCAAGGATGAGAAAGGAAAACCCCTTGCATATCCACTGGAATTCGTGTGAAAGTTATGAC	1320
Y V T Q P L D R E E K D S H V F F A T A K D E N G K P L A Y P L E I R V K V I D	331
ATTAACGACACCCACCGCATGCTCTCTCAAGTACTGTATTTGAAGTCCAGGAGAAAGTCTTGGGTAGTACATTTGGGATCTTGTCTGCCACGATATGGATGAGCTAACAT	1440
I N D N P P T C L S Q V T V F E V Q E N E V L G S S I G I F A A H D Δ I D E A N N	371
EC4	
ATCAACGATTTTGAAGTACAGACTTGTAGACAAACACCAAGTCCCTCAGATGAACCTTCTTCTCAATGACGAATATGGAGAAAGGTCAGTTGGGTAAACGGTCTTGAAGAAG	1560
I N S I L K Y R L V D Q T P K V P S D E L F L I D E Y G G K V Q L G K R S L K K	411
CAAGACAGCTCAGTACAAATTAACAGTAGAGTGTGACATAGATTTCAAGTCTCTCTCTTCAAGTCAACGTTATTGATATCAACGATCAGATTCACATCTTTGAAGATCA	1680
Q D S P V S D N L T V E V S I D I D F K T L C S L Q V N V I D I N D Q I P I F E R S	451
EC5	
GACTATGGAAGCAAGACTTTTCTGAAGACACAGCCATCCGATCCCACTTAAATCAACAAGTACTGATGATGAGCCCTTTACCGGGAGCTTAAATTTCTGACAGATTTGTA	1800
D Y G S K T L S E D T A I G S T I L I I Q A T D D D E P F T G S S K I L Y K I V	491
CAGGGAGACTGAGGGAAGCTGGAAGTTGTACAGATCCCATGACCAATACAGGATACGCTCAAGATCAAGAAAGCCCTTGTGATTTTGAACCGAACCAGTTACTAGCATTTGTTCAAA	1920
Q G D T E G R L E V V T D P Δ T N T G Y V K I R K E L D F E T E P V T S I V F K	531
GCAGAAAACCTGAGCCGCTGGTGAATGGATAGAGTACAATGCTAGTCTTTTGGCTCCTTCCGAGTGCAGCGGATGTAATGAATGCCTGTATTTCCACGCAATATTCCAA	2040
A E N P E P L V N G I E Y N A S S F A S F E L T V T D V N E V P V F P Q Q I F Q	571
EC6	
GCCAACTTAGCGAGGATGCTATAGGCACTAAAGTGGCACTGTGACTGCCAGGATCCGGAAGCCCTGACTGTGAGTTATCACTGAAAGCAATAGAGAGGTTGGCTTAAATC	2160
A N V S E D T A I G T A K V G T V T A R D P E G L T V S Y S L K D N K R G W L K I	611
GACTCCGTCACCGCCAGTATTTAGCACTGCTCCGCTGACAGGAAACAGAAAGTGTGATCGAGTCAAGTGGTGGCCACTGAAGTGGTGGCTCTCTCAGTTCTACAGCATAT	2280
D S V T G D I F S T A P L D R E T E S V Y R V Q V V A T E V G G S S L S T S T A Y	651
TTCCACCTGGTCTCATGATGTGAATGACAACCCCTCGCTAGTAAAGACTACAGGCTTTGTTCTTCCCATCCCTTAAGTGCCTGGGAGCCTCATCTTTGAAAGCCACTGAT	2400
F H L V L Δ D V N D N P P R L A K D Y T G L F F C H P L S A P G S L I F E A T D	691
EC7	
GATGACGAGCTCAGTCTGGAGCCCAAGTTTACGTTTGCCTTGGCAGAGAAGCTTACAAGTACTGGGAAGTGTCCAAAATCAATGGCACACATGCTAGACTCTCACCAAGCAC	2520
D D Q Q S V R R P K F T F A L G R E S L Q S D W E V S K I N G T H A R L S T K H	731
ACACGTTTGAAGCAAGTTTATGACATCCCAATCCTCATCAATGATGGGGGAGCCACCAATGGAAGCATTGTCTCTTATCAGTTACTTTCTGCCAGTGTGGAGGAAAGTTT	2640
T R F E E Q V Y D I P I L I N D G G Q P P Δ E G I V S L S V T F C Q C V D G S C	771
TTCCGCCAGCAGGCAACAGGTTGGATACCCACCTGGCACTGGCACTGGTATATCTTCTGACCAATTTCTGGTCATTTGATATAATTTAGCGGTTGATTCATCCGTATGAGGAAA	2760
F R P A Q N Q V G I P T V G Δ A V G I L L T T F L V I G I I L A V V F I R K	811
GATAAGTTGAAGTCCACAGTCCCTGAGAATAAGCCTTGGAGGCTGAATTTGAACAGAAATGTTCAAGGTTGTACACCAAGCAGTATCAATGCCCTCAGCTGTTTAATTCATCC	2880
D K V E D P Q S P E N K P L R S ***	827
AAAAATGTAAGTATAATTTAGTATGATCATGTCTATATCTGGTCCCAAGCTTTAATCTCAATAATTCATCCAAAATGTGAATATAATTTCTTTGATGGATGCCTCTCT	3000
GTCTGCAACACTTAAACGCTACTTAGATATTTTATCTCTGAGACATTAGAGTTACTCTCCATTCGCCATAACATTTTGTCTCTTTACAAAAGCCATACATAACATTTCCCTCT	3120
GGAAAGAAGTGAAGTATAGTATAAACCTGTGTGCTGTTTTCAGAGACAAAGTCTGTTTCTCCCAACTGACTTTTCTAGGCTCCACTTATCCCTTTCTGTTCCACCTGCGCCCCCTG	3240
ATCTCAGCATACATTAATTTAAATGTGTACACAAAAGAACAAAGTGAAGTCTTGGGGGGGTTGCTTAAGTGGACAGCTTATTTCTTACAGCAACAAACAGCTTCTCTGTGTT	3360
GTCACTTTAATAGAGTCCCTCAGCTTGGCTATGGTGTAGACCCCTGGGGAGGTATCAATACACTCCGCTGTTTCAAGAAAGACCTTACTTATGAGGACAGAGACTGACGAGCTGTG	3480
TGGGTTACTCACTACCTCGTCTACATACATGCTGTACATGTTTTATTGTATATGAAGTTTGTATATATTTATCATGTGGAGAAAGCAAGACTGATGCTGGTGAAGAAAT	3600
CCAAATAAATGTTGGTTTCAGGAATTC	3628

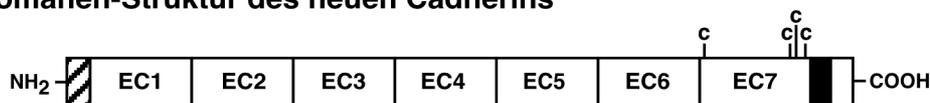
Abb. 4.6: Interpretation der cDNA und abgeleiteten Proteinsequenz des LI-Cadherins. Die direkt sequenzierten CNBr-Proteinfragmente sind schwarz umrandet, alle zehn Methionine, nach denen das Protein durch CNBr gespalten wird, sind mit einem schwarzen Dreieck hinterlegt, die vier konservierten Cysteine in der Prämembrandomäne (EC7) mit einem schwarzen Quadrat und die sieben potentielle N-Glycosylierungsstellen mit einem schwarz gefüllten Kreis. Die Transmembrandomäne ist dick und das Polyadenylierungssignal in der 3'-UTR ist dünn unterstrichen.

Obwohl bereits aus der Sequenzanalyse des neuen Cadherins ersichtlich war, daß einige Motive insgesamt siebenmal im extrazellulären Bereich vorhanden waren und sich aufgrund der Gesamtlänge dieses Bereichs ähnliche Domänen-grenzen wie bei Takeichi ergaben (s.o.), wurden die Daten zu dem damaligen Zeitpunkt anhand der Modelle von Kemler und Edelman (s.o.) interpretiert. Dementsprechend ergaben sich zunächst 5 Homologiedomänen und eine zusätzliche Prämembrandomäne. Aus heutiger Sicht und in völliger Übereinstimmung mit der Proteinsequenz muß jedoch von 7 extrazellulären Cadherin-Repeats und damit im Vergleich zu den klassischen und desmosomalen Cadherinen von zwei zusätzlichen Repeats ausgegangen werden (Abb. 4.7). Außerdem fehlte die bei klassischen Cadherinen in unterschiedlicher Länge vorhandene Prosequenz. Die Entstehung dieser beiden zusätzlichen Domänen aufzuklären, war ein Ziel der in Publikation Nr. 18 beschriebenen Arbeit (Abschnitt 4.8).

Domänen-Struktur der klassischen Cadherine



Domänen-Struktur des neuen Cadherins



Publizierte Domänenstruktur



Abb. 4.7: Domänenstruktur des neuen Cadherins im Vergleich zu den klassischen Cadherinen. Die Signalsequenz ist schräg gestreift, die Prosequenz (PS) grau und die Transmembrandomäne schwarz schattiert. Die extrazellulären Cadherin-Repeats (EC) sind vom Aminoterminus beginnend fortlaufend nummeriert. Die bei den klassischen Cadherinen wesentlich längere cytoplasmatische Domäne (etwa 150 Aminosäuren) ist mit CYT bezeichnet.

Da das neue Cadherin in der Ratte mittels Western- und Northern Blot sowie auch immunhistochemisch nur in der Leber (präferentiell in den dem Disse'schen Raum zugewandten Plasmamembranbereichen der Hepatocyten) und in dem Darm (ausschließlich an den basolateralen Membranbereichen der Epithelzellen) nachgewiesen werden konnte, bezeichneten wir es in Analogie zu den

klassischen Cadherinen, die meist nach ihrem präferentiellen Expressionsort benannt wurden, als Liver-Intestine- oder kurz LI-Cadherin.

Durch Expression des LI-Cadherins in *Drosophila* S2-Zellen, die sich gut in Suspension halten lassen und in der *Drosophila*-Forschung u.a. als Modellsystem zum Studium von Zelladhäsionsphänomenen genutzt werden, konnte schon in dieser ersten Publikation gezeigt werden, daß LI-Cadherin eine homotypische, Ca^{2+} -abhängige und durch Antikörper blockierbare Zell-Zelladhäsion vermittelt, da es zur Aggregation der Zellen in Suspension führte. Damit war klar, daß es sich beim LI-Cadherin um ein funktionelles Cadherin handelte, das sich jedoch strukturell wesentlich von bereits zu dieser Zeit gut untersuchten klassischen und desmosomalen Cadherinen unterschied.

4.4 Analyse der zelladhäsiven Funktion des LI-Cadherins

(siehe beiliegende Publikation Nr. 14)

LI-cadherin-mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions. B. Kreft, D. Berndorff, A. Böttlinger, S. Finnemann, D. Wedlich, M. Hortsch, R. Tauber and R. Geßner, J. Cell Biol. 136, 1109-21, 1997

Ziel dieser Arbeit war es, die zelladhäsive Funktion des LI-Cadherins im Vergleich zu den klassischen Cadherinen besser zu charakterisieren. Als Modellsystem dienten hierbei zunächst L-Zellen, eine aus Mäusefibroblasten abgeleitete Zelllinie, die endogen α - und β -Catenin exprimieren und daher von den meisten Arbeitsgruppen zur funktionellen Untersuchung von klassischen Cadherinen eingesetzt wurden (Edelman et al., 1987). Nach Transfektion mit einem Expressionsvektor für LI-Cadherin veränderte sich der Phänotyp der normalerweise fibroblastoid wachsenden L-Zellen im Sinne einer verstärkten Ausbildung von Zellkontakten. Während jedoch Kontrollzellen, die mit einem Expressionsvektor für das klassische *Xenopus* XB/U-Cadherin (Müller et al., 1994) transfiziert waren, den für ein derartiges Experiment typischen epithelialen Phänotyp annahmen (McNeill et al., 1990; Behrens et al., 1991; Burdsal et al., 1993), bei dem die Zellgrenzen aufgrund der Ausbildung von Adherens junctions in der Phasenkontrastdarstellung kaum noch zu sehen sind, war der durch LI-Cadherin induzierte zelluläre Phänotyp eher als intermediär einzustufen.

Im Gegensatz zu XB/U-Cadherin, war LI-Cadherin jedoch nicht in der Lage, unter den für klassische Cadherine typischen Bedingungen (Ozawa et al., 1989) in der Co-Immünpräzipitation α - und β -Catenin zu binden. Da die Expression von LI-Cadherin in L-Zellen zudem weder zu einer Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts führte, noch durch Bindung von β -Catenin dessen zelluläre Konzentration erhöhte, muß davon ausgegangen werden, daß LI-Cadherin in L-Zellen weder über α - und β -Catenin noch über andere Brückenmoleküle eine stabile Verbindung zum Aktin-Cytoskelett herstellt. Dennoch bewirkt es in diesen Zellen eine spezifische, Ca^{2+} -abhängige, homotypische Zell-Zell-adhäsion, die im Gegensatz zu dem durch klassische Cadherine vermittelten adhäsiven Effekt auch nicht durch die Depolymerisation des Aktin-Cytoskeletts mittels Cytochalasin D inhibiert werden konnte. Hieraus konnte gefolgert werden, daß im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen LI-Cadherin keine feste Verbindung zu dem Aktin-Cytoskelett benötigt, um seine zelladhäsive Funktion auszuüben.

Um diese Hypothese sicher zu belegen, wurde eine Mutante des LI-Cadherins erzeugt, die nur aus dessen extrazellulärer Domäne und einem Glycosylphosphatidylinositol- (GPI-) Anker bestand. Ein derartiges Konstrukt sollte lediglich über seinen Lipidanker von außen mit der Plasmamembran verbunden sein, ohne einen direkten Kontakt mit cytoplasmatischen Komponenten eingehen zu können. Wenn dieses Protein ebenfalls noch zelladhäsiv wirken sollte, wäre damit belegt, daß LI-Cadherin für seine adhäsive Funktion im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen keine cytoplasmatischen Interaktionspartner benötigt.

Zu Realisierung dieses Vorhabens wurde der für den entsprechenden Teil kodierende Bereich der LI-Cadherin cDNA in Frame an den 3'-Bereich der *Drosophila* Fasciclin I cDNA ligiert, welcher die Erkennungssequenz für die GPI-Prozessierung trägt. Das Konstrukt wurde zunächst unter der Kontrolle eines induzierbaren Metallothionein-Promoters in *Drosophila* S2-Zellen exprimiert. Im Western Blot wurde mit LI-Cadherin-spezifischen Antikörpern nachgewiesen, daß hinreichende Mengen des Proteins exprimiert werden, und mit Antikörpern gegen die Cross-Reacting-Determinant des GPI-Ankers, daß dieser korrekt prozessiert wurde und durch Phospholipase C-Verdau für die Bindung dieses Antikörpers vorbereitet werden konnte. Als weiteres Indiz für die korrekte Prozessierung diente der Nachweis des Einbaus von Tritium-markiertem Ethanolamin in das LI-Cadherin-GPI-Konstrukt.

Nach diesen erfolgreichen Überprüfungen konnte gezeigt werden, daß das GPI-verankerte LI-Cadherin eine ähnlich starke Aggregation von S2-Zellen bewirkte wie das transmembranäre Wildtypprotein und wie dieses in seiner adhäsiven Funktion durch den Entzug der Ca^{2+} -Ionen oder die Zugabe von LI-Cadherin-spezifischen polyklonalen Antikörpern inhibierbar war. Eine interessante zusätzliche Eigenschaft des GPI-verankerten LI-Cadherins bestand jedoch darin, daß seine adhäsive Funktion selektiv durch den Verdau mit einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C aufgehoben werden konnte. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte zudem nachgewiesen werden, daß sich das GPI-verankerte LI-Cadherin überwiegend auf der Zelloberfläche befand und sich in den Kontaktzonen zwischen benachbarten Zellen anreicherte. Ein Schlüsselexperiment bestand jedoch in dem Mischen von fluoreszenzmarkierten S2-Zellen, die das Wildtyp-LI-Cadherin exprimierten, mit unmarkierten S2-Zellen, die das GPI-verankerte LI-Cadherin exprimierten. Im Vergleich der Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopischen Darstellung fanden sich überraschenderweise große Mischaggregate, die als Nachweis für eine nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ vergleichbare zell-zelladhäsive Eigenschaft der beiden Moleküle angesehen werden kann. Somit hat die cytoplasmatische

Domäne des LI-Cadherins offensichtlich für dessen zelladhäsive Funktion weder im Hinblick auf die Stärke der vermittelten Aggregation, noch im Hinblick auf dessen Spezifität einen Einfluß.

Diese Eigenschaft unterscheidet LI-Cadherin wesentlich von den klassischen Cadherinen, deren adhäsive Funktion von der Anwesenheit einer intakten cytoplasmatischen Domäne bestimmt wird, wie durch serielle Deletionen des Carboxyterminus (Nagafuchi & Takeichi, 1988; 1989) des E-Cadherins, partielle Deletionen (Ozawa et al., 1989) und die Expression der putativen Bindungsregionen als cytoplasmatischer Fusionsanteil eines chimären Membranproteins (Ozawa et al., 1990a) gezeigt werden konnte. Die fehlende Interaktion mit Cateninen erklärt auch, daß LI-Cadherin im Gegensatz zu dem im Darmepithel ebenfalls exprimierten E-Cadherin nicht in den Adherens junctions und auch nicht in den Desmosomen zu finden ist, sondern gleichmäßig über die gesamte laterale Kontaktfläche zwischen benachbarten Enterocyten verteilt ist. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß dem LI-Cadherin im Darmepithel eine andere Funktion als dem E-Cadherin zukommt, die in den folgenden Arbeiten näher charakterisiert wird.

4.5 LI-Cadherin als Marker der Magenmetaplasie

(siehe beiliegende Publikation Nr. 15)

LI-cadherin – a marker of gastric metaplasia and neoplasia. C. Grötzinger, J. Kneifel, D. Patschan, I. Anagnostopoulos, N. Schnoy, S. Faiss, R. Tauber, B. Wiedenmann and R. Geßner, *Gut* 49, 73-81, 2001

Nachdem die zell-zelladhäsive Funktion des LI-Cadherins nachgewiesen war (Abschnitt 4.4 und Publikation 14) und während sein Expressionsmuster in der Embryonalentwicklung der Maus in unserem Labor analysiert wurde (Angres et al., 2001), begannen wir, die Beteiligung des LI-Cadherins an pathologischen Prozessen zu studieren. Da für das E-Cadherin bereits bekannt war, daß seine Expression in metastasierenden Carcinomen oft reduziert (Dorudi et al., 1993; Dorudi et al., 1995) oder seine Proteinstruktur durch Mutationen verändert ist (Birchmeier & Behrens, 1994; Bracke et al., 1996; Bex et al., 1998; Guilford et al., 1998) und zudem gezeigt worden war, daß das invasive Wachstum von Tumorzellen durch die erneute Expression von E-Cadherin aufgehoben werden kann (Frixen et al., 1991; Bracke et al., 1994; Charlier et al., 1996), war zunächst das Ziel des Projektes, die Expression von LI-Cadherin in verschiedenen differenzierten Colonicarcinomen immunhistochemisch unter Verwendung von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern, die gegen die ersten beiden Cadherin-Repeats induziert worden waren, zu analysieren.

Hierbei fand sich eine starke, membranständige Expression von LI-Cadherin in gut differenzierten Adenocarcinomen und eine Abnahme der Expressionsstärke und Membranlokalisation von LI-Cadherin mit zunehmender Entdifferenzierung. Überraschend war es jedoch, als sich bei der Untersuchung weiterer gastrointestinaler Tumore herausstellte, daß LI-Cadherin vergleichbar stark auch in Adenocarcinomen des Magens exprimiert wird, obwohl es im gesunden Magenepithel nicht zu finden ist. Bei der daraufhin durchgeführten systematischen Untersuchung von 77 Magenbiopsien und 24 Magencarcinomen wurde ein den Colonicarcinomen ähnliches Expressionsmuster in den Magencarcinomen beobachtet: Eine starke, membranständige Expression in tubulären und mucinösen Adenocarcinomen, eine etwas schwächere Expression in Siegelringcarcinomen und eine sehr schwache, diffus-cytoplasmatische Expression in undifferenzierten Magencarcinomen. Zudem korrelierte innerhalb eines Adenocarcinom-Präparates die Expressionsstärke mit dem lokalen Differenzierungsgrad der Tumorzellen.

Bei den von 30 verschiedenen Patienten stammenden 77 Magenbiopsien wurde in 12 Fällen in der Immunfluoreszenzfärbung eine starke, membranständige Expression von LI-Cadherin gefunden. Die aus 10 Patienten gewonnenen Biopsate waren in 7 Fällen zuvor histopathologisch auf der Grundlage einer HE-Färbung als intestinale Metaplasien eingestuft worden. Die drei als nicht pathologisch verändert befundenen Biopsate zeigten zusätzlich zu LI-Cadherin auch eine starke Expression von Villin, welches als etablierter Marker für die Diagnose der intestinalen Metaplasie gilt. Da der von uns verwendete, eigene polyklonale anti-LI-Cadherin-Antikörper im Gegensatz zu dem kommerziell erworbenen monoklonalen Anti-Villin-Antikörper eine kaum detektierbare Hintergrundfärbung aufwies, wurde er von uns als mindestens gleichwertiger Marker für die intestinale Metaplasie des Magenepithels eingestuft.

Ein interessanter Nebenbefund der Untersuchung war der Nachweis, daß bei der intestinalen Metaplasie nie alle Drüsen einer Biopsie, sondern nur einzelne Drüsen oder Gruppen von Drüsen betroffen waren, die in einer Umgebung aus negativen Drüsen lagen. Außerdem exprimierten in fast allen Fällen jeweils ganze Drüsen und nicht einzelne Zellen innerhalb einer Drüse LI-Cadherin. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Veränderung des Genexpressionsmuster im Zuge der intestinalen Metaplasie nicht auf der Ebene der differenzierten Zellen, sondern auf der Ebene der in den Krypten befindlichen gastrointestinalen Stammzellen erfolgen muß. Im Gegensatz zu LI-Cadherin wurde für E-Cadherin und β -Catenin, welche beide auch im gesunden Magenepithel exprimiert werden, keine Veränderung der Expressionsstärke im Zuge der intestinalen Metaplasie beobachtet.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden in der Folge zum einen durch eine Microarray-gestützte Suche nach Veränderungen der Genexpression bei Magencarcinomen bestätigt, bei der LI-Cadherin als eines der stark hochregulierten Gene unter 6800 untersuchten Genen identifiziert wurde (Hippo et al., 2002), und bildeten zum anderen vermutlich die Grundlage zu analogen Untersuchungen von Tumoren des Pancreas (Takamura et al., 2003) und der Leber (Wong et al., 2003).

4.6 Analyse der Calciumionenbindung an LI-Cadherin

(siehe beiliegendes Manuskript Nr. 16)

LI-cadherin lacks the a cadherin specific calcium binding site between the second and third extracellular repeats. A. Zitt, A.W. Koch, M.W. Wendeler, J. Engel, R. Tauber and R. Geßner, submitted

Bei der Analyse der Proteinstruktur des LI-Cadherins der Ratte war bereits aufgefallen, daß die Cadherin-typischen, als Ca^{2+} -Bindungsstellen interpretierten Sequenzmotive nicht zwischen allen Cadherin-Repeats in gleichem Maße konserviert waren. Diese Beobachtung bestätigte sich, nachdem die LI-Cadherin-cDNA aus Mensch und Maus (Angres et al., 2001) kloniert und analysiert worden war. Während alle anderen über die Proteinsequenz definierten Ca^{2+} -Bindungsstellen des LI-Cadherins 5-8 saure Aminosäuren enthielten, waren es für den Übergangsbereich zwischen den Cadherin-Repeats 2 und 3 bei allen drei Spezies nur 3 (Tabelle 4.1).

Um herausfinden, welche Auswirkung das Fehlen mehrerer saurer Aminosäuren in dem Übergangsbereich zwischen den LI-Cadherin-Repeats EC2 und EC3 auf das Ca^{2+} -Bindungsverhalten hat, wurden die Domänenpaare EC1-2 und EC2-3 des humanen LI-Cadherins als Thioredoxin-Fusionsproteine mit einem Hexahistidin-Sequenzmotiv in *E. coli* BL 21 mit Hilfe des Vektors pHisTrx (Kammerer et al., JBC 1998) überexprimiert und aufgereinigt. Nach der quantitativen Abspaltung des Thioredoxin-Hexahistidin-Anteils enthielten die dergestalt im präparativen Maßstab erzeugten Domänenpaare aminoterminal lediglich zwei zusätzliche Aminosäuren (GS). Das Domänenpaar EC1-2 wurde als Positivkontrolle eingesetzt, da es vollständig konservierte Ca^{2+} -Bindungsmotive besitzt (s. Tabelle 4.1).

Die CD-Spektren beider Proteinfragmente wiesen mit einem typischen Minimum bei 215 nm wie erwartet auf eine prädominant β -Faltblatt-Konformation hin. Während jedoch bei dem Domänenpaar EC1-2 die Zugabe von 5 mM Ca^{2+} zu einer signifikanten Veränderung des Spektrums führte, die durch eine anschließende, EDTA-vermittelte Ca^{2+} -Depletion vollständig aufgehoben werden konnte, wurde für das Domänenpaar EC2-3 keine Änderung des CD-Spektrums infolge der Zugabe von Ca^{2+} -Ionen gemessen. Beim Domänenpaar EC2-3 konnte dagegen über die Veränderung des CD-Spektrums als Meßgröße eine Ca^{2+} -Titration durchgeführt werden, die eine Dissoziationskonstante für die Ca^{2+} -Bindung von $K_d = 600 \pm 50 \mu\text{M}$ und eine kooperative Bindung mit einem Hill-Koeffizienten von 1 ergab.

Ca ²⁺ - Bindungsstelle	Spezies	Motiv E	Motiv DXD*	Motiv LDRE	Motiv DXNDN	Anzahl D&E
EC1-2	Mensch	E	DLD	LDRE	DINDN	7
	Ratte	E	DLD	LDRE	DINDN	7
	Maus	E	DLD	LDRE	DINDN	7
EC2-3	Mensch	Q	DPG	LTRE	DIIVT	3
	Ratte	Q	DPG	LTPE	DITVR	3
	Maus	Q	DPG	LTPE	DISIR	3
EC3-4	Mensch	E	DRD	LDRE	DINDN	7
	Ratte	E	DMD	LDRE	DINDN	7
	Maus	E	DMD	LDRE	DINDN	7
EC4-5	Mensch	E	DAD	LKKQ	DINDQ	5
	Ratte	E	DDD	LKKQ	DINDQ	6
	Maus	E	DAD	LKKQ	DINDQ	5
EC5-6	Mensch	E	DPE	LDPE	DVNEA	7
	Ratte	E	DPE	LDPE	DVNEV	7
	Maus	E	DPE	LDPE	DVNEV	7
EC6-7	Mensch	E	DDD	LDRE	DVNDN	8
	Ratte	E	DDD	LDRE	DVNDN	8
	Maus	E	DDD	LDRE	DVNDN	8

Tabelle 4.1: Konservierung der Ca²⁺-Bindungsmotive im LI-Cadherin aus Mensch, Ratte und Maus. Die strukturell definierten Sequenzelemente E, DXD, LDRE und DXNDN (Ringwald et al., 1987; Ozawa et al., 1990b, Overduin et al., 1995), welche die Ca²⁺-Bindungsstellen zwischen den einzelnen Cadherin-Repeats bilden, sind für das LI-Cadherin getrennt nach Spezies aufgeführt. Bis auf das mit einem Stern (*) gekennzeichnete Sequenzmotiv DXD sind alle Motive in dem jeweils ersten Repeat enthalten. In der letzten Spalte wurde für jede Ca²⁺-Bindungsstelle die Anzahl der sauren Aminosäuren Aspartat (D) und Glutamat (E) aufsummiert.

Eine direkte Bestimmung der Ca²⁺-Bindung wurde durch eine Gleichgewichtsdialyse der Domänenpaare mit unterschiedlichen Mengen an Ca²⁺ durchgeführt, wobei die jeweilige Konzentrationen der Ca²⁺-Ionen in den beiden Kammern der Apparatur durch die Messung der Strahlungsintensität des in einem definierten Verhältnis zugegebenen Ca-45 im β -Counter durchgeführt wurde. Auf diese Weise konnte bestimmt werden, daß an jedes Domänenpaar EC1-2 etwa 2,5 Ca²⁺-Ionen mit einer mittleren Affinität von $K_d = 750 \mu\text{M}$ banden. Für das Domänenpaar EC2-3 konnte dagegen bis zu einer Ca²⁺-konzentration von 5 mM keine sättigbare, spezifische Bindung gemessen werden.

Während sich das Domänenpaar EC1-2 des LI-Cadherins somit ähnlich verhält wie das homologe Domänenpaar des E-Cadherins, für das eine ähnliche Ca^{2+} -Dissoziationskonstante von $K_d = 460 \mu\text{M}$ gemessen wurde (Koch et., 1997), bindet das Domänenpaar EC2-3 weder Ca^{2+} -Ionen noch wird es von diesen in seiner Konformation beeinflusst.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sich entweder im Übergangsbereich zwischen EC2 und EC3 eine Hinge-Region befindet, die eine größere Flexibilität der LI-Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion ermöglicht, oder aber eine direkte Protein-Protein-Interaktion in dem Übergangsbereich für eine Ca^{2+} -unabhängige Fixierung der beiden Repeats sorgt. Experimentell kann zwischen diesen beiden Interpretationen letztlich nur durch eine Strukturanalyse des Domänenpaares EC2-3 unterschieden werden, die sich derzeit in Vorbereitung befindet.

4.7 Ca²⁺-Abhängigkeit der homotypischen LI-Cadherin-Bindung

(siehe beiliegendes Manuskript Nr. 17)

Intestinal LI-cadherin acts as a Ca²⁺ dependent adhesion switch. M. Wendeler, D. Drenckhahn, R. Geßner and W. Baumgartner, submitted

Um die Auswirkung der im Vergleich zu den klassischen Cadherinen unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften von LI-Cadherin auf seine adhäsive Funktion besser analysieren zu können, wurden in der hier beschriebenen Arbeit mehrere biophysikalische Methoden eingesetzt, wie die Messung von Einzelmolekül-Interaktionen mittels Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy: AFM), die Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels Affinitätschromatographie und quantitative Analyse der Bindung von LI-Cadherin-beschichteten Microbeads an membranständiges LI-Cadherin auf transfizierten Zellen.

Eine gemeinsame Voraussetzung für die Anwendung dieser Methoden war die Verfügbarkeit modifizierter LI-Cadherin-Moleküle, die sich gerichtet auf einer Oberfläche immobilisieren lassen. Zu diesem Zweck wurde in Analogie zu VE-Cadherin (Gotsch et al., 1997) ein Fusionsprotein konstruiert und in CHO-Zellen als sekretorisches Protein exprimiert, das aus der gesamten extrazellulären Domäne des murinen LI-Cadherins und dem dimerisierenden Fc-Teil des humanen Immunglobulins G₁ besteht (LI-Fc). Das Fusionsprotein ließ sich in präparativen Mengen aus dem Zellkulturüberstand von stabil transfizierten CHO-Zellen mittels Protein A-Affinitätschromatographie aufreinigen und wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung von LI-Cadherin- und IgG-spezifischen Antikörpern auf das Vorhandensein beider Fusionsanteile überprüft. Durch den Vergleich der elektrophoretischen Mobilität im SDS-PA-Gel unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (+/- Mercaptoethanol) konnte zudem gezeigt werden, daß das LI-Fc-Fusionsprotein nicht nur die erwartete molekulare Masse besaß, sondern aufgrund seines IgG-Fc-Anteils wie angenommen kovalente Homodimere bildete.

Für die AFM-Messungen wurde das LI-Fc-Fusionsprotein kovalent sowohl an der Kontaktfläche als auch an der Spitze des Meßfühlers immobilisiert. Der Meßfühler wurde viele Male mit einer definierten Geschwindigkeit an die Oberfläche heran- und anschließend hinweggeführt; aufgenommen wurden dabei die Kraft-Weg-Diagramme für das Entfernen von der Oberfläche. In jedem Einzelversuch konnten in der Regel mehrere Abrißereignisse beobachtet werden, die als Lösen jeweils einer Cadherin-Cadherin-Bindung interpretiert wurden und aus

denen durch Extrapolation der ausgeübten Kraft gegen Null eine mittlere Dauer der Einzelmolekülbindung von $\tau_0 = 1.41$ s in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} berechnet werden konnte. Nach Depletion der Ca^{2+} -Ionen durch Zugabe von 5 mM EGTA wurden keine Bindungsereignisse mehr beobachtet.

Für schwache molekulare Interaktionen kann aus der Verzögerung der Elution der löslichen Komponente aus einer Gelchromatographiesäule, an der die zweite Komponente immobilisiert ist, die Dissoziationskonstante berechnet werden (Baumgartner & Drenckhahn, 2002). Nach kovalenter Immobilisierung des LI-Fc-Fusionsproteins an Sepharose wurde entweder lösliches LI-Fc-Fusionsprotein oder, als Kontrolle, ein analoges VE-Cadherin-Fc-Fusionsprotein in Anwesenheit oder Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen über die entsprechende Säule geschickt. Für die homotypische LI-Cadherin-Interaktion wurde aufgrund der verzögerten Elution in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} eine Dissoziationskonstante von 27 μM ermittelt.

Im nächsten Schritt wurde die Abhängigkeit der homotypischen Bindung von der Ca^{2+} -Konzentration sowohl wie oben beschrieben mittels AFM als auch durch die Messung der Bindung von LI-Fc-beschichtete Latex-Kügelchen an LI-Cadherin-exprimierende, stabil transfizierte CHO-Zellen bestimmt. Für die letztere Methode wurden das LI-Fc-Fusionsprotein gerichtet an Protein A-beschichtete, superparamagnetische Latex-Kügelchen (Dynabeads) mit einem Durchmesser von 2,8 μm gebunden und anschließend mit DMP (Dimethylpimelimidate) kovalent quervernetzt. Die Beads wurden den auf die adhären wachsenden Zellen aufgebracht und nach einer Bindungsphase von 15 min mit einer Laserpinzette (Laser Tweezer) mit definierter Intensität von den Zellen wegbewegt. Gemessen wurde unter mehreren Hundert Beads der relative Anteil derer, die sich mit der Laserpinzette nicht von den Zellen entfernen ließen. Bei beiden Methoden wurde ein hoch kooperativer Effekt der Ca^{2+} -Ionen auf das Bindungsverhalten gemessen, der sich in einem Hill Koeffizienten von $n_H = 12$ ausdrückte. Eine halbmaximale Bindung in beiden Fällen bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,7 mM erzielt.

Zur Analyse der durch die Bindung der Beads ausgelösten zellulären Veränderungen wurden homogene, diamagnetischen Latexkügelchen schließlich nach Beschichtung mit LI-Fc in analoger Weise für 90 min an LI-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen gebunden und anschließend die zelluläre Verteilung des plasmamembranständigen LI-Cadherins mit Antikörpern, die gegen die cytoplasmatische Domäne generiert worden waren, immunfluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß die Bindung von LI-Cadherin-beschi-

chteten Beads eine Konzentrierung des zellulären LI-Cadherins in dem Kontaktbereich induzierte, während dies bei Kontrollbeads, die mit Rinderserumalbumin beschichtet waren, nicht der Fall war.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß LI-Cadherin sowohl auf Einzelmolekül- als auch auf zellulärer Ebene eine homotypische Adhäsion vermittelt, die mit einer Dissoziationskonstante von $K_d = 27 \mu\text{M}$ etwas stärker ist als die des klassischen VE-Cadherins mit $K_d = 78 \mu\text{M}$ (Baumgartner et al., PNAS 2000). Dagegen deutet die im Vergleich zum klassischen N-Cadherin ($n_H = 2$, Baumgartner et al., 2003) sehr hohe Kooperativität der Ca^{2+} -Bindung ($n_H = 12$) und die halbmaximale Adhäsion bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,7 mM darauf hin, daß LI-Cadherin im Gegensatz zu klassischen Cadherinen innerhalb eines sehr engen Ca^{2+} -Konzentrationsbereichs von 0,6 bis 0,8 mM seine homotypische Bindungseigenschaft vollständig verliert und so bei einem Absinken der Ca^{2+} -Konzentration unter 0,6 mM einen Verlust der lateralen Adhäsion der Enterocyten in den Membranbereichen bewirken könnte, in denen vergleichsweise wenig E-Cadherin zu finden ist. Dieser Mechanismus könnte als eine mögliche Erklärung für die schon lange bekannte laterale Spaltbildung zwischen den Enterocyten während der Resorption großer Mengen hypotoner Flüssigkeiten (Naftalin & Tripathi, 1986) herangezogen werden. Erst weitere, aufwendige Experimente werden jedoch darüber Aufschluß geben können, ob diese Hypothese korrekt ist.

4.8 Genstruktur und phylogenetischer Ursprung des LI-Cadherins

(siehe beiliegende Publikation Nr. 18)

Phylogenetic origin of LI-cadherin revealed by protein and gene structure analysis. R. Jung, M.W. Wendeler, M. Danevad, H. Himmelbauer and R. Geßner, *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1157-66, 2004

Schon bei der initialen Analyse der Primärstruktur des LI-Cadherins stellte sich die Frage nach dem Ursprung der gegenüber den klassischen und desmosomalen Cadherinen überzähligen beiden Cadherin-Repeats. Ziel des hier beschriebenen Projektes war es, durch einen detaillierten Proteinsequenzvergleich und durch die Aufklärung der Genstruktur des LI-Cadherins eine Antwort auf diese Frage zu finden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die Proteinsequenz des murinen LI-Cadherins mit der des Ratten-LI-Cadherins und mehrerer klassischer Cadherine im Matrix-Plot verglichen. In dieser Darstellung bilden sich direkte Repeats als parallele Linien zu der Hauptdiagonalen ab, welche der primären Homologie der untersuchten Sequenzen entspricht. Dabei stellte sich heraus, daß zwar zum einen die Repeats EC1-5 der klassischen Cadherine homolog zu den Repeats EC3-7 des LI-Cadherins waren, zum anderen aber die ersten beiden Repeats der klassischen Cadherine (EC1-2) in gleichem Maße auch den Repeats EC1-2 des LI-Cadherins ähnelten. Vor diesem Hintergrund wurden die inzwischen strukturell genau definierten Sequenzbereiche aller Repeats (Shapiro et al., 1995; Boggon et al., 2002) des LI-Cadherins mit jedem einzelnen Repeat des E-Cadherins verglichen. Dabei wurde die initiale Vermutung bestätigt, daß die maximale Anzahl identischer Aminosäuren erreicht wird, wenn EC1-2 des LI-Cadherins mit EC1-2 des E-Cadherins und EC3-7 des LI-Cadherins mit EC1-5 des E-Cadherins verglichen werden. Dieses Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, daß das 7-Domänen-LI-Cadherin aus einem den klassischen Cadherinen verwandten 5-Domänen-Cadherin durch eine partielle Gen-duplikation entstanden ist.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das LI-Cadherin-Gen der Maus kloniert und analysiert. Das knapp 60 kb große Gen ist aus 18 Exons aufgebaut, von denen das erste keinen kodierenden Bereich enthält und durch ein langes Intron von knapp 10 kb von dem zweiten Exon getrennt ist. Die Intron-Exon-Grenzen decken sich, wie schon für andere Cadherin-Gene beschrieben (Ringwald et al., 1991; Hatta et al., 1991; Miyatani et al., 1992), nicht mit der

Domänenstruktur der abgeleiteten Proteinsequenz. Somit besitzt jeder einen Cadherin-Repeat kodierende cDNA-Bereich unterschiedlich lokalisierte Introns, die als Charakteristikum für den jeweiligen Repeat benutzt werden können. Wenn nun die cDNA-Sequenzen vom E-, P- und N-Cadherin der Maus (Ringwald et al., 1991; Hatta et al., 1991; Miyatani et al., 1992) ihrer maximalen Ähnlichkeit entsprechend übereinander angeordnet werden, fallen alle ihre Intron-Exon-Grenzen genau übereinander. Dies ist im Prinzip nicht verwunderlich, da die Positionen von Introns innerhalb der Phylogenie wesentlich stärker konserviert sind als die Sequenz eines Proteins. Ein weiteres Charakteristikum von Genstrukturen ist, daß Introns nur selten gelöscht werden, aber vergleichsweise häufig in bisher intronfreien Bereichen auftauchen.

Die Intron-Exon-Grenzen in der LI-Cadherin cDNA stimmen für den Bereich, der den Repeats 3-7 entspricht, perfekt mit denen der klassischen Cadherine für den Repeatbereich EC1-5 überein. Als einziger Unterschied findet sich im letzten der die extrazelluläre Domäne des LI-Cadherins kodierenden Exons beim LI-Cadherin ein zusätzliches Intron. Darüber hinaus stimmen bis auf eine Ausnahme auch alle Intron-Phasen (d.h. die relative Position der Introns innerhalb der kodierenden Triplets) im beschriebenen Bereich des LI-Cadherin-Gens mit denen der klassischen Cadherin-Gene überein. Der Genbereich des LI-Cadherins, der die beiden ersten Repeats (EC1-2) kodiert, paßt bezüglich seiner Intronpositionen und -phasen perfekt zu dem LI-Cadherin-Genbereich, der die beiden folgenden Repeats (EC3-4) kodiert und fast genauso perfekt zu dem cDNA-Bereich der klassischen Cadherine, der EC1-2 kodiert.

Somit konnte auf genomischer Ebene das aus dem Proteinstrukturvergleich abgeleitete Modell einer partiellen Genduplikation als Entstehungsmechanismus für die beiden zusätzlichen Cadherin-Repeats des LI-Cadherins bestätigt werden. Da die Fusion der beiden Genfragmente wahrscheinlich im Bereich des heutigen Exons 7 stattgefunden hat, wie sich aus einem detaillierten Sequenzvergleich dieser Region ableiten läßt, ist es naheliegend zu schließen, daß dabei die Ca^{2+} -Bindungsstellen in diesem Bereich partiell oder ganz zerstört wurden.

4.9 Adhäsive Funktion des Ksp-Cadherins

(siehe beiliegende Publikation Nr. 19)

Ksp-cadherin is a functional cell-cell adhesion molecule related to LI-cadherin. M.W. Wendeler, M. Praus, R. Jung, M. Hecking, C. Metzigg and R. Geßner, *Exp. Cell Res.* 294, 345-55, 2004

Das "Kidney-specific" Ksp-Cadherin wurde kurz nach dem LI-Cadherin zufällig bei der Suche nach einem $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter in der Kaninchenniere entdeckt (Thomson et al., 1995). Obwohl die Autoren erkannten, daß unter allen Cadherinen LI-Cadherin mit einer Aminosäuresequenzidentität von 29% dem Ksp-Cadherin am ähnlichsten war, führten sie nie einen detaillierten Vergleich beider Proteine durch.

Analysiert man jedoch die Primärstruktur beider Proteine genauer (Abb. 4.8), so stellt sich heraus, daß sie durch eine ganze Reihe von Gemeinsamkeiten verbunden sind, von denen die jeweils sieben extrazellulären Cadherin-Repeats und die nur 20-25 Aminosäuren lange cytoplasmatische Domäne am offensichtlichsten sind. Während beide Proteine ebenso wie die klassischen Cadherine in dem letzten Cadherin-Repeat je vier konservierte Cysteine besitzen, die intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Boggon et al., 2002), unterscheiden sie sich von den klassischen Cadherinen durch das Fehlen einer Prosequenz, durch die dysfunktionelle Ca^{2+} -Bindungsstelle zwischen dem 2. und 3. Cadherin-Repeat, durch die Präsenz von zwei konservierten Cysteinen im vierten Cadherin-Repeat und durch weitere gemeinsame Sequenzmotive.

Trotz dieser eher strukturbestimmenden gemeinsamen Merkmale von LI- und Ksp-Cadherin, beträgt ihre Aminosäuresequenzidentität nur knapp 30%. Im Gegensatz dazu teilen sich die klassischen Cadherine untereinander eine Sequenzidentität von etwa 50%. LI-Cadherin ist den klassischen Cadherinen mit 28% Sequenzidentität wesentlich ähnlicher als das Ksp-Cadherin mit 21%. Zwischen LI- und Ksp-Cadherin sind die Cadherin-Repeats EC2 und EC3 mit 37% sowie die Transmembrandomäne mit 58% besonders hoch und die letzten beiden Repeats EC6 und EC7 mit 24-25% besonders gering konserviert. Während innerhalb der klassischen Cadherine die cytoplasmatische Domäne am höchsten konserviert ist, liegt diese bei den 7D-Cadherinen genau im Mittelfeld.

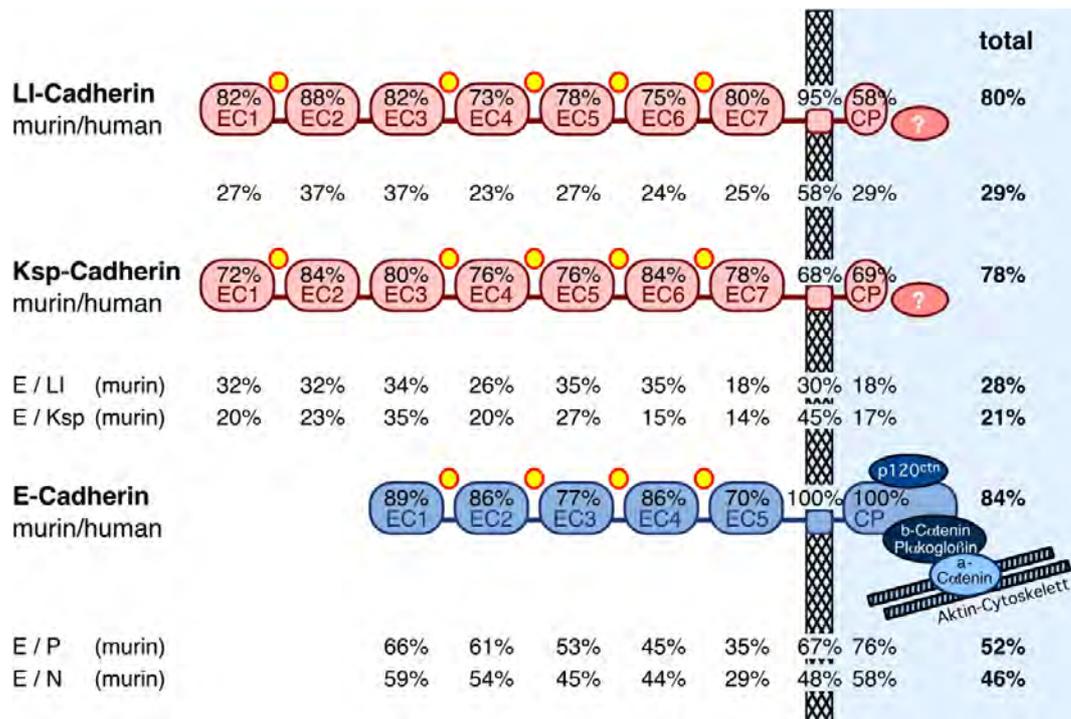


Abb. 4.8: Domänenspezifischer Vergleich der Proteinsequenzen von LI- und Ksp-Cadherin mit der des klassischen E-Cadherins. Die extrazellulären (links) Cadherin-Repeats (EC1-7) und die intrazellulären (rechts) cytoplasmatischen Domänen (CP) werden durch Ovale repräsentiert, deren Länge in etwa der relativen Länge der jeweiligen (Sub-)Domäne entspricht. In die Ovale ist neben der jeweiligen Domänen-Bezeichnung auch die interspezies-Aminosäuresequenzidentität (Mensch/Maus) eingezeichnet. Zwischen den schematischen Strukturzeichnungen von LI-, Ksp- und E-Cadherin ist die jeweilige Aminosäuresequenzidentität dieser paralogen Cadherine aufgeführt. Dabei werden EC3-7 von LI- und Ksp-Cadherin mit EC1-5 von E-Cadherin sowie EC1-2 von LI- und Ksp-Cadherin mit EC1-2 von E-Cadherin verglichen (siehe auch den folgenden Abschnitt 4.10). Zum besseren Verständnis sind zusätzlich im unteren Bildteil die Aminosäuresequenzidentitäten innerhalb der klassischen Cadherine (zwischen E- und P-Cadherin sowie E- und N-Cadherin) aufgeführt. Im rechten Bildteil sind die Aminosäuresequenzidentitäten für die Gesamtproteine (bzw. die korrespondierenden Teilbereiche) sowie die cytoplasmatischen Bindungspartner eingezeichnet. Zur Berechnung der Sequenzidentität wurden die entsprechenden Sequenzbereiche zunächst unter Einbeziehung der Position konservierter Aminosäuren relativ zueinander positioniert. Mit numerischen Programmen, die keine zusätzlichen Informationen berücksichtigen, werden je nach Algorithmus geringfügig unterschiedliche Werte ermittelt.

Die Beobachtung, daß sowohl LI- als auch Ksp-Cadherin in den basolateralen Bereichen von stark resorptiven Epithelien entodermalen Ursprungs (Darm und Nierentubuli) exprimiert werden, deutet darauf hin, daß beide strukturverwandten Proteine dort eine ähnliche Funktion ausüben. Dies zu überprüfen war Gegenstand der hier vorgestellten Publikation Nr. 19.

Zunächst wurde die cDNA des murinen Ksp-Cadherins mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer aus Mausnieren-RNA amplifiziert, in den Vektor pCR 2.1 ligiert, kloniert und vollständig sequenziert. Zum einen wurde der gesamte kodierende Bereich zur Herstellung eines eukaryonten Expressionsvektors verwendet und mit diesem ebenso wie mit analogen Maus-LI- und Maus-E-Cadherin-Expressionsvektoren stabil transfizierte CHO-Zellklone erzeugt (CHOmKsp, CHOmLI und CHOmE). Zum anderen wurde der für die ersten beiden Cadherin-Repeats (EC1-2) kodierende cDNA Bereich wie in Abschnitt 4.6 beschrieben in den *E. coli*-Expressionsvektor pHisTrx ligiert und mit dessen Hilfe das entsprechende mKsp-Cadherin-Fragment induziert und aufgereinigt, um damit mKsp-Cadherin-spezifische, polyklonale Antikörper im Kaninchen zu erzeugen. In gleicher Weise waren zuvor bereits Antikörper gegen das ebenfalls klonierte Maus-LI-Cadherin erzeugt worden (Angres et al., 2001).

Zunächst wurde unter Verwendung der polyklonalen Antikörper die nieren-spezifische Expression des Ksp-Cadherins in der Maus (Thomson et al., 1998) im Western Blot bestätigt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen, daß innerhalb der Niere das Protein, wie bereits zuvor für das Kaninchen gezeigt (Thomson et al., 1995; Thomson & Aronson, 1999), ausschließlich in den Nierentubulus-Epithelien exprimiert wird.

Für die stabil mKsp-Cadherin exprimierenden CHO-Zellen konnte gezeigt werden, daß Ksp-Cadherin ebenso wie LI-Cadherin im Gegensatz zu dem klassischen E-Cadherin keine stabile Bindung mit β -Catenin eingeht, aber dennoch im Gegensatz zu dem verwandten LI-Cadherin eine sehr geringe, aber reproduzierbare Erhöhung der zellulären β -Catenin-Menge bewirkt. Als mögliche Erklärung konnte eine Induktion möglicher endogener klassischer Cadherine, wie K-Cadherin, sowie eine induzierte Erhöhung der zellulären Aktin-Menge ausgeschlossen werden. Welche anderen, bislang unbekanntenen Mechanismen den beobachteten Effekt bewirkt haben können, wird sich möglicherweise die Zukunft zeigen.

Eindeutig konnte mit zwei verschiedenen Zellaggregationsassays erstmals nachgewiesen werden, daß Ksp-Cadherin ebenso wie LI-Cadherin eine Ca^{2+} -abhängige, durch spezifische Antikörper blockierbare Zell-Zelladhäsion bewirkt. Während der quantitative Effekt in beiden Assays mit der durch das klassische E-Cadherin bewirkten Zellaggregation vergleichbar war, zeigte sich auf zellulärer Ebene ein unterschiedliches Bild: In dem "Hanging-Drop-Assay", bei dem die zu untersuchenden Zellen ohne Kontakt zu einer soliden Oberfläche unter der

natürlichen Schwerkraft zusammengeführt werden, bilden Zellen, die eines der 7D-Cadherine exprimieren, nach 16 Stunden zwar ähnlich große Zellcluster wie E-Cadherin-exprimierende Zellen, aber die Zellcluster sind weniger regulär und bei weitem nicht so kompakt wie letztere.

Werden die transfizierten Zellen auf einer Glasoberfläche angezogen, so maximieren E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen bereits bei einer geringen Zelldichte ihre zellulären Kontakte, während Ksp- und LI-Cadherin-exprimierende Zellen unter dieser Bedingung noch weitgehend den untransfizierten CHO-Zellen gleichen. Werden die Zellen jedoch so lange kultiviert, bis sie einen durchgehenden Zellrasen ausgebildet haben, so nehmen die E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen den für sie typischen epithelialen Phänotyp an (Nagafuchi et al., 1987), der durch eine gleichmäßige Höhe aller Zellen charakterisiert ist und daher als Pflasterstein- oder Cobblestone-Muster bezeichnet wird. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie läßt sich zudem zeigen, daß das E-Cadherin nicht nur in den Zell-Zellkontakten stark angereichert ist, sondern dort eine punktförmige Verteilung annimmt, welche die Konzentrierung in Adherens Junctions widerspiegelt. Konfluent gewachsene Ksp- und LI-Cadherin-exprimierende Zellen maximieren zwar im Gegensatz zu untransfizierten Zellen ebenfalls ihre Zell-Zellkontakte, nehmen jedoch im Gegensatz zu den E-Cadherin-exprimierenden Zellen keinen idealen epithelialen Phänotyp an und zeigen in der Immunfluoreszenz eine gleichmäßige und keine punktförmige Konzentrierung von Ksp- und LI-Cadherin in den Zell-Zellkontakten. Daraus und aus der fehlenden Bindung an β -Catenin kann geschlossen werden, daß sie nicht in der Lage sind, die Bildung von Adherens Junctions zu induzieren.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, daß Ksp-Cadherin in transfizierten CHO-Zellen eine Zell-Zelladhäsion bewirkt, die dem von LI-Cadherin vermittelten Effekt quantitativ und qualitativ gleicht. Beide 7D-Cadherine induzierten zudem in CHO-Zellen eine spezifischen zellulären Phänotyp, der sich durch eine Maximierung der Zell-Zellkontakte unter konfluenten Bedingungen und eine Anreicherung der Cadherine in den Kontaktbereichen auszeichnet, sich aber wesentlich von dem durch das klassische E-Cadherin induzierten epithelialen Phänotyp unterscheidet. Hieraus kann geschlossen werden, daß 7D-Cadherine im Gegensatz zu klassischen Cadherinen alleine nicht in der Lage sind, einen epithelialen Phänotyp zu induzieren, aber infolge ihrer physiologischen Co-Expression mit E-Cadherin in Nierentubuli- (Ksp-Cadherin) und Darm-Epithelien (LI-Cadherin) dort möglicherweise einen modulierenden Effekt auf den zellulären Phänotyp ausüben.

4.10 Genomische Paralogie von LI- und Ksp-Cadherin

(siehe beiliegendes Manuskript Nr. 20)

Unique gene structure and paralogy define 7D-cadherin family. M.W. Wendeler, R. Jung, H. Himmelbauer and R. Geßner, submitted

Wie in Abschnitt 4.9 beschrieben, bilden LI- und Ksp-Cadherin nicht nur aufgrund ihrer homologen Primärstruktur, sondern auch aufgrund ihrer ähnlichen zellulären Eigenschaften eine gemeinsame Cadherin-Familie, die von uns als 7D-Cadherin-Familie bezeichnet wurde (Abb. 4.1). Um in Analogie zu der in Abschnitt 4.8 beschriebenen Analyse der LI-Cadherin-Genstruktur Einblicke in den phylogenetischen Ursprung der 7D-Cadherine gewinnen zu können, wurde in der hier beschriebenen Arbeit das Ksp-Cadherin-Gen der Maus kloniert, vollständig sequenziert und sowohl im Hinblick auf seine Struktur als auch auf seine chromosomale Umgebung mit dem LI-Cadherin-Gen verglichen.

Obwohl das Ksp-Cadherin-Gen mit gut 10 kb Länge nur 17% der Größe des LI-Cadherin-Gens besitzt, ist die Anzahl der Introns sowie deren relative Positionen und ihre Phasen vollständig konserviert. Die Länge der kodierenden Exons (bzw. des kodierenden Bereichs beim Exon 2 und 18) unterscheidet sich nur geringfügig und immer um ein Vielfaches von drei; es gibt somit nur Unterschiede in der Anzahl der Aminosäuren, aber keine Verschiebung des Leserasters oder der Intronphasen. Der maximale Längenunterschied eines Exons entspricht 7 Aminosäuren; der überwiegende Teil der Exons (70%) unterscheidet sich maximal um eine Aminosäure in der Länge. Die Gesamtlänge des kodierenden Bereichs beider Gene und damit die Länge des Proteins ist erstaunlich ähnlich: 830 Aminosäuren beim Ksp- und 828 beim LI-Cadherin. Daraus folgt, daß der Größenunterschied der beiden Gene ausschließlich auf die wesentlich größeren Introns des LI-Cadherin-Gens zurückzuführen ist: Während das größte Intron des LI-Cadherin-Gens über 10 kb groß ist, mißt das größte Intron des Ksp-Cadherin-Gens gerade einmal 1423 bp. Die Untergrenze der Introns ist dagegen weniger variabel und beträgt 95 bp (LI-Cadherin) bzw. 69 bp (Ksp-Cadherin).

Trotz ihrer eindeutigen Homologie befinden sich beide Gene auf unterschiedlichen Chromosomen: Ksp-Cadherin gemeinsam mit den meisten klassischen Cadherinen in einem Cluster auf dem Maus-Chromosom 8 und LI-Cadherin isoliert auf dem Maus-Chromosom 4. Eine genauere Analyse der chromosomalen Umgebung beider Gene ergab jedoch, daß sich in ihrer Nachbarschaft eine Reihe paraloger Genpaare befinden, wie die der Ca^{2+} -bindenden

Proteine Calb2 und Calb1, der ras-ähnlichen GTPasen Rrad1 und Gem, der Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen Pdb2 und Pdb1, der Matrix-Metalloproteinasen Mmp15 und Mmp16, der Carboanhydrasen Car7 und Car8, der Cyclin D-verwandten Proteine Cbfa2t3h und Cbfa2t1h, der ATPase-Untereinheiten Arp6v0d1 und Arp6v0d2 sowie eine Reihe weiterer, weniger gut charakterisierter Genpaare. Die gleiche Paralogie findet sich auch im Genom der Ratte und des Menschen, wobei bereits zwischen den nahe verwandten Nagetieren Maus und Ratte Inversionen einzelner Genabschnitte zu beobachten sind. Aus dieser Beobachtung kann mit hoher Sicherheit geschlossen werden, daß der gesamte untersuchte paraloge Bereich zu einem frühen Zeitpunkt der phylogenetischen Entwicklung der Vertebraten dupliziert wurde, entweder als chromosomaler Abschnitt oder durch eine Chromosomenduplikation oder aber durch eine Duplikation des gesamten Genoms (Ohno, COGD, 1993; Panopoulou et al., Genome Res, 2003). In der Folge haben sich die Gene in den paralogenen Bereichen unabhängig voneinander weiterentwickelt und dabei unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Organen übernommen.

Für einige andere Cadherin-Gene, die in analoger Weise untersucht wurden (Cdh2, Cdh6, Cdh10 und Cdh15), ließen sich keine vergleichbaren Paralogien finden. In der Nachbarschaft des Ksp-Cadherins befinden sich sechs Gene klassischer Cadherine, Cdh1 (E-Cadherin), Cdh3 (P-Cadherin), Cdh5 (VE-Cadherin, Cdh8, Cdh11 (OB-Cadherin) und Cdh 15 (M-Cadherin), sowie das Gen (Cdh13) des GPI-verankerten T-Cadherins. Diese Lokalisation von Cadherin-Genen läßt vermuten, daß sie alle durch sukzessive Genduplikationen entstanden sind und in der Folge unterschiedliche Funktionen im Organismus übernommen haben. Für die in direkter Nachbarschaft zueinander liegenden Gene des E- und P-Cadherins wurde eine derartige Entstehung bereits zuvor vermutet (Hatta et al., 1991; Bussemakers et al., 1994). Für die anderen klassischen Gene ist eine analoge Entstehung ebenfalls sehr wahrscheinlich und das auf eine extrazelluläre Domäne reduzierte T-Cadherin dürfte aufgrund seiner strukturellen Homologie zur extrazellulären Domäne der klassischen Cadherine entweder durch eine partielle Genduplikation oder eine vollständige Duplikation und eine spätere Deletion des 3'-Bereiches entstanden sein.

Um die Phylogenie der 7D-Cadherine besser zu verstehen, wurden die orthologen Gene von Ksp- und LI-Cadherin in den weitgehend entschlüsselten Genomen des Zebrafischs (*Danio rerio*) und der beiden Pufferfisch-Spezies *Takifugu rubripes* und *Tetraodon fluviatilis* identifiziert und in die phylogenetische Analyse mit einbezogen. Während das LI-Cadherin-Gen des Zebrafischs bereits vor einigen Jahren zufällig gefunden und im Hinblick auf sein Expressions-

muster und seine Funktion in der Embryogenese untersucht worden war (Horsfield et al., 2002), waren die anderen fünf Gene bislang nicht zugeordnet. In analoger Weise konnten in den drei Fischarten auch die orthologen Gene der Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen Pdb1 und Pdb2, der Ca^{2+} -bindenden Proteine Calb2 und Calb1, und der ras-ähnlichen GTPasen Rrad1 und Gem entdeckt werden. Da sich Zebra- und Pufferfische bereits vor etwa 120-150 Millionen Jahren, zum Zeitpunkt der Aufspaltung der modernen Knochenfische getrennt haben, muß die Duplikation des paralogen Bereichs zu einem noch früheren Zeitpunkt stattgefunden haben.

Aus diesen Ergebnissen und den im Abschnitt 4.8 beschriebenen Resultaten der Analyse des LI-Cadherin-Gens läßt sich folgendes Modell der Entstehung der klassischen und 7D-Cadherine aufstellen (Abb. 4.9): Zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklung der Vertebraten aus einem (5D-) Cadherin mit 5 extrazellulären Cadherin-Repeats, möglicherweise dem Vorläufer des heutigen E-Cadherins, durch eine vollständige und eine anschließende partielle Genduplikation ein erstes Cadherin mit 7 extrazellulären Cadherin-Repeats, das erste 7D-Cadherin. Bevor sich die Landvertebraten von den Knochenfischen abtrennten, muß eine Duplikation des chromosomalen Bereichs erfolgt sein, der mindestens die Gene des ursprünglichen 5D-Cadherins sowie des ersten 7D-Cadherins und aller anderen oben beschriebenen, heute paralogenen Proteine umfaßte. Auf dem chromosomalen Segment, das sich im heutigen Maus-Chromosom 8 befindet, sind durch mehrfache Genduplikation weitere klassische Cadherine und das T-Cadherin entstanden. Außerdem sind wahrscheinlich mehrere dergestalt erzeugte Gene klassischer Cadherine durch Translokationen in andere chromosomale Umgebungen gelangt, in denen sie sich noch heute befinden, wie z.B. Cdh2 (N-Cadherin) auf dem Maus-Chromosom 18 und Cdh6, Cdh10 und Cdh 12 auf dem Maus-Chromosom 15. Auf dem paralogenen chromosomalen Segment, das sich im heutigen Maus-Chromosom 4 befindet, muß dagegen das ursprünglich ebenfalls duplizierte 5D-Cadherin deletiert worden sein, da sich dort nur das isolierte LI-Cadherin-Gen und kein einziges klassisches Cadherin befindet.

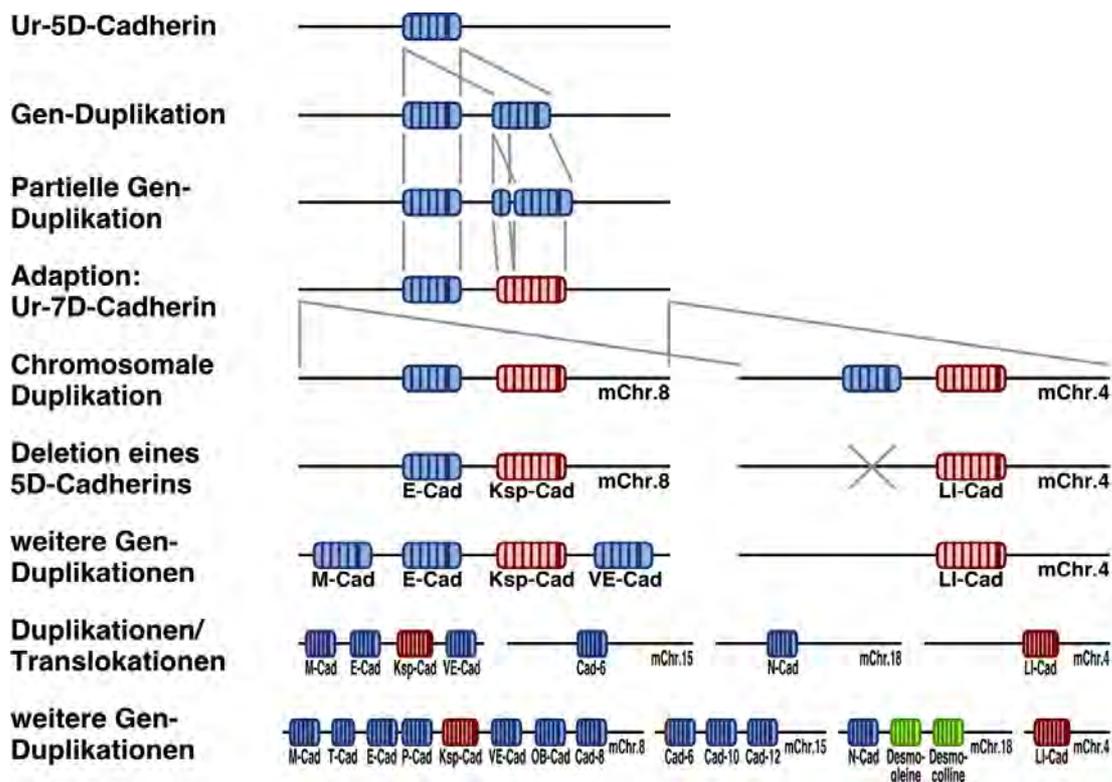


Abb. 4.9: Evolution der 7D-Cadherin-Gene. Die Cadherin-Gene sind symbolisch durch farbige Ovale (blau: klassische Cadherine, rot: 7D-Cadherine, grün: desmosomale Cadherine) dargestellt, innerhalb derer die einzelnen Cadherin-Repeats durch vertikale Striche voneinander abgetrennt und die Transmembrandomänen durch einen besonders dicken vertikalen Strich markiert sind. Auf eine graphische Darstellung der Exons wurde aus Vereinfachungsgründen verzichtet. Während der obere Bereich bis zur Duplikation des ursprünglichen 7D-Cadherin-Gens durch die eigenen Arbeiten unterstützt wird und vor der Abtrennung der Landvertebraten stattgefunden haben muß, sind die weiteren Schritte noch spekulativer Natur. In der untersten Zeile ist die Verteilung von Cadherin-Genen auf den Chromosomen 4, 8, 15 und 18 der Maus angedeutet; auf diese heutige chromosomale Zuordnung beziehen sich die Angaben in den darüberliegenden Zeilen.

Gleichzeitig spricht die Beobachtung, daß nur in der Umgebung des Ksp-Cadherin-Gens auf dem Maus-Chromosom 8 weitere Cadherin-Gene lokalisiert sind, für die Annahme, daß die Expansion der 5D-Cadherine erst nach der Trennung von LI- und Ksp-Cadherin erfolgte, weil ansonsten in der Umgebung des LI-Cadherins gleich mehrere 5D-Cadherin-Gene vollständig deletiert worden sein müssen, während gleichzeitig mehrere zwischen diesen liegende, in der heutigen Paralogie noch vorhandene andere Gene erhalten geblieben sein müssen. Eine derartige selektive Deletion mehrerer Cadherin-Gene unter Erhalt der meisten in der Nachbarschaft liegenden anderen Gene erscheint äußerst unwahrscheinlich.

5. Referenzen

1. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M: Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 940-59, 2001
2. Aisen P: Molecules in focus: Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2137-43, 2004
3. Alvarez E, Girones N, Davis RJ: Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid. *J Biol Chem* 265, 16644-55, 1990
4. Anderson AC, O'Neil RH, Filman DJ, Frederick CA: Crystal structure of a brominated RNA helix with four mismatched base pairs: An investigation into RNA conformational variability. *Biochemistry* 38, 12577-85, 1999
5. Angres B, Kim L, Jung R, Geßner R, Tauber R: LI-cadherin gene expression during intestinal development. *Dev Dynam* 221, 182-93, 2001
6. Åsberg A, Hveem K, Thorstensen K, Ellekjaer E, Kannelønning K, Fjøsne U, Halvorsen TB, Smethurst HBG, Sagen E, Bjerve KS: Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 36, 1108-15, 2001
7. Avery OT, MacLeod CM, McCarthy M: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 79, 747-8, 1944
8. Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH: Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterol* 116, 193-207, 1999
9. Bai Y, Pontoglio M, Hiesberger T, Sinclair AM, Igarashi P: Regulation of the Kidney-Specific Ksp-Cadherin Gene Promoter by Hepatocyte Nuclear Factor-1 β (HNF-1 β). *Am J Physiol* 2002
10. Bancroft D, Williams LD, Rich A, Egli M: The low-temperature crystal structure of the pure-spermine form of Z-DNA reveals binding of a spermine molecule in the minor groove. *Biochemistry* 33, 1073-86, 1994
11. Baumgartner W, Drenckhahn D: Plasmalemmal concentration and affinity of mouse vascular endothelial cadherin, VE-cadherin. *Eur Biophys J* 31, 532-8, 2002
12. Baumgartner W, Golenhofen N, Grundhofer N, Wiegand J, Drenckhahn D: Ca²⁺ dependency of N-cadherin function probed by laser tweezer and atomic force microscopy. *J Neurosci* 23, 11008-14, 2003
13. Behe M, Felsenfeld G: Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B-Z transition in poly(dG-m⁵dC)-poly(dG-m⁵dC). *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 1619-23, 1981
14. Behrens J, Birchmeier W, Goodman SL, Imhof BA: Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol* 101, 1307-15, 1985
15. Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W: Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108, 2435-47, 1989

16. Behrens J, Weidner KM, Frixen UH, Schipper JH, Sachs M, Arakaki N, Daikuhara Y, Birchmeier W: The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility. *EXS* 59, 109-26, 1991
17. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-42, 1996
18. Bennett MJ, Lebron JA, Bjorkman PJ: Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 403, 46-53, 2000
19. Berx G, Nollet F, van Roy F: Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun* 6, 171-84, 1998
20. Birchmeier W, Behrens J: Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26, 1994
21. Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L: C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308-13, 2002
22. Borhani DW, Harrison SC: Crystallization and X-ray diffraction studies of a soluble form of the human transferrin receptor. *J Mol Biol* 218, 685-9, 1991
23. Bracke ME, Charlier C, Bruyneel EA, Labit C, Mareel MM, Castronovo V: Tamoxifen restores the E-cadherin function in human breast cancer MCF-7/6 cells and suppresses their invasive phenotype. *Cancer Res* 54, 4607-9, 1994
24. Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM: The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 213, 123-61, 1996
25. Brennan RG, Sundaralingam M: Crystallization and preliminary crystallographic studies of the decadeoxyoligonucleotide d(CpGpTpApCpGpTpApCpG). *J Mol Biol* 181, 561-3, 1985
26. Brown PJ, Molloy CM, Johnson PM: Transferrin receptor affinity and iron transport in the human placenta. *Placenta* 3, 21-8, 1982
27. Burdsal CA, Damsky CH, Pedersen RA: The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development* 118, 829-44, 1993
28. Cairo G, Pietrangelo A: Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J* 352, 241-50, 2000
29. Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD, Harford: Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 240, 924-8, 1988
30. Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM, Gumbiner BM: Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol* 154, 231-43, 2001
31. Chargaff E: Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* 6, 201-9, 1950
32. Charlier C, Bruyneel E, Lechanteur C, Bracke M, Mareel M, Castronovo V: Enhancement of tamoxifen-induced E-cadherin function by Ca²⁺ channel antagonists in human breast cancer MCF7/6 cells. *Eur J Pharmacol* 317, 413-6, 1996

33. Chattopadhyaya R, Ikuta S, Grzeskowiak K, Dickerson RE: X-ray structure of a DNA hairpin molecule. *Nature* 334, 175-9, 1988
34. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T: Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 116, 565-76, 2004
35. Chitambar CR, Massey EJ, Seligman PA: Regulation of transferrin receptor expression on human leukemic cells during proliferation and induction of differentiation. Effects of gallium and dimethylsulfoxide. *J Clin Invest* 72, 1314-25, 1983
36. Chitambar CR, Zivkovic Z: Release of soluble transferrin receptor from the surface of human leukemic HL60 cells. *Blood* 74, 602-8, 1989
37. Chiu TK, Dickerson RE: 1 A crystal structures of B-DNA reveal sequence-specific binding and groove-specific bending of DNA by magnesium and calcium. *J Mol Biol* 301, 915-45, 2000
38. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A: The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109, 987-91, 2002
39. Crick FHC, Watson JD: The complementary structure of deoxyribonucleic acid. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* A223, 80-96, 1954
40. Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA: Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 34, 455-66, 1983
41. Davis RJ, Johnson GL, Kelleher DJ, Anderson JK, Mole JE, Czech MP: Identification of serine 24 as the unique site on the transferrin receptor phosphorylated by protein kinase C. *J Biol Chem* 261, 9034-41, 1986
42. Do SI, Enns C, Cummings RD: Human transferrin receptor contains O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 265, 114-25, 1990
43. Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM, Hart IR: E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 142, 981-6, 1993
44. Dorudi S, Hanby AM, Poulson R, Northover J, Hart IR: Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *Br J Cancer* 71, 614-6, 1995
45. Edelman GM, BA Murray, RM Mege, BA Cunningham, WJ Gallin: Cellular expression of liver and neural cell adhesion molecules after transfection with their cDNAs results in specific cell-cell binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8502-6, 1987
46. Egli M, Williams LD, Gao Q, Rich A: Structure of the pure-spermine form of Z-DNA (magnesium free) at 1-Å resolution. *Biochemistry* 30, 11388-402, 1991
47. Ellison MJ, Kelleher RJ 3rd, Wang AH, Habener JF, Rich A: Sequence-dependent energetics of the B-Z transition in supercoiled DNA containing nonalternating purine-pyrimidine sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 8320-4, 1985
48. Evans P, Kemp J: Exon/intron structure of the human transferrin receptor gene. *Gene* 199, 123-31, 1997
49. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Wolff RK, et al.: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13, 399-408, 1996

50. Feelders RA, Kuiper-Kramer EP, van Eijk HG: Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med* 37, 1-10, 1999
51. Franklin RE, Gosling RG: Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171, 740-1, 1953
52. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113, 173-85, 1991
53. Fujii S, Wang AH, Quigley GJ, Westerink H, Van der Marel G, Van Boom JH, Rich A: The octamers d(CGCGCGCG) and d(CGCATGCG) both crystallize as Z-DNA in the same hexagonal lattice. *Biopolymers* 24, 243-50, 1985
54. Fukata M, Kaibuchi K: Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 887-97, 2001
55. Furberg S: On the structure of nucleic acids. *Acta Chem Scand* 6, 634-40, 1952
56. Gallin WJ, Sorkin BC, Edelman GM, Cunningham BA: Sequence analysis of a cDNA clone encoding the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2808-12, 1987
57. Goding JW, Burns GF: Monoclonal antibody OKT-9 recognizes the receptor for transferrin on human acute lymphocytic leukemia cells. *J Immunol*, 127, 1256-8, 1981
58. Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D: VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 110, 583-8, 1997
59. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE: E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392, 402-5, 1998
60. Haasnoot CA, de Bruin SH, Berendsen RG, Janssen HG, Binnendijk TJ, Hilbers CW, van der Marel GA, van Boom JH: Structure, kinetics and thermodynamics of DNA hairpin fragments in solution. *J Biomol Struct Dyn* 1, 115-29, 1983
61. Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80, 1983
62. Haniford DB, Pulleyblank DE: Facile transition of poly[d(TG) x d(CA)] into a left-handed helix in physiological conditions. *Nature* 302, 632-4, 1983
63. Hatta K, Takeichi M: Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* 320, 447-9, 1986
64. Hatta M, Miyatani S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M: Genomic organization and chromosomal mapping of the mouse P-cadherin gene. *Nucleic Acids Res* 19, 4437-41, 1991
65. Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H: Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res* 62, 233-40, 2002
66. Holbrook SR, Wang AH, Rich A, Kim SH: Local mobility of nucleic acids as determined from crystallographic data. II. Z-form DNA. *J Mol Biol* 187, 429-40, 1986

67. Hopkins CR, Gibson A, Shipman M, Strickland DK, Trowbridge IS: In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella. *J Cell Biol* 125, 1265-74, 1994
68. Horsfield J, Ramachandran A, Reuter K, LaVallie E, Collins-Racie L, Crosier K, Crosier P: Cadherin-17 is required to maintain pronephric duct integrity during zebrafish development. *Mech Dev* 115, 15-26, 2002
69. Hu HY, Aisen P: Molecular characteristics of the transferrin-receptor complex of the rabbit reticulocyte. *J Supramol Struct* 8, 349-60, 1978
70. Huber AH, Weis WI: The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105, 391-402, 2001
71. Hunt RC, Riegler R, Davis AA: Changes in glycosylation alter the affinity of the human transferrin receptor for its ligand. *J Biol Chem*, 264, 9643-8, 1989
72. Igarashi P, Shashikant CS, Thomson RB, Whyte DA, Liu-Chen S, Ruddle FH, Aronson PS: Ksp-cadherin gene promoter. II. Kidney-specific activity in transgenic mice. *Am J Physiol* 277, F599-F610, 1999
73. Imhof BA, Vollmers HP, Goodman SL, Birchmeier W: Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* 35, 667-75, 1983
74. Jandl JH, Katz JH: The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J Clin Invest* 42, 314-26, 1963
75. Jing SQ, Spencer T, Miller K, Hopkins C, Trowbridge IS: Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. *J Cell Biol*, 110, 283-94, 1990
76. Jing SQ, Trowbridge IS: Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site. *EMBO J* 6, 327-31, 1987
77. Johnstone RM, Mathew A, Mason AB, Teng K: Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol* 147, 27-36, 1991
78. Juliano RL: Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 283-323, 2002
79. Kammerer RA, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Fischer D, Engel J: Tenascin-C hexabrachion assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices. *J Biol Chem* 273, 10602-8, 1998
80. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP: Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 274, 20826-32, 1999
81. Kemler R, Babinet C, Eisen H, Jacob F: Surface antigen in early differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 4449-52, 1977
82. Kemler R, Ozawa M, Ringwald M: Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1, 892-7, 1989
83. Kennard O: Structural studies of DNA fragments: the G·T wobble base pair in A, B and Z DNA; the G·A base pair in B-DNA. *J Biomol Struct Dyn* 3, 205-26, 1985

84. Ko S, Chu KM, Luk JM, Wong BW, Yuen ST, Leung SY, Wong J: Overexpression of LI-cadherin in gastric cancer is associated with lymph node metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 562-8, 2004
85. Koch AW, Pokutta S, Lustig A, Engel J: Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry* 36, 7697-705, 1997
86. Lawrence CM, Ray S, Babyonyshev M, Galluser R, Borhani DW, Harrison SC: Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* 286, 779-82, 1999
87. Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, Bjorkman PJ: Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 93, 111-23, 1998
88. Lebron JA, West AP Jr, Bjorkman PJ: The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol*, 294, 239-45, 1999
89. Leckband D, Sivasankar S: Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 12, 587-92, 2000
90. Leckband D: The structure of the C-cadherin ectodomain resolved. *Structure* 10, 739-40, 2002
91. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC: Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 21, 396-9, 1999
92. Liliom K, Orosz F, Horvath L, Ovadi J: Quantitative evaluation of indirect ELISA. Effect of calmodulin antagonists on antibody binding to calmodulin. *J Immunol Methods* 143, 119-25, 1991
93. Loch N: Immunchemische Charakterisierung, Biosynthese und Abbau von Plasmamembranglycoproteinen der Rattenleber. Doktorarbeit: Freie Universität Berlin, 1992
94. Malope BI, MacPhail AP, Alberts M, Hiss DC: The ratio of serum transferrin receptor and serum ferritin in the diagnosis of iron status. *Br J Haematol* 115, 84-9, 2001
95. Mattman A, Huntsman D, Lockitch G, Langlois S, Buskard N, Ralston D, Butterfield Y, Rodrigues P, Jones S, Porto G, Marra M, De Sousa M, Vatcher G: Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation. *Blood* 100, 1075-7, 2002
96. McClelland A, Kuhn LC, Ruddle FH: The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* 39, 267-74, 1984
97. McNeill H, Ozawa M, Kemler R, Nelson WJ: Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 62, 309-16, 1990
98. Mercier B, Mura C, Ferec C: Putting a hold on 'HLA-H'. *Nat Genet* 15, 234, 1997
99. Miescher F: Über die chemische Zusammensetzung des Eiters. *Med chem Unt* 4, 441-60, 1871
100. Miyatani S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M: Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse N-cadherin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8443-7, 1992
101. Morris HP, Criss WE: Morris hepatomas: Mechanisms of regulation. Plenum Press, New York, London, 1978

102. Müller HA, Kuhl M, Finnemann S, Schneider S, van der Poel SZ, Hausen P, Wedlich D: Xenopus cadherins: the maternal pool comprises distinguishable members of the family. *Mech Dev* 47, 213-23, 1994
103. Müller S, Diederichs K, Breed J, Kissmehl R, Hauser K, Plattner H, Welte W: Crystal structure analysis of the exocytosis-sensitive phosphoprotein, pp63/parafusin (phosphoglucomutase), from *Paramecium* reveals significant conformational variability. *J Mol Biol* 315, 141-53, 2002
104. Müller SA, Engel A: Structure and mass analysis by scanning transmission electron microscopy. *Micron* 32, 21-31, 2001
105. Naftalin RJ, Tripathi S: The roles of paracellular and transcellular pathways and submucosal space in isotonic water absorption by rabbit ileum. *J Physiol* 370, 409-32, 1986
106. Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M: Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 329, 341-3, 1987
107. Nagafuchi A, Takeichi M: Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 7, 3679-84, 1988
108. Nagafuchi A, Takeichi M: Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul* 1, 37-44, 1989
109. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM: Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380, 360-4, 1996
110. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Siritto M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4596-601, 2002
111. Niessen CM, Gumbiner BM: Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol* 156, 389-399, 2002
112. Nordheim A, Rich A: The sequence (dC-dA)_n·(dG-dT)_n forms left-handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 1821-5, 1983
113. Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M: Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *EMBO J* 6, 3655-61, 1987
114. Nose A, Tsuji K, Takeichi M: Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61, 147-55, 1990
115. Omary MB, Trowbridge IS: Covalent binding of fatty acid to the transferrin receptor in cultured human cells. *J Biol Chem* 256, 4715-8, 1981
116. Orberger G, Geyer R, Stirn S, Tauber R: Structure of the N-linked oligosaccharides of the human transferrin receptor. *Eur J Biochem* 205, 257-67, 1992
117. Orlova EV, Saibil HR: Structure determination of macromolecular assemblies by single-particle analysis of cryo-electron micrographs. *Curr Opin Struct Biol* 14, 584-90, 2004
118. Ottiger M, Zerbe O, Guntert P, Wüthrich K: The NMR solution conformation of unligated human cyclophilin A. *J Mol Biol* 272, 64-81, 1997
119. Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M: Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267, 386-9, 1995

120. Owen D, Kuhn LC: Noncoding 3' sequences of the transferrin receptor gene are required for mRNA regulation by iron. *EMBO J* 6, 1287-93, 1987
121. Ozawa M, Baribault H, Kemler R: The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8, 1711-7, 1989
122. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R: Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4246-50, 1990a
123. Ozawa M, Engel J, Kemler R: Single amino acid substitutions in one Ca^{2+} binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* 63, 1033-8, 1990b
124. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Sly WS: Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13198-202, 1997
125. Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L: Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* 13, 690-8, 2003
126. Pauling L, Corey RB, A proposed structure for the nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 39, 84-97, 1953
127. Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J: A new crystal structure, Ca^{2+} dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* 18, 1738-47, 1999
128. Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F: Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 6274-7, 1983
129. Philpott CC: Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology* 35, 993-1001, 2002
130. Pohl FM, Jovin T: Kinetik einer Ionenstärke-abhängigen Strukturänderung von synthetischer Desoxyribonukleinsäure. *Z physiol Chem* 351, 124, 1970
131. Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J: Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 223, 1019-26, 1994
132. Prive GG, Yanagi K, Dickerson RE: Structure of the B-DNA decamer C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and comparison with isomorphous decamers C-C-A-A-G-A-T-T-G-G and C-C-A-G-G-C-C-T-G-G. *J Mol Biol* 217, 177-99, 1991
133. R'zik S, Beguin Y: Serum soluble transferrin receptor concentration is an accurate estimate of the mass of tissue receptors. *Exp Hematol* 29, 677-85, 2001
134. Ringwald M, Schuh R, Vestweber D, Eistetter H, Lottspeich F, Engel J, Dolz R, Jahnig F, Epplen J, Mayer S, Muller C, Kemler R: The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca^{2+} -dependent cell adhesion. *EMBO J* 6, 3647-53, 1987
135. Ringwald M, Baribault H, Schmidt C, Kemler R: The structure of the gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Nucleic Acids Res* 19, 6533-9, 1991
136. Roetto A, Daraio F, Porporato P, Caruso R, Cox TM, Cazzola M, Gasparini P, Piperno A, Camaschella C: Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R). *Blood* 103, 2407-9, 2004

137. Rosenberg JM, Seeman NC, Day RO, Rich A: RNA double-helical fragments at atomic resolution. II. The crystal structure of sodium guanylyl-3',5'-cytidine nonahydrate. *J Mol Biol* 104, 145-67, 1976
138. Ross KL, Eisenstein RS: Iron deficiency decreases mitochondrial aconitase abundance and citrate concentration without affecting tricarboxylic acid cycle capacity in rat liver. *J Nutr* 132, 643-51, 2002
139. Rutledge EA, Enns CA: Cleavage of the transferrin receptor is influenced by the composition of the O-linked carbohydrate at position 104. *J Cell Physiol* 168, 284-93, 1996
140. Sampietro M, Cairo G, Piperno A, Fargion S, Bardella L, Schiaffonati L, Fiorelli G: Analysis of the genes for transferrin, transferrin receptor as well as H and L subunits of ferritin in idiopathic hemochromatosis. *Ric Clin Lab* 17, 209-14, 1987
141. Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51, 660-72, 1949
142. Schuurman HJ, van Wichen D, de Weger RA: Expression of activation antigens on thymocytes in the 'common thymocyte' stage of differentiation. *Thymus*, 14, 43-53, 1989
143. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA: Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327-37, 1995
144. Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Flowers CH, Skikne BS, Cook JD: Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J Biol Chem* 265, 19077-81, 1990
145. Sivasankar S, Gumbiner B, Leckband D: Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J* 80, 1758-68, 2001
146. Soumpasis DM, Robert-Nicoud M, Jovin TM: B-Z DNA conformational transition in 1:1 electrolytes: dependence upon counterion size. *FEBS Lett* 213, 341-4, 1987
147. Taboury JA, Adam S, Taillandier E, Neumann JM, Tran-Dinh S, Huynh-Dinh T, Langlois d'Estaintot B: The B-Z transition in two synthetic oligonucleotides: d(C-2-amino-ACGTG) and d(m⁵CGCAm⁵CGTGCG) studied by IR, NMR and CD spectroscopies. *Nucleic Acids Res* 12, 6291-305, 1984
148. Takamura M, Sakamoto M, Ino Y, Shimamura T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S: Expression of liver-intestine cadherin and its possible interaction with galectin-3 in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Sci* 94, 425-30, 2003
149. Takamura M, Ichida T, Matsuda Y, Kobayashi M, Yamagiwa S, Genda T, Shioji K, Hashimoto S, Nomoto M, Hatakeyama K, Ajioka Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Aoyagi Y: Reduced expression of liver-intestine cadherin is associated with progression and lymph node metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 212, 253-9, 2004
150. Takeichi M: Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75, 464-74, 1977
151. Takeichi M: The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102, 639-55, 1988
152. Tasic B, Nabholz CE, Baldwin KK, Kim Y, Rueckert EH, Ribich SA, Cramer P, Wu Q, Axel R, Maniatis T: Promoter choice determines splice site selection in protocadherin a and g pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 10, 21-33, 2002

153. Terng HJ, Gessner R, Fuchs H, Stahl U, Lang C: Human transferrin receptor is active and plasma membrane-targeted in yeast. *FEMS Microbiol Lett* 160, 1-7, 1998
154. Theil EC: Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem* 265, 4771-4, 1990
155. Thomas TJ, Bloomfield VA: Chain flexibility and hydrodynamics of the B and Z forms of poly(dG-dC)·poly(dG-dC). *Nucleic Acids Res* 11, 1919-30, 1983
156. Thomson RB, Igarashi P, Biemesderfer D, Kim R, Abu-Alfa A, Soleimani M, Aronson PS: Isolation and cDNA cloning of Ksp-cadherin, a novel kidney-specific member of the cadherin multigene family. *J Biol Chem* 270, 17594-601, 1995
157. Thomson RB, Ward DC, Quaggin SE, Igarashi P, Muckler ZE, Aronson, PS: cDNA cloning and chromosomal localization of the human and mouse isoforms of Ksp-cadherin. *Genomics* 51, 445-51, 1998
158. Thomson RB, Aronson, PS: Immunolocalization of Ksp-cadherin in the adult and developing rabbit kidney. *Am J Physiol* 277, F146-F156, 1999
159. Tong X, Kawabata H, Koeffler HP: Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level. *Br J Haematol* 116, 458-64, 2002
160. Troyanovsky RB, Sokolov E, Troyanovsky SM: Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface. *Mol Cell Biol* 23, 7965-72, 2003
161. Turkewitz AP, Amatruda JF, Borhani D, Harrison SC, Schwartz AL: A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extra-cellular fragment. *J Biol Chem* 263, 8318-25, 1988
162. Vestweber D, Kemler R: Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. *Exp Cell Res* 152, 169-78, 1984
163. Vorlickova M, Kypr J, Stokrova S, Sponar J: A Z-like form of poly(dA-dC)·poly(dG-dT) in solution? *Nucleic Acids Res* 10, 1071-80, 1982
164. Walters JM, Watt DW, Stevens FM, McCarthy CF: HLA antigens in haemochromatosis. *Br Med J* 4(5995), 520, 1975
165. Wang AHJ, Quigley GJ, Kolpak FJ, Crawford JL, van Boom JH, van der Marel G, Rich A: Molecular structure of a left handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* 282, 680-6, 1979
166. Wang AH, Hakoshima T, van der Marel G, van Boom JH, Rich A: AT base pairs are less stable than GC base pairs in Z-DNA: the crystal structure of d(m⁵CGTAm⁵CG). *Cell* 37, 321-31, 1984
167. Wang X, Su H, Bradley A: Molecular mechanisms governing Pcdh-g gene expression: Evidence for a multiple promoter and cis-alternative splicing model. *Genes Dev* 16, 1890-905, 2002
168. Ward JH, Kushner JP, Ray FA, Kaplan J: Transferrin receptor function in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 103, 246-54, 1984
169. Watanabé T, Atoji M, Okazaki C: The crystal structure of hexamine-cobaltic hexachlorothallate, Co(NH₃)₆TiCl₆, and hexamine-cobaltic hexabromothallate, Co(NH₃)₆TiBr₆. *Acta Cryst* 3, 405-8, 1950
170. Watson JD, Crick FHC: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-8, 1953

171. West AP Jr, Giannetti AM, Herr AB, Bennett MJ, Nangiana JS, Pierce JR, Weiner LP, Snow PM, Bjorkman PJ: Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites. *J Mol Biol* 313, 385-97, 2001
172. Wheelock MJ, Johnson KR: Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 207-35, 2003
173. Whyte DA, Li C, Thomson RB, Nix SL, Zanjani R, Karp SI, Aronson PS, Igarashi P: Ksp-cadherin gene promoter. I. Characterization and renal epithelial cell-specific activity. *Am J Physiol* 277, F587-F598, 1999
174. Wikins MHF, Gosling RG, Seeds WE: Physical studies of nucleic acid. *Nature* 167, 759-60, 1951
175. Wing R, Drew H, Takano T, Broka C, Tanaka S, Itakura K, Dickerson RE: Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature* 287, 755-8, 1980
176. Woith W, Nusslein I, Antoni C, Dejica DI, Winkler TH, Herrmann M, Pirner K, Kalden JR, Manger B: A soluble form of the human transferrin receptor is released by activated lymphocytes in vitro. *Clin Exp Immunol* 92, 537-42, 1993
177. Wong BW, Luk JM, Ng IO, Hu MY, Liu KD, Fan ST: Identification of liver-intestine cadherin in hepatocellular carcinoma – a potential disease marker. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 618-24, 2003
178. Wu Q, Maniatis T: A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell* 97, 779-90, 1999
179. Wu Q, Zhang T, Cheng JF, Kim Y, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Noonan JP, Zhang MQ, Myers RM, Maniatis T: Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters. *Genome Res* 11, 389-404, 2001
180. Xiang YY, Tanaka M, Suzuki M, Igarashi H, Kiyokawa E, Naito Y, Ohtawara Y, Shen Q, Sugimura H, Kino I: Isolation of complementary DNA encoding K-cadherin, a novel rat cadherin preferentially expressed in fetal kidney and kidney carcinoma. *Cancer Res* 54, 3034-41, 1994
181. Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M: Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev Biol* 101, 19-27, 1984
182. Zerial M, Melancon P, Schneider C, Garoff H: The transmembrane segment of the human transferrin receptor functions as a signal peptide. *EMBO* 5, 1543-50, 1986
183. Zimmer C, Tymen S, Marck C, Guschlbauer W: Conformational transitions of poly(dA-dC)·poly(dG-dT) induced by high salt or in ethanolic solution. *Nucleic Acids Res* 10, 1081-91, 1982
184. Zitt A: Klonierung und Charakterisierung des humanen LI-Cadherins. Doktorarbeit: Freie Universität Berlin, 1997

6. Verzeichnis der eigenen Publikationen

1. Crystal structure of Z-DNA without an alternating purine-pyrimidine sequence. A.H.-J. Wang, R.V. Gessner, G.A. van der Marel, J.H. van Boom and A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3611-5, 1985
2. Structural basis for stabilization of Z-DNA by cobalt hexaammine and magnesium cations. R.V. Gessner, G.J. Quigley, A.H.-J. Wang, G.A. van der Marel, J.H. van Boom and A. Rich, *Biochem.* 24, 237-40, 1985
3. DNA structure in which an adenine-cytosine mismatch pair forms an integral part of the double helix, M.H. Sarma, G. Gupta, R.H. Sarma, R. Bald, U. Engelke, S.L. Oei, R. Gessner and V.A. Erdmann, *Biochemistry*, 26, 7707-15, 1987
4. DNA hairpin structures in solution: 500-MHz two-dimensional $^1\text{H-NMR}$ studies on d(CGCCGCAGC) and d(CGCCGTAGC). G. Gupta, M.H. Sarma, R.H. Sarma, R. Bald, U. Engelke, S.L. Oei, R. Gessner and V.A. Erdmann, *Biochemistry*, 26, 7715-23, 1987
5. The molecular structure of the left-handed Z-DNA double helix at 1.0Å atomic resolution. R.V. Gessner, C.A. Frederick, G.J. Quigley, A.H.-J. Wang and A. Rich, *J. Biol. Chem.*, 264, 7921-35, 1989
6. Atomic resolution structure of the cellulose synthase regulator cyclic diguanylic acid. M. Egli, R.V. Gessner, L.D. Williams, G.J. Quigley, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, A. Rich and C.A. Frederick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3235-9, 1990
7. Molecular structures of spermine-nucleic acid complexes. L.D. Williams, C.A. Frederick, R.V. Gessner and A. Rich, in "Molecular Conformation and Biological Interaction", S. Ramaseshan and T. Balaram, Eds., pp 295-309, Bangalore, India, 1991
8. Localization of an epithelial membrane glycoprotein to the basolateral surface of enterocytes. N.C. Schnoy, R. Geßner, D. Berndorff, N. Loch, W. Reutter, A.-M. Lajous-Petter and R. Tauber, *Electron Microscopy* 3, 367-8, 1992
9. Kid-1, a putative renal transcription factor: regulation during ontogenesis and in response to ischemia and toxic injury. R. Witzgall, E. O'Leary, R. Gessner, A.J. Ouellette and J.V. Bonventre, *Mol. Cell. Biol.* 13, 1933-42, 1993
10. Enzymatic modeling of the oligosaccharide chains of glycoproteins immobilized onto polystyrene surfaces. G. Orberger, R. Geßner, H. Fuchs, B. Volz, E. Köttgen and R. Tauber, *Anal. Biochem.* 214, 195-204, 1993
11. Grundlagen zur Biochemie und Pathobiochemie der interzellulären Wechselwirkung. D. Berndorff, R. Geßner and R. Tauber, *Lab med.* 18, 372-5, 1993
12. Molecular characterization of a new type of calcium dependent cell adhesion protein expressed in liver and small intestine. R. Gessner, D. Berndorff, N. Schnoy, P. Bringmann, N. Loch, B. Kreft, W. Reutter and R. Tauber, *Z. Gastroenterologie* 1, 51-2, 1994
13. Comparative studies of high resolution Z-DNA crystal structures. Part 1: common hydration patterns of alternating dC-dG. R. Gessner, G.J. Quigley and M. Egli, *J. Mol. Biol.* 236, 1154-68, 1994

14. Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca^{2+} -dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. D. Berndorff, R. Gessner, B. Kreft, N. Schnoy, A.M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch and R. Tauber, *J. Cell Biol.* 125, 1353-69, 1994
15. Apolipoprotein E-Typologie und Demenz. F.M. Reischies, R. Geßner and A. Kage, *Nervenarzt* 65, 492-5, 1994
16. Stereoelectronic effects of deoxyribose O-4' on DNA conformation. M. Egli and R. Gessner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 180-4, 1995
17. Functional reconstitution of the human placental transferrin receptor into phospholipid bilayers leads to long tubular structures proceeding from the vesicle surface. H. Fuchs, R. Geßner, R. Tauber, R. Ghosh, *Biochemistry* 34, 6196-207, 1995
18. Direct calibration ELISA - a rapid method for the simplified determination of association constants of unlabeled biological molecules. H. Fuchs, G. Orberger, R. Tauber and R. Gessner, *J. Immunol. Meth.* 188, 197-208, 1995
19. Identification, purification and partial sequence of four *Thermus thermophilus* 5S rRNA binding proteins. J.-S. Kim, R.I. Boysen, W. Schröder, V.A. Erdmann and R.V. Gessner, *Endocytobiosis Cell Res.* 11, 177-94, 1996
20. LI-cadherin-mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions. B. Kreft, D. Berndorff, A. Böttinger, S. Finnemann, D. Wedlich, M. Hortsch, R. Tauber and R. Geßner, *J. Cell Biol.* 136, 1109-21, 1997
21. Lack of association of apolipoprotein E ϵ 4 allele with bulbar-onset motor neuron disease. R. Bachus, S. Bader, R. Geßner and A.C. Ludolph, *Ann. Neurol.* 41, 417, 1997
22. In an epidemiological sample the apolipoprotein E4 allele is associated to dementia and loss of memory function only in the very old. R. Geßner, F.M. Reischies, A. Kage, B. Geiselmann, M. Borchelt, E. Steinhagen-Thiessen and E. Köttgen, *Neurosci. Lett.* 222, 29-32, 1997
23. p53 hot-spot mutational analysis in advanced Western gallbladder carcinoma. S. Jonas, G. Springmeier, R. Tauber, B. Wiedenmann, R. Gessner, N. Kling, H. Lobeck, C. Fieger, W.O. Bechstein and P. Neuhaus, *World J. Surg.* 21, 768-72, 1997
24. Dementia in the very elderly. Results of the Berlin Aging Study. F.M. Reischies, B. Geiselmann, R. Gessner, S. Kanowski, M. Wagner, F. Wernicke, H. Helmchen, *Nervenarzt* 68, 719-29, 1997
25. Human transferrin receptor is active and plasma membrane targeted in yeast. H.-J. Terng, R. Geßner, H. Fuchs, U. Stahl and C. Lang, *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 61-7, 1998
26. Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin receptor derived by electron microscopy. H. Fuchs, U. Lücken, R. Tauber, A. Engel and R. Geßner, *Structure* 6, 1235-43, 1998
27. p53 mutagenesis in Klatskin tumors. S. Jonas, G. Springmeier, R. Tauber, B. Wiedenmann, H. Lobeck, R. Gessner, B. Kreft, N. Kling, K. Moelling and P. Neuhaus, *Hum. Pathol.* 29, 955-60, 1998
28. Differential modulation of human immunoglobulin isotype production by the neuropeptides substance P, NKA and NKB. A. Braun, P. Wiebe, A. Pfeufer, R. Geßner and H. Renz, *J. Neuroimmunol.* 97, 43-50, 1999

29. Experiences with external quality assessment (EQA) in molecular diagnostics in clinical laboratories in Germany. Working Group of the German Societies for Clinical Chemistry (DGKC) and Laboratory Medicine (DGLM). M. Neumaier, A. Braun, R. Gessner and H. Funke, *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 161-3, 2000
30. Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor?. T. von Zglinicki, V. Serra, M. Lorenz, G. Saretzki, R. Lenzen-Grossimlighaus, R. Gessner, A. Risch and E. Steinhagen-Thiessen, *Lab. Invest.* 80, 1739-47, 2000
31. Intestinal cell adhesion molecules: Liver-intestine cadherin. R. Gessner and R. Tauber, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 915, 136-43, 2000
32. Structural and functional stability of the mature transferrin receptor from human placenta. G. Orberger, H. Fuchs, J. Schöler, R. Geyer, R. Geßner, E. Köttgen and R. Tauber, *Arch. Biochem. Biophys.* 386, 79-88, 2001
33. First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. B. Hoffmann, H. Schmidt-Traub, A. Perrot, K. J. Osterziel and R. Geßner, *Hum. Mutat.* 17, 524, 2001
34. LI-cadherin – a marker of gastric metaplasia and neoplasia. C. Grötzinger, J. Kneifel, D. Patschan, I. Anagnostopoulos, N. Schnoy, S. Faiss, R. Tauber, B. Wiedenmann and R. Geßner, *Gut* 49, 73-81, 2001
35. LI-cadherin gene expression during intestinal development. B. Angres, L. Kim, R. Jung, R. Geßner and R. Tauber, *Dev. Dynam.* 221, 182-93, 2001
36. The result of equilibrium-constant calculations strongly depends on the evaluation method used and on the type of experimental errors. H. Fuchs and R. Geßner, *Biochem J.* 359, 411-8, 2001
37. Determination of optimal non-denaturing elution conditions from affinity columns by a solid-phase screen. H. Fuchs, R. Tauber and R. Geßner, *Biotechniques.* 31, 584-90, 2001
38. Iodination significantly influences the binding of human transferrin to the transferrin receptor. H. Fuchs and R. Geßner, *Biochim. Biophys. Acta* 1570, 19-26, 2002
39. Stimulation of plasminogen activation by recombinant cellular prion protein is conserved in the NH₂-terminal fragment PrP²³⁻¹¹⁰. M. Praus, G. Kettelgerdes, M. Baier, H.-G. Holzhütter, P.R. Jungblut, M. Maissen, G. Epple, W.-D. Schleuning, E. Köttgen, A. Aguzzi and R. Geßner, *Thromb. Haemost.* 89, 812-9, 2003
40. Levels of the soluble, 55-kilodalton isoform of tumor necrosis factor receptor in bone marrow are correlated with the clinical outcome of children with acute lymphoblastic leukemia in first recurrence. S. Wu, A. Korte, R. Gessner, G. Henze and K. Seeger, *Cancer* 98, 625-31, 2003
41. Multiparametrische Gendiagnostik in der Medizin: Erarbeitung gemeinsamer Standards. Multiparametric Gene Diagnostics in Medicine: Development of Consensus Standards. H. Funke, P. Cullen, R. Gessner, H.-G. Klein, C. Knabbe, T. Langmann and M. Neumaier, *J. Lab. Med.* 27, 131-6 (2003)
42. Apolipoprotein E4 Allele Is Associated With Poor Treatment Response in Hepatitis C Virus (HCV) Genotype 1. T. Müller, R. Geßner, C. Sarrazin, C. Graf, J. Halangk, H. Witt, E. Köttgen, B. Wiedenmann and T. Berg, *Hepatology* 38, 1592, 2003

43. Both lysine-clusters of the NH₂-terminal prion-protein fragment PrP23-110 are essential for t-PA mediated plasminogen activation. G. Epple, K. Langfeld, M. Baier, H.-G. Holzhütter, W.-D. Schleuning, E. Köttgen, R. Geßner and M. Praus, *Thromb. Haemost.* 91, 465-72, 2004
44. Ksp-cadherin is a functional cell-cell adhesion molecule related to LI-cadherin. M.W. Wendeler, M. Praus, R. Jung, M. Hecking, C. Metzigg and R. Geßner, *Exp. Cell Res.* 294, 345-55, 2004
45. Prion protein stimulates tissue-type plasminogen activator mediated plasmin generation via a lysine-binding site on kringle 2. G. Epple, W.-D. Schleuning, G. Kettelgerdes, E. Köttgen, R. Geßner and M. Praus, *J. Thromb. Haemost.* 2, 962-8, 2004
46. Phylogenetic origin of LI-cadherin revealed by protein and gene structure analysis. R. Jung, M.W. Wendeler, M. Danevad, H. Himmelbauer and R. Geßner, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 1157-66, 2004
47. The intron 6 G/T polymorphism of c-myc oncogene and the risk for coronary in-stent restenosis. C.M. Gross, J. Kramer, A. Pfeufer, R. Dietz, R. Geßner and M. Praus, *Basic Res. Cardiol.* 99, 309-14, 2004
48. Molekulare Diagnostik in der Medizin. R. Geßner and S. Wöfl, in "Molekulare Biotechnologie: Konzepte und Methoden", M. Wink, Ed., pp 485-509, Wiley-VCH, Weinheim, 2004
49. Ethnic Origin determines the Impact of genetic Variants in Dopamin Receptor Gene (DRD-1) concerning Essential Hypertension. A. Bellmann¹, J. Beige, A.M. Sharma and R. Geßner, *Am J Hypertens.* 17, 1184-87, 2004
50. Richtlinie: Labormedizinische Diagnostik bei der Therapie mit TPMT (Thiopurin-S-Methyltransferase)-abhängigen Pharmaka. T. Deufel, R. Geßner, M. Kiehntopf, K.J. Lackner, M. Schwab, W. Steimer, M. Steiner and N. von Ahsen, *J. Lab. Med.* 28, 477-82, 2004
51. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. S. Wu, A. Korte, C. Kebelmann-Betzing, R. Geßner, G. Henze and K. Seeger, *Leuk. Res.* 29, 63-72, 2005
52. Cytokine/cytokine receptor gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. S. Wu, R. Geßner, A. von Stackelberg, R. Kirchner, G. Henze, K. Seeger, *Cancer*, in press

7. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst denen, die mir in ihren Arbeitsgruppen bzw. Instituten den notwendigen Freiraum zu meiner wissenschaftlichen Entfaltung geboten haben, an der Freien Universität Berlin Herrn Prof. Volker A. Erdmann, am Massachusetts Institute of Technology Herrn Prof. Alexander Rich, am Massachusetts General Hospital Herrn Prof. Joseph Bonventre und an der Charité Herrn Prof. Eckart Köttgen.

Gleichermaßen danke ich allen meine Mitarbeiter und Kollegen, die erheblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Hervorzuheben sind hier insbesondere Herr Dr. Hendrik Fuchs, der zunächst im Rahmen seiner Diplom- und anschließend seiner Doktorarbeit nahezu alle Experimente zur Untersuchung des Transferrinrezeptors durchgeführt hat und, innerhalb des Cadherinprojektes, Frau Luise Kosel, die mich bei den initialen Experimenten praktisch unterstützt hat, Herr Dr. Dietmar Berndorff, der die LI-Cadherin-cDNA der Ratte kloniert hat, Herr Dr. Bertolt Kreft, der die funktionelle Analyse des LI-Cadherins der Ratte durchgeführt hat, Frau Anja Zitt, die das humane LI-Cadherin kloniert und die N-terminalen Cadherin-Repeats biophysikalisch untersucht hat, Herr Dr. Daniel Patschan, der die Expression des LI-Cadherins bei gastrointestinalen Tumoren und Metaplasien analysiert hat, Herr Dr. René Jung, der die Gene des LI- und Ksp-Cadherins kloniert und analysiert hat, und, nicht zuletzt, Herr Dr. Markus Wendeler, der das LI- und Ksp-Cadherin zellbiologisch und das LI-Cadherin zusätzlich im Hinblick auf seine homotypische Bindung biophysikalisch charakterisiert hat.

Nicht ungenannt bleiben sollen diejenigen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe, die ebenfalls an den Arbeiten beteiligt waren oder in anderen Projekten mitgearbeitet haben (in alphabetischer Reihenfolge):

Aladin Antic, Dr. Gesine Arntz, Dr. Sebastian Bader, Ingelore Bäßmann, Dr. Thilo Bartolmäs, Marion Bebenroth, Alexandra Buwitt, Catharina Crolow, Dr. Margrete Danevad, Dr. Corinna Dietel, Elke Dyrks, Guido Epple, Silke Feineis, Petra Felsch, Monika Franjicevic, Alexandra Goischke, Carola Graf, Marcus Grass, Monica Gross, Carmen Gruber, Dr. Manfred Hecking, Dr. Anja Helmers, Dr. Jürgen Helmers, Dirk Hentschel, Arnd Heuser, Dr. Bernard Hoffmann, Peter Hoffmann, Veit Hofmann, Valerie Johnston, Gerhard Kettelgerdes, Dr. Yong-Son Kim, Anja Köhler, Miriam Konkkel, Petra Krienke, Kristina Langfeld, Martin Liebig, Karin May, Eva Messing, Carola Metzsig, Slavica Ohk, Thomas Osei-Agyemang, Astrid Parlow, Dr. Arne Pfeufer, Matthias Prager, Dr. Michael Praus,

Constance Raimer, Lars-Peter Rudolf, Amy Parker Ruhl, Jan Paul Rudolph, Martina Runge, Christina Schlaak, Dr. Hajo Schmidt-Traub, Daniel Schöndube, Ellen Schulte, Ute Schwiem, Sabine Strauch, Eva Suhren, Anna Takvorian, Alexandra Tibelius, Deepak Vangala, Regina Weeke, Dr. Andreas Weimann, Dr. Wiebke Wetzels, Irka Wiedenhaupt, Dr. Shuling Wu.

Sollte ich versäumt haben, einen Kollegen oder Mitarbeiter zu nennen, der ebenfalls zu der vorliegenden Arbeit beigetragen hat, so bitte ich um Verzeihung – nichts kann jemals perfekt sein, auch nicht diese Arbeit einschließlich ihrer Danksagung.

Der Raum reicht leider nicht, all diejenigen zu nennen, die als Kooperationspartner direkt oder indirekt an den beschriebenen Arbeiten beteiligt waren; die wichtigsten von ihnen sind jedoch in den entsprechenden Publikationen aufgeführt.

Danken möchte ich auch denjenigen meiner akademischen Lehrer, Mitarbeiter, Kollegen und Freunde, die mich beim Erstellen der Habilitationsschrift motiviert und dadurch nicht unerheblich zu deren Gelingen beigetragen haben.

Schließlich danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, mehreren Industriepartnern in öffentlich kofinanzierten Gemeinschaftsprojekten (RiNA GmbH, Jerini AG, Cytonet GmbH & Co. KG), der VolkswagenStiftung, der Sonnenfeld-Stiftung und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für finanzielle Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Anhang: Ausdrucke der beschriebenen Publikationen

A.1 Publikationen zum Kapitel 2 "DNA-konformationsstabilisierende atomare Interaktionen – Röntgenkristallstruktur- und 2D-NMR-Analysen"

1. Crystal structure of Z-DNA without an alternating purine-pyrimidine sequence. A.H.-J. Wang, R.V. Gessner, G.A. van der Marel, J.H. van Boom and A. Rich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3611-15, 1985
2. Structural basis for stabilization of Z-DNA by cobalt hexaammine and magnesium cations. R.V. Gessner, G.J. Quigley, A.H.-J. Wang, G.A. van der Marel, J.H. van Boom and A. Rich, Biochem. 24, 237-40, 1985
3. The molecular structure of the left-handed Z-DNA double helix at 1.0Å atomic resolution. R.V. Gessner, C.A. Frederick, G.J. Quigley, A.H.-J. Wang and A. Rich, J. Biol. Chem., 264, 7921-35, 1989
4. Comparative studies of high resolution Z-DNA crystal structures. Part 1: common hydration patterns of alternating dC-dG. R. Gessner, G.J. Quigley and M. Egli, J. Mol. Biol. 236, 1154-68, 1994
5. Stereoelectronic effects of deoxyribose O-4' on DNA conformation. M. Egli and R. Gessner, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 180-4, 1995
6. DNA structure in which an adenine-cytosine mismatch pair forms an integral part of the double helix, M.H. Sarma, G. Gupta, R.H. Sarma, R. Bald, U. Engelke, S.L. Oei, R. Gessner and V.A. Erdmann, Biochemistry, 26, 7707-15, 1987
7. DNA hairpin structures in solution: 500-MHz two-dimensional ¹H-NMR studies on d(CGCCGCAGC) and d(CGCCGTAGC). G. Gupta, M.H. Sarma, R.H. Sarma, R. Bald, U. Engelke, S.L. Oei, R. Gessner and V.A. Erdmann, Biochemistry, 26, 7715-23, 1987

A.2 Publikationen zum Kapitel 3: "Struktur und Ligandenbindung des Transferrinrezeptors – Elektronenmikroskopie und Ligandenbindungsanalysen"

8. Functional reconstitution of the human placental transferrin receptor into phospholipid bilayers leads to long tubular structures proceeding from the vesicle surface. H. Fuchs, R. Geßner, R. Tauber, R. Ghosh, *Biochemistry* 34, 6196-207, 1995
9. Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin receptor derived by electron microscopy. H. Fuchs, U. Lücken, R. Tauber, A. Engel and R. Geßner, *Structure* 6, 1235-43, 1998
10. Direct calibration ELISA - a rapid method for the simplified determination of association constants of unlabeled biological molecules. H. Fuchs, G. Orberger, R. Tauber and R. Geßner, *J. Immunol. Meth.* 188, 197-208, 1995
11. Iodination significantly influences the binding of human transferrin to the transferrin receptor. H. Fuchs and R. Geßner, *Biochim. Biophys. Acta* 1570, 19-26, 2002
12. The result of equilibrium-constant calculations strongly depends on the evaluation method used and on the type of experimental errors. H. Fuchs and R. Geßner, *Biochem J.* 359, 411-8, 2001

A.3 Publikationen und Manuskripte zum Kapitel 4: "Struktur- und Funktionsanalyse der 7D-Cadherine – Zell- und Molekularbiologie einer neuen Molekül- familie"

13. Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca^{2+} -dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. D. Berndorff, R. Gessner, B. Kreft, N. Schnoy, A.M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch and R. Tauber, *J. Cell Biol.* 125, 1353-69, 1994
14. LI-cadherin-mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions. B. Kreft, D. Berndorff, A. Böttinger, S. Finnemann, D. Wedlich, M. Hortsch, R. Tauber and R. Geßner, *J. Cell Biol.* 136, 1109-21, 1997
15. LI-cadherin – a marker of gastric metaplasia and neoplasia. C. Grötzinger, J. Kneifel, D. Patschan, I. Anagnostopoulos, N. Schnoy, S. Faiss, R. Tauber, B. Wiedenmann and R. Geßner, *Gut* 49, 73-81, 2001
16. LI-cadherin lacks the a cadherin specific calcium binding site between the second and third extracellular repeats. A. Zitt, A.W. Koch, M.W. Wendeler, J. Engel, R. Tauber and R. Geßner (Manuskript)
17. Intestinal LI-cadherin acts as a Ca^{2+} dependent adhesion switch. M. Wendeler, D. Drenckhahn, R. Geßner and W. Baumgartner (Manuskript)
18. Phylogenetic origin of LI-cadherin revealed by protein and gene structure analysis. R. Jung, M.W. Wendeler, M. Danevad, H. Himmelbauer and R. Geßner, *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1157-66, 2004
19. Ksp-cadherin is a functional cell-cell adhesion molecule related to LI-cadherin. M.W. Wendeler, M. Praus, R. Jung, M. Hecking, C. Metzigg and R. Geßner, *Exp. Cell Res.* 294, 345-55, 2004
20. Unique gene structure and paralogy define 7D-cadherin family. M.W. Wendeler, R. Jung, H. Himmelbauer and R. Geßner (Manuskript)