

## I. Zusammenfassung

LI- und Ksp-Cadherin gehören zur Familie der 7D-Cadherine, die sich aufgrund auffälliger Strukturmerkmale klar von anderen Cadherin-Familien abgrenzt. Im Gegensatz zu klassischen Cadherinen besitzen beide sieben anstelle von fünf extrazellulären Cadherin-Homologiedomänen und nur eine kurze, etwa 25 Aminosäuren umfassende, zytoplasmatische Domäne. LI- und Ksp-Cadherin zeigen ein spezifisches Expressionsmuster in einschichtigen, hochprismatischen Zellen stark resorbierender Epithelien. LI-Cadherin wird in der Ratte in Leber und Darm, bei Mensch und Maus nur im Darm exprimiert, während Ksp-Cadherin ausschließlich in den Epithelien der Nierentubuli und des Sammelrohres von Kaninchen und Maus zu finden ist. Beide werden jeweils mit E-Cadherin koexprimiert, sind jedoch subzellulär unterschiedlich lokalisiert. Die 7D-Cadherine finden sich entlang der gesamten basolateralen Membranbereiche, während E-Cadherin in den *Zonulae adhaerentes* konzentriert vorliegt.

In dieser Arbeit wurden die Adhäsionseigenschaften der 7D-Cadherine auf zellulärer und auf Einzelmolekülebene untersucht. Für Ksp-Cadherin wurde erstmalig die Funktion als Adhäsionsmolekül nachgewiesen. Hierzu wurden stabil transfizierte CHO-Zellen hergestellt, die entweder murines Ksp-, LI- oder E-Cadherin exprimieren. Diese Zellen wurden in Aggregationsassays untersucht und hinsichtlich des Einflusses der jeweiligen Cadherin-Expression auf die Zellmorphologie sowie auf Zytoskelettkomponenten der CHO-Zellen analysiert. Ksp-Cadherin ist in der Lage, in CHO-Zellen eine spezifische und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zellaggregation zu vermitteln, die vergleichbar mit der von LI- und E-Cadherin-vermittelten Aggregation ist. Im Gegensatz zu E-Cadherin, ließen sich LI- und auch Ksp-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin nicht kopräzipitieren. Dies legt den Schluß nahe, daß Ksp-Cadherin, genauso wie LI-Cadherin, nicht über  $\beta$ -Catenin mit dem Zytoskelett verankert ist. Ksp- und LI-Cadherin weisen also nicht nur strukturelle sondern auch funktionelle Gemeinsamkeiten auf.

Zur Bestimmung der homotypischen Adhäsionseigenschaften von LI-Cadherin wurde ein Fusionsprotein konstruiert, welches aus dem gesamten extrazellulären Anteil des LI-Cadherins fusioniert an die Fc-Domäne des humanen IgG1 besteht (LI-Fc). Dieses Protein wurde aus Zellkulturüberständen stabil transfizierter CHO-Zellen aufgereinigt und charakterisiert. Es liegt nativ als Dimer vor, zeigt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasesensitivität und vermittelt ebenso  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig eine Aggregation von Mikroperlen.

Untersuchungen des LI-Fc-Konstruktes mittels Affinitätschromatographie, Rasterkraftmikroskopie und mit Hilfe der Laserpinzette ergaben eine niederaffine Bindung ( $K_D$  zwischen 19 und 55  $\mu\text{M}$ ) und eine kurze Lebensdauer (1,4 s) für die homotypische LI-Cadherin-Interaktion, die sich zudem durch eine geringe Adhäsionsstärke auszeichnet (27 bis 51 pN bei Abrißgeschwindigkeiten von 150 bis 3000 nm/s). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der gesamten LI-Cadherin-Ektodomäne liegt bei einer  $K_D$  von

---

0,68 mM und ist hochkooperativ (Hill-Koeffizient von 12). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der LI-Cadherin-Interaktion unterscheidet sich hierin von der des E-Cadherins, obwohl beide in Enterozyten koexprimiert werden.

Um den Einfluß einer unterschiedlichen Anzahl von Cadherin-Domänen zu bestimmen und die Bedeutung des Fehlens der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen zwischen den Cadherindomänen 2 und 3 (EC23) des LI-Cadherins zu untersuchen, wurde ausgehend von dem LI-Fc-Konstrukt eine Deletionsmutante hergestellt, der die Cadherin-Domänen 2 und 3 fehlen ( $\Delta 23\text{LI-Fc}$ ). Diese liegt bereits als aufgereinigtes Protein vor und wurde ebenso wie LI-Fc charakterisiert. Auch  $\Delta 23\text{LI-Fc}$  vermittelt vergleichbar mit LI-Fc eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aggregation und soll zukünftig hinsichtlich der Bindungsparameter mittels AFM und Laserpinzette analysiert werden.

In Zellkulturexperimenten und mittels Laserpinzette wurde eine heterotypische Interaktion von LI- mit E-Cadherin nachgewiesen. LI- und E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen bildeten in Aggregationsassays Mischaggregate aus und LI-Fc-beschichtete Mikroperlen hafteten spezifisch sowohl an LI- als auch an E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen. Diese Interaktion war mit einer Akkumulation von LI- beziehungsweise E-Cadherin an den Kontaktbereichen zu den Mikroperlen verbunden. Darüber hinaus reicherten sich in E-Cadherin-exprimierenden Zellen auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin an den Kontaktbereichen zu LI-Fc-beschichteten Mikroperlen an. Die heterotypische Interaktion von LI- und E-Cadherin besitzt also hinsichtlich der zytoplasmatischen Verankerung von E-Cadherin die gleiche Qualität wie eine homotypische E-Cadherin-Bindung.

Die 7D-Cadherine grenzen sich nicht nur strukturell von anderen Cadherin-Familien ab, sondern besitzen auch unterschiedliche Bindungseigenschaften. Wie klassische Cadherine vermitteln auch sie Zelladhäsion, jedoch konnte für LI-Cadherin gezeigt werden, daß sich seine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit deutlich von der klassischer Cadherine unterscheidet. Die Koexpression von 7D-Cadherinen mit E-Cadherin und die hier beschriebene heterotypische Interaktion von LI- mit E-Cadherin legt den Schluß nahe, daß 7D-Cadherine und E-Cadherin gemeinsame Funktionen in einschichtigen, hochprismatischen Epithelzellen ausüben.

---

## II. Summary

LI- and Ksp-cadherin, the members of the 7D-cadherin-family, exhibit distinct structural features which make them unique within the cadherin superfamily. In contrast to classical cadherins, both have seven instead of five extracellular cadherin repeats and a short cytoplasmic domain comprising only about 25 amino acids. LI- and Ksp-cadherin show a specific expression pattern in columnar, highly resorptive epithelia. In rat the expression of LI-cadherin is restricted to liver and intestine, in human and mouse to the intestine only, whereas Ksp-cadherin can be found solely in epithelia of the tubular nephron and the collecting system of rabbit and murine kidneys. Both are coexpressed with E-cadherin, but localize to different membrane regions. The 7D-cadherins are localized along the entire length of the basolateral membrane, whereas E-cadherin is concentrated in the adherens junctions.

In this thesis, the adhesive properties of 7D-cadherins were analyzed on the cellular and on the single molecule level. The function of Ksp-cadherin as an adhesion molecule was analyzed for the first time. Ksp-cadherin is capable of mediating a specific and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cell-cell-adhesion comparable to that of LI- and E-cadherin. CHO cells stably expressing Ksp-, LI-, or E-cadherin were generated and tested in aggregation assays. Moreover, the influence of cadherin expression on cell morphology and on components of the cytoskeleton in these CHO cells was analyzed. In contrast to E-cadherin Ksp- and LI-cadherin could not be co-immunoprecipitated with  $\beta$ -catenin. This indicates that like LI-cadherin, Ksp-cadherin might not be linked to the cytoskeleton via  $\beta$ -catenin. Thus, Ksp- and LI-cadherin do not only share structural but also functional similarities.

In order to reveal the homotypic binding parameters of LI-cadherin, a fusion protein consisting of the entire extracellular part of LI-cadherin fused to the Fc-domain of the human IgG1 was constructed (LI-Fc). This chimeric construct was purified from stably transfected CHO cells and characterized. Under physiological conditions it was dimerized, exhibited a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease resistance and mediated aggregation of microbeads.

LI-Fc was used for affinity chromatography, atomic force microscopy and laser tweezer experiments to determine the binding parameters and the influence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions on the homotypic interaction. LI-cadherin revealed a low affinity homotypic interaction ( $K_D$  between 19 and 55  $\mu\text{M}$ ), a short lifetime (1.4 s) and a low unbinding force (27-51 pN at retrace velocities of 150-3000 nm/s). Binding is regulated by low-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites ( $K_D$  of about 0.68 mM) with high cooperativity (Hill coefficient of about 12). The  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of the LI-cadherin homotypic binding differs from that of E-cadherin although both proteins are co-expressed in enterocytes.

To investigate the importance of a different number of cadherin repeats and the lack of  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites between the cadherin repeats 2 and 3 (EC23) of LI-cadherin, a deletion mutant of LI-Fc was

generated which lacks the cadherin repeats 2 and 3 ( $\Delta 23$ LI-Fc). The purified  $\Delta 23$ LI-Fc also mediates a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent aggregation of microbeads and will be analyzed using AFM and laser tweezer regarding its binding parameters.

A heterotypic interaction of LI- with E-cadherin was observed in cell culture and laser tweezer experiments. CHO cells expressing LI- or E-cadherin formed mixed aggregates and LI-Fc-coated microbeads bound specific to E- or LI-cadherin expressing CHO cells. This cell-bead interaction was accompanied by the accumulation of LI- or E-cadherin at the contact zones. Additionally, in the case of E-cadherin expressing CHO cells also  $\alpha$ - and  $\beta$ -catenin were concentrated at the contact zones between cells and LI-Fc-coated microbeads. Thus, regarding the cytoplasmic anchorage of E-cadherin, the heterotypic interaction of LI- and E-cadherin showed a similar quality as the homotypic E-cadherin interaction.

The 7D-cadherins differ not only structurally from other cadherin families, but seem to have also distinct adhesive properties. Like classical cadherins, 7D-cadherins mediate cell-cell-adhesion and at least LI-cadherin reveals striking differences regarding the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of its homotypic interaction compared to that of classical cadherins. The co-expression of 7D- and E-cadherin and the heterotypic interaction of LI- and E-cadherin emphasize the hypothesis that both share common functions in columnar epithelial cells.

### III. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>III.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>5</b>
<b>IV.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
1.1	ZELLADHÄSION .....	9
1.2	ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE .....	9
1.3	DIE CADHERIN-SUPERFAMILIE .....	11
1.4	7D-CADHERINE .....	14
1.5	MODELLE DER HOMOTYPISCHEN CADHERIN-INTERAKTION .....	17
1.6	REGULATION DER CADHERIN-INTERAKTION .....	20
1.7	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
2.1	MATERIAL .....	23
2.1.1	<i>Geräte und Verbrauchsmaterial</i> .....	23
2.1.2	<i>Reagentien und Reaktionskits</i> .....	24
2.1.3	<i>Puffer und Medien</i> .....	25
2.1.4	<i>Enzyme</i> .....	25
2.1.5	<i>Molekulargewichtsstandards</i> .....	26
2.1.6	<i>Antikörper</i> .....	26
2.1.7	<i>Farbstoffe zur Lebendfärbung von Zellen</i> .....	26
2.1.8	<i>Plasmid-Vektoren</i> .....	27
2.1.9	<i>Bakterienstämme und Zelllinien</i> .....	27
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	28
2.2.1	<i>DNA- Präparation und Aufreinigung</i> .....	28
2.2.2	<i>DNA-Analyse</i> .....	30
2.2.3	<i>DNA-Modifikation</i> .....	32
2.2.4	<i>Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	33
2.2.5	<i>Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation</i> .....	34
2.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN .....	36
2.3.1	<i>Herstellung von Protein-Lysaten</i> .....	36
2.3.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA Protein Assay</i> .....	36
2.3.3	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen</i> .....	37
2.3.4	<i>Detektion von Proteinen im PAA-Gel</i> .....	37
2.3.5	<i>Western Blot</i> .....	38
2.3.6	<i>Immunpräzipitation</i> .....	39
2.3.7	<i>Aufreinigung von LI-Fc-Konstrukten aus Zellkulturüberständen</i> .....	40
2.3.8	<i>Herstellung polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus der 7D-Cadherine</i> .....	42
2.4	ZELLBIOLOGISCHE UND IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN .....	44
2.4.1	<i>Zellkultur von eukaryonten Zellen</i> .....	44
2.4.2	<i>Transfektion von CHO-Zellen</i> .....	44
2.4.3	<i>Subklonierung von transfizierten Zellen</i> .....	45
2.4.4	<i>Indirekte Immunfluoreszenz an adhärenen Zellen</i> .....	46
2.5	ASSAYS ZUR UNTERSUCHUNG DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON 7D-CADHERINEN .....	47
2.5.1	<i>Zellaggregations-Assay</i> .....	47
2.5.2	<i>Bindungsstudien von Cadherin-beschichteten Mikroperlen mittels Laserpinzette</i> .....	48
2.5.3	<i>Beschichtung von Latex-Mikroperlen mit LI-Cadherin-Fc-Konstrukten</i> .....	50
2.5.4	<i>Rasterkraftmikroskopie mit Cadherin-Fc-Konstrukten</i> .....	50
2.5.5	<i>Affinitätschromatographie zur Bestimmung der Affinitätskonstante von LI-Fc</i> .....	52

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
3.1	ANALYSE DER ZELLADHÄSIVEN EIGENSCHAFTEN VON KSP-CADHERIN.....	53
3.1.1	<i>Stabile Expression von Ksp-, LI- und E-Cadherin in CHO-Zellen.....</i>	53
3.1.2	<i>Analyse der Ksp-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen.....</i>	58
3.1.3	<i>Funktion von Ksp-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül .....</i>	60
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON LI-CADHERIN.....	65
3.2.1	<i>Herstellung von rekombinanten LI-Fc-Fusionsproteinen.....</i>	65
3.2.2	<i>Untersuchung der homotypischen Interaktion von LI-Cadherin.....</i>	73
3.3	NACHWEIS DER HETEROTYPISCHEN INTERAKTION VON LI- MIT E-CADHERIN.....	81
3.3.1	<i>Bindung von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen auf CHO-Zellen.....</i>	82
3.3.2	<i>Charakterisierung der Adhäsionskontakte von Mikroperlen auf CHO-Zellen.....</i>	85
3.3.3	<i>Stabile Expression von E-/LI-Cadherin-Chimären in CHO-Zellen.....</i>	86
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>88</b>
4.1	DIE FUNKTION VON KSP-CADHERIN ALS ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL.....	88
4.1.1	<i>Einfluß der Ksp-Expression auf die Zellmorphologie von CHO-Zellen .....</i>	89
4.1.2	<i>Aggregationsverhalten von Ksp-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen .....</i>	90
4.2	EIGENSCHAFTEN DER HOMOTYPISCHEN LI-CADHERIN INTERAKTION.....	91
4.2.1	<i>Bedeutung der unterschiedlichen Anzahl von Cadherin-Domänen.....</i>	92
4.2.2	<i>Der Einfluß von Calciumionen auf die homotypische LI-Cadherin-Interaktion.....</i>	93
4.2.3	<i>Parameter der homotypischen LI-Cadherin-Bindung.....</i>	96
4.3	DIE HETEROTYPISCHE INTERAKTION VON LI- MIT E-CADHERIN .....	98
4.4	FUNKTION DER 7D-CADHERINE IN EPITHELIIEN .....	100
4.4.1	<i>Die Rolle von Ksp-Cadherin in Epithelien der Nierentubuli.....</i>	101
4.4.2	<i>Die Bedeutung von LI-Cadherin im intestinalen Epithel.....</i>	101
4.5	AUSBLICK.....	105
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>119</b>
6.1	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	119
6.2	LEBENS LAUF.....	120
6.3	DANKSAGUNG.....	121