

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Zelladhäsion

Zellen sind die im Grundbauplan einheitlichen Bauelemente aller Lebewesen und ihre differenzierte Anordnung und Funktion führt zur Vielfalt der Organismen. Eine spezifische Interaktion zwischen einzelnen Zellen oder einer Zelle und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) ist Voraussetzung für die Entstehung komplexer Strukturen, sei es die Entwicklung von Einzellern zu Vielzellern im Laufe der Evolution oder die Ausbildung von Geweben und Organen während der Embryonalentwicklung. Diese Interaktionen werden unter dem Begriff Zelladhäsion zusammengefaßt.

Die Zelladhäsion ist nicht nur Bestandteil morphoregulatorischer Vorgänge, wie die Ausprägung der Zelldifferenzierung und der Erhalt der Gewebeintegrität (Gumbiner, 1996; Nelson, 1992), sondern umfaßt auch dynamische Abläufe bei der Immunantwort (Tseng and Dustin, 2002) und der neuronalen Informationsverarbeitung (Murase and Schuman, 1999). Für die Zelladhäsion verantwortlich ist die kombinatorische Expression und Interaktion einer heterogenen Klasse von membranständigen Proteinen (Übersicht in (Chothia and Jones, 1997)). Diese Zelladhäsionsmoleküle zeichnen sich einerseits dadurch aus, daß sie extrazellulär für das Anheften von Zellen sorgen, andererseits diesen Kontakt intrazellulär über das Zytoskelett verankern (Übersicht in (Jamora and Fuchs, 2002)). Lange Zeit galten Zelladhäsionsmoleküle lediglich als "Klebstoff" zwischen den Zellen, doch heute ist bekannt, daß sie an komplexen Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Buckley et al., 1998; Juliano, 2002). Aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben bei der Morphogenese und Homöostase von Geweben sind Zelladhäsionsmoleküle auch bei pathologischen Prozessen, wie der Tumorgenese und Metastasierung, von Bedeutung (Birchmeier and Behrens, 1994; Christofori and Semb, 1999).

Um die Vielfalt der durch Zelladhäsionsmoleküle beeinflussten Vorgänge zu verstehen, wird im folgenden die Klasse dieser Moleküle genauer betrachtet.

## 1.2 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle lassen sich bezüglich ihrer Primärstruktur in vier Hauptfamilien und zwei kleinere Gruppen einteilen (Hynes, 1999). Zu den Hauptfamilien gehören die Integrine, die Selektine, die Immunglobulin-Superfamilie und die Cadherin-Superfamilie. Die beiden weiteren Gruppen sind die Syndekane (Zimmermann and David, 1999) und die Disintegrine (Blobel and White, 1992). Abgesehen von ihrer Struktur werden Zelladhäsionsmoleküle auch bezüglich ihrer Adhäsionsmechanismen voneinander abgegrenzt. Wegen des Einflusses von zweiwertigen Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$ ) auf die Funktion von einigen Zelladhäsionsmolekülen, wird zwischen einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Zelladhäsion unterschieden (Takeichi, 1977).

Darüber hinaus stellt man die "homotypische" Interaktion zwischen Molekülen gleichen Typs der "heterotypischen" Interaktion zwischen unterschiedlichen Molekülen gegenüber (Edelman, 1985).

Im folgenden wird kurz auf die besonderen Merkmale der vier großen Familien von Zelladhäsionsmolekülen eingegangen, bevor die Superfamilie der Cadherine genauer betrachtet wird.

### **Integrine**

Integrine sind hauptverantwortlich für die Zell-Matrix-Adhäsion und bilden als funktionelle Einheit Heterodimere aus, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen (Übersicht in (Hynes, 2002)). In Säugern wurden bis dato 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten gefunden, die gemeinsam 24 unterschiedliche Integrine bilden können. Die durch Integrine vermittelte Zelladhäsion ist abhängig von zweiwertigen Kationen, die an der extrazellulären Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit binden (Diamond and Springer, 1994). Integrine zeigen eine heterotypische Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Kollagen, Laminin oder Fibronectin, und mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie. Intrazellulär sind fast alle Integrine über die  $\beta$ -Untereinheit und submembranäre Plaqueproteine, wie  $\alpha$ -Aktinin, Vinculin, Talin und Paxilin, mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Dogic et al., 1999; Turner, 2000).

### **Selektine**

Die Selektinfamilie besteht aus nur drei Mitgliedern, dem P (Platelet)-, dem E (Endothelial)- und dem L (Lymphocyte)-Selektin (Übersicht in Mc Ever (McEver, 2002) und in Kansas (Kansas, 1996)). Selektine sind stark glykosylierte Membranproteine, deren extrazellulärer N-Terminus eine Lektin-Domäne, eine EGF-ähnliche (EGF, Epidermal Growth Factor) Domäne und eine Selektinspezifische Konsensussequenz enthält. Die Lektin-Domäne bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an spezifische Kohlenhydratstrukturen (Imai et al., 1990; Lasky et al., 1989). Ein Ligand für P-Selektin ist PSGL-1 (P-Selectin-Glycoprotein-Ligand), ein Mucin-ähnliches Protein, welches auf der Oberfläche einer Subpopulation von T-Lymphozyten lokalisiert ist (Pouyani and Seed, 1995). Selektine ermöglichen den initialen Kontakt von Leukozyten mit dem Endothel und spielen somit eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen (Tedder et al., 1995; Vestweber and Blanks, 1999).

### **Immunglobulin-Superfamilie**

Die Immunglobulin-Superfamilie stellt eine große heterogene Familie von Zelladhäsionsmolekülen mit über 100 Mitgliedern in Vertebraten dar (Walsh and Doherty, 1997). Sie läßt sich durch eine variierende Anzahl von Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen) im Bereich des N-Terminus und eine oder mehrere darauf folgende Fibronectin Typ III-Domänen ( $\text{Fn}_{\text{III}}$ -Domänen) charakterisieren. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie vermitteln eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige homotypische oder heterotypische Adhäsion. NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) zeigt beispielsweise homotypisches Bindungsverhalten, während Vertreter der ICAM-Subfamilie (InterCellular Adhesion Molecule) eine heterotypische Interaktion mit Integrinen auf der Oberfläche von

Leukozyten eingehen (Aplin et al., 1998). Abgesehen von einer Beteiligung bei der Immunantwort, spielen die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Cunningham, 1995).

### **Cadherine**

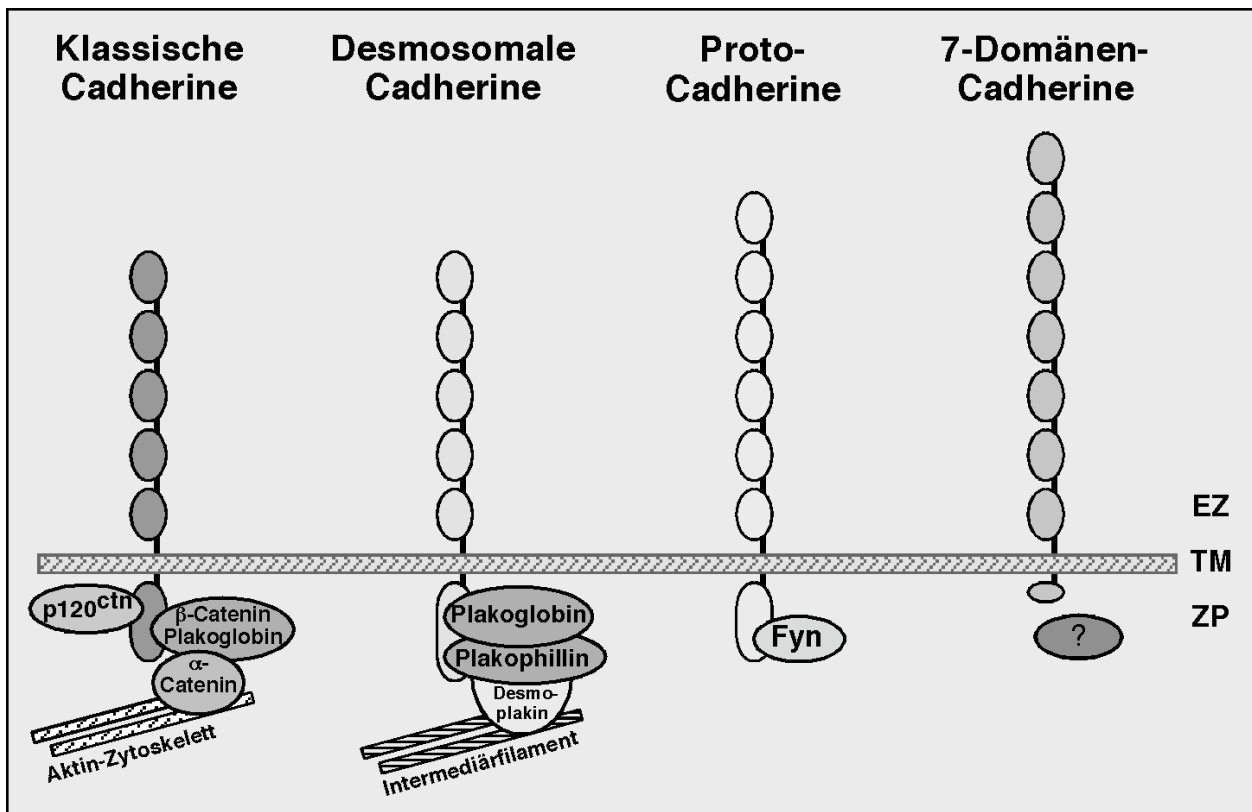
Cadherine sind glykosylierte Transmembranproteine, deren extrazellulärer Bereich durch eine Wiederholung von Cadherin-typischen Homologiedomänen (Cadherin-Domäne, "cadherin repeat") gekennzeichnet ist. Sie vermitteln eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, im allgemeinen homotypische, Interaktion und werden in zahlreichen Geweben exprimiert (Geiger and Ayalon, 1992). Die Nomenklatur der Cadherine richtet sich häufig nach dem Gewebe, aus dem sie zuerst isoliert wurden oder in dem ihre Expression sehr stark ist. So findet man E (Epithelial)-Cadherin in den meisten Epithelien (Schuh et al., 1986) und N (Neuronal)-Cadherin vorwiegend in neuronalem Gewebe (Nose and Takeichi, 1986). Bislang sind über 300 Cadherin-Sequenzen in Vertebraten bekannt, von denen allein im Menschen über 80 vorkommen (Tepass et al., 2000). Sie werden hinsichtlich besonderer Strukturmerkmale in verschiedene Subfamilien eingeteilt (Angst et al., 2001; Nollet et al., 2000).

### **1.3 Die Cadherin-Superfamilie**

Die Cadherin-Domäne ist das hervorstechende Merkmal aller Cadherine. Sie umfaßt 110 Aminosäuren und ihre Tertiärstruktur konnte erstmalig für die erste Cadherin-Domäne (EC1) des N-Cadherins aufgeklärt werden (Shapiro et al., 1995). Es folgten Strukturanalysen der ersten (EC1) und der ersten beiden Cadherin-Domänen (EC12) des E-Cadherins (Overduin et al., 1995; Nagar et al., 1996). Die Cadherin-Domäne weist große strukturelle Ähnlichkeit mit der Immunglobulin-Domäne auf und ist aus einer zylindrischen Anordnung eines  $\beta$ -Faltblattes, welches aus sieben antiparallelen Einzelsträngen (" $\beta$ -barrel") besteht, aufgebaut. Ein gemeinsamer Ursprung der Cadherin- und der Immunglobulindomäne ist fraglich, da beide keine Sequenzhomologie und auch keine vergleichbare Genstruktur aufweisen. Die Strukturähnlichkeit beider Domänen wird als ein Beispiel für die konvergente Evolution eines Proteinmoduls interpretiert (Shapiro et al., 1995).

Allen Cadherinen gemeinsam sind die zwischen den einzelnen Cadherin-Domänen liegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen, die sich durch die konservierten Sequenzmotive LDRE, DXNDN und DXD auszeichnen. Diese Aminosäuren bilden am Übergang von zwei Cadherin-Domänen eine Art Tasche, in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die sauren Seitengruppen von Glutamin- und Asparaginsäure stabilisiert werden (Nagar et al., 1996). Die Ausrichtung der einzelnen Cadherin-Domänen scheint maßgeblich von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beeinflusst zu werden. Pokutta und Kollegen zeigten mittels Elektronenmikroskopie von rekombinant hergestellten extrazellulären Anteilen des E-Cadherins, daß diese Moleküle unter  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug eine ungeordnete Struktur aufweisen (Pokutta et al., 1994). Erst in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zeigen die extrazellulären Bereiche des E-Cadherins eine starre, perlschnurartige Anordnung der einzelnen Cadherin-Domänen und beginnen zu dimerisieren (Pertz et al., 1999).

Mit Ausnahme von T (Truncated)-Cadherin, welches über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991), besitzen alle Cadherine eine Transmembrandomäne. Der sich anschließende zytoplasmatische Anteil variiert innerhalb der Cadherin-Superfamilie und wird deswegen häufig zur Unterteilung der Cadherine in Subfamilien herangezogen. In Abb. 1 sind vier Subfamilien der Cadherine mit ihren jeweiligen zytoplasmatischen Verankerungen schematisch dargestellt.



**Abb. 1: Die Cadherin-Superfamilie.** Struktur und intrazelluläre Interaktionspartner von Vertretern der verschiedenen Cadherin-Subfamilien. Klassische und desmosomale Cadherine sind über Armadillo-Proteine mit dem Zytoskelett verbunden, während Mitglieder der Protocadherinfamilie mit der Fyn-Tyrosinkinase (Fyn) interagieren. Für die Vertreter der 7D-Cadherine wurden bislang keine zytoplasmatischen Interaktionspartner gefunden. EZ: extrazellulär, TM: Transmembran und ZP: zytoplasmatisch. Verändert nach Gessner and Tauber, 2000.

### Klassische Cadherine

Klassische Cadherine besitzen N-terminal ein Propeptid, welches im Laufe ihrer Biosynthese abgespalten wird (Ozawa and Kemler, 1990a), und fünf Cadherin-Domänen (Geiger and Ayalon, 1992). Die über 20 bekannten klassischen Cadherine lassen sich aufgrund eines konservierten HAV-Sequenzmotives in der ersten Cadherin-Domäne weiter unterteilen (Geiger and Ayalon, 1992). Während die klassischen Cadherine des Typs 1 das HAV-Motiv besitzen, ist dies bei den klassischen Cadherinen des Typs 2 nicht der Fall. Ein Unterschied im Adhäsionsverhalten der beiden Cadherin-Typen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Kimura et al., 1995; Nakagawa and Takeichi, 1995). Der Transmembrandomäne folgt ein etwa 150 Aminosäuren umfassender

zytoplasmatischer Anteil, der hochkonservierte Abschnitte enthält (Ozawa et al., 1990b). Einer dieser konservierten Bereiche beinhaltet ein Bindungsmotiv für die sogenannten Armadillo-Proteine,  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin), und wird auch als Catenin-Bindungssequenz bezeichnet (Stappert and Kemler, 1994). Die klassischen Cadherine sind über  $\alpha$ -Catenin, welches an  $\beta$ -Catenin bindet, mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft und beeinflussen über die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin auch den Wnt-Signalweg (Gumbiner, 1993 und 1995; Orsulic et al., 1999). Ein weiteres Armadillo-Protein, p120<sup>cas</sup>, bindet membrannah an die zytoplasmatische Domäne der klassischen Cadherine und scheint deren Bindungsstärke über die Modulation der GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 zu regulieren (Anastasiadis and Reynolds, 2001).

Die klassischen Cadherine vermitteln einerseits eine eher "diffuse" Adhäsion entlang der gesamten Zell-Zell-Kontaktfläche, andererseits konzentrieren sie sich in diskreten Kontaktzonen, den *Zonulae adherens* (Adherens Junctions; (Boller et al., 1985)). Diese spezifischen Membrankontakte stabilisieren die Zellen in einem Epithelverband über das Aktin-Zytoskelett und führen zu einer Trennung von apikalen und basolateralen Membranbereichen (Tepass et al., 2000). Hierdurch wird eine Polarisierung der Zellen induziert (Boyer et al., 2000).

E-Cadherin (Uvomorulin; (Schuh et al., 1986)) gilt als Hauptvertreter der klassischen Cadherine. Es wird in zahlreichen Epithelien exprimiert und besitzt eine zentrale Funktion in der frühen Embryonalentwicklung (Larue et al., 1994). Für E-Cadherin konnte erstmals eine heterophile Interaktion mit  $\alpha$ E $\beta$ 7-Integrin, welches auf intraepithelialen Lymphozyten lokalisiert ist, beobachtet werden (Cepek et al., 1994; Higgins et al., 1998). E-Cadherin vermittelt so eine Bindung von intraepithelialen Lymphozyten an die Enterozyten des Dünndarmepithels.

### **Desmosomale Cadherine**

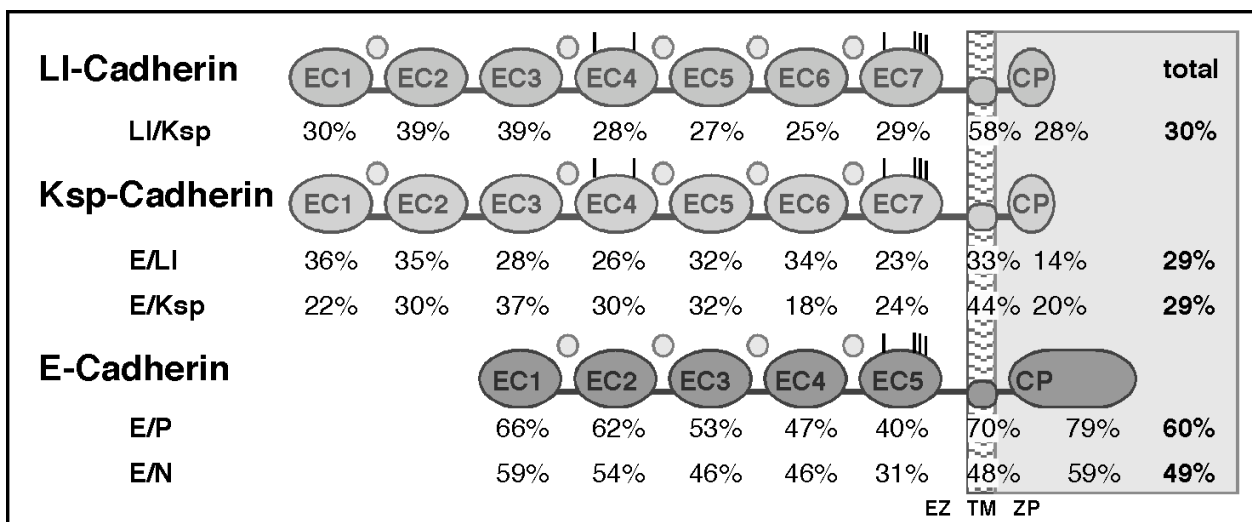
Desmosomale Cadherine sind am Aufbau von Desmosomen (*Macula adhaerens*) beteiligt und werden in Desmogleine und Desmocolline unterteilt, von denen bislang jeweils drei Vertreter bekannt sind (Garrod et al., 2002). Sie besitzen, wie klassische Cadherine, extrazellulär fünf Cadherin-Domänen, aber ihre zytoplasmatischen Anteile zeigen nur eine partielle Homologie zu denen der klassischen Cadherine (Koch et al., 1994). Die Armadillo-Proteine, Plakoglobin und Plakophilin, verknüpfen die desmosomalen Cadherine mit dem Intermediärfilament. Desmocollin und Desmoglein interagieren in einer homo- und heterotypischen Weise (Chitaev and Troyanovsky, 1997) und bilden zusammen mit Plakoglobin einen Komplex, der hinreichend für die Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsion in Zellkultur-Experimenten ist (Marcozzi et al., 1998).

## Protocadherine

Protocadherine stellen mit etwa 70 Vertretern in Säugern die größte Subfamilie der Cadherin-Superfamilie dar (Frank and Kemler, 2002)). Sie besitzen bis zu sieben (meist sechs) Cadherin-Domänen und einen zytoplasmatischen Bereich, der keine Homologie zu dem der klassischen Cadherine aufweist. Die als CNRs ("Cadherin-related-Neuronal-Receptors") bezeichneten Mitglieder der Protocadherin-Subfamilie interagieren intrazellulär mit der Fyn-Tyrosinkinase aus der Src-Familie (Uemura, 1998). Mit der Entdeckung von 52 humanen Protocadherinen, die in drei Genclustern ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Protocadherine) arrangiert sind, gewinnen die Protocadherine zunehmend an Bedeutung und ihre mögliche Funktion wird im Zusammenhang mit der Informationsverarbeitung des Zentralnervensystems diskutiert (Wu and Maniatis, 1999).

### 1.4 7D-Cadherine

Die 7D-Cadherine (7 Domänen-Cadherine) besitzen als gemeinsame Strukturmerkmale sieben Cadherin-Domänen und einen kurzen, etwa 25 Aminosäuren umfassenden, zytoplasmatischen Anteil (Geßner and Tauber, 2000). Das LI (Liver Intestine)- und das Ksp (Kidney specific)-Cadherin sind die bislang einzigen Mitglieder dieser Familie (Berndorff et al., 1994; Thomson et al., 1995). Abb. 2 vergleicht schematisch die aus den jeweiligen cDNAs abgeleiteten Proteinstrukturen der 7D-Cadherine mit der des E-Cadherins als Vertreter der klassischen Cadherine.



**Abb. 2: Homologievergleich von LI-, Ksp- und E-Cadherin.** Der prozentuale Anteil identischer Aminosäuren einzelner Proteindomänen und die Gesamtidentität von LI-Cadherin (LI), Ksp-Cadherin (Ksp) und E-Cadherin (E) aus der Maus wurden verglichen (Softwarepaket MacMolly Tetra 3.7, Modul "Align"; Soft Gene, Berlin). Zusätzlich wurde E-Cadherin mit P-Cadherin (P) und N-Cadherin (N) verglichen. EC1-EC7 bezeichnen die Cadherindomänen 1-7 und CP bezeichnet die zytoplasmatische Domäne der Cadherinmoleküle. Die Kreise zwischen den Cadherindomänen symbolisieren gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und die senkrechten Striche in den Cadherindomänen EC4, EC5 und EC7 repräsentieren konservierte Cysteine. EZ: extrazellulär, TM: transmembran, ZP: zytoplasmatisch.

Mit einer durchschnittlichen Sequenzidentität auf Aminosäureebene von nur 30% zwischen murinem LI- und Ksp-Cadherin, zeigen diese untereinander einen ähnlich geringen Anteil konservierter Aminosäuren wie jeweils im Vergleich zu E-Cadherin (je 29%). Klassische Cadherine untereinander zeigen eine größere Homologie. So besitzen E- und P-Cadherin eine durchschnittliche Sequenzidentität von 60%, während E- und N-Cadherin eine Sequenzidentität von 49% auf Aminosäureebene aufweisen. Trotz der relativ geringen Homologie auf Aminosäureebene besitzen die 7D-Cadherine auffällige Gemeinsamkeiten. Neben den bereits erwähnten gemeinsamen Strukturmerkmalen besitzen 7D-Cadherine zwei konservierte Cysteine in der vierten Cadherin-Domäne (EC4). Des Weiteren fehlen sowohl LI- als auch Ksp-Cadherin drei der vier für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen notwendigen Sequenzmotive am Übergang der Cadherin-Domänen zwei und drei (EC23). Zwar konnte für das LI-Cadherin bereits nachgewiesen werden, daß zwischen dem Domänen-Paar zwei und drei tatsächlich keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden (Zitt, 1997), welche Bedeutung dies für die extrazelluläre LI-Cadherin-Interaktionen hat, ist jedoch noch unklar.

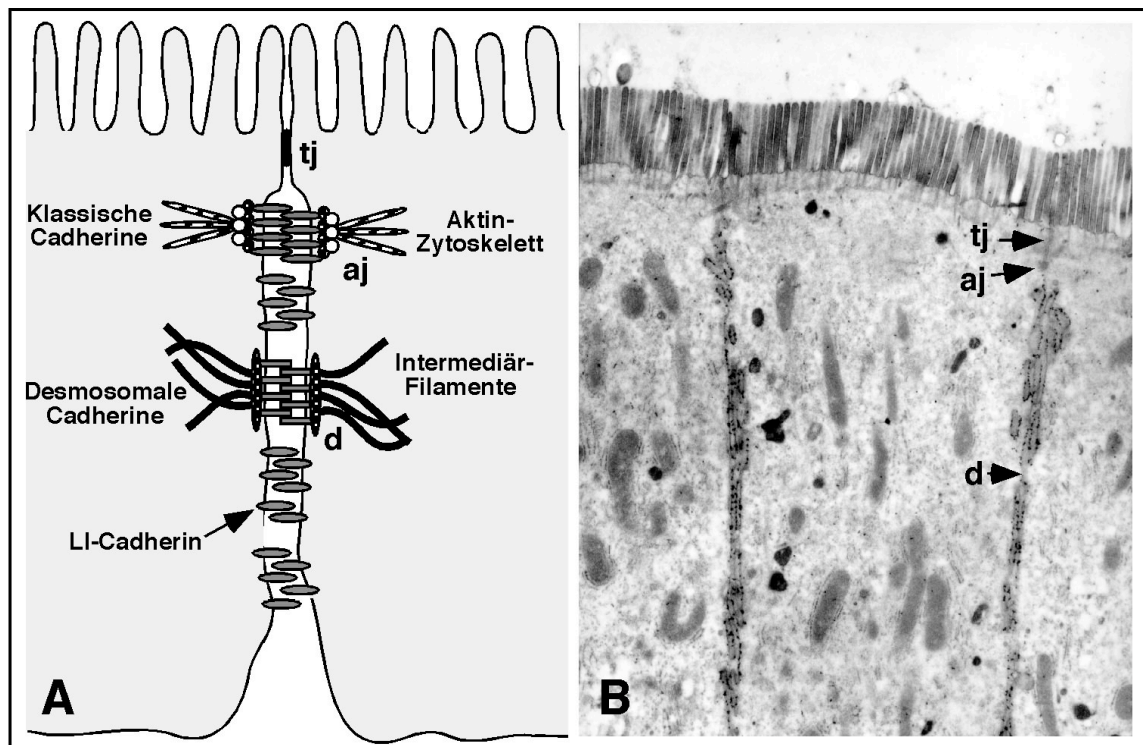
Vergleichende Untersuchungen der Genstruktur, der genomischen Lokalisation und der Aminosäuresequenz zwischen klassischen und 7D-Cadherinen deuten darauf hin, daß ein erstes 7D-Cadherin durch partielle Genduplikation aus einem Vorläufer-Cadherin mit fünf Cadherin-Domänen entstanden ist (Jung, 2001). Die Verdopplung und Translokation eines größeren chromosomalen Bereiches könnte dann zu einem zweiten Vertreter der 7D-Cadherine geführt haben (Jung, 2001). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Identifizierung und Charakterisierung des LI-Cadherin-Orthologs aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*), welches dort eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung spielt und im adulten Tier in Darm und Niere exprimiert wird (Horsfield et al., 2002).

### **LI-Cadherin**

Als erster Vertreter der 7D-Cadherine wurde das LI-Cadherin aus der Ratte identifiziert (Berndorff et al., 1994). Im folgenden wurde die humane cDNA des LI-Cadherins kloniert (Zitt, 1997), welche unabhängig hiervon auch als protonenabhängiger Peptidtransporter HPT-1 (Human Peptide Transporter-1) beschrieben wurde (Dantzig et al., 1994). Auch das murine Homolog des LI-Cadherins konnte kloniert und das Expressionsmuster analysiert werden (Angres et al., 2001). LI-Cadherin wird in der Ratte in Leber und im Darm exprimiert (Berndorff et al., 1994), ist jedoch in Mensch und Maus vorwiegend im Darm nachzuweisen (Angres et al., 2001; Zitt, 1997). Die subzelluläre Verteilung von LI-Cadherin in der Enterozytenmembran ist bezüglich verschiedener Kontaktzonen der Epithelzellen in Abb. 3 schematisch (A) und anhand einer elektronenmikroskopischen Aufnahme von Ultradünnschnitten des Rattendünndarms nach Immunogoldfärbung gegen LI-Cadherin (B) verdeutlicht.

LI-Cadherin zeigt eine basolaterale Verteilung entlang der Zell-Zell-Kontaktfläche benachbarter Enterozyten, ist aber von spezialisierten Membranbereichen, wie der *Zonula occludens* (tight

junctions), der *Zonula adhaerens* (adherens junction) und der *Macula adhaerens* (Desmosom) ausgeschlossen (Berndorff et al., 1994). Dies gilt nicht für klassische und desmosomale Cadherine. Das ebenfalls im Darmepithel exprimierte E-Cadherin ist in der *Zonula adhaerens* konzentriert (Boller et al., 1985), während desmosomale Cadherine (vgl. Abschnitt 1.3) in der *Macula adhaerens* zu finden sind (Koch et al., 1994).



**Abb. 3: Subzelluläre Lokalisation von LI-Cadherin.** Schematische Ansicht (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme von Zellkontaktzonen benachbarter Enterozyten (B); Maßstab 1:12000. Mit Immunogoldpartikeln markiertes LI-Cadherin findet sich entlang der lateralen Kontaktbereiche der Zellen ist aber von den tight junctions (tj), den adherens junctions (aj) und den Desmosomen (d) ausgeschlossen.

LI-Cadherin ist nicht, wie klassische Cadherine, zytoplasmatisch über Catenine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden, vermittelt aber dennoch Zell-Zell-Aggregation (Kreft et al., 1997). Diese zelladhäsive Wirkung des LI-Cadherins ist unabhängig von etwaigen zytoplasmatischen Interaktionen, da auch ein nur über einen GPI-Anker mit der Membran verbundener extrazellulärer Bereich des LI-Cadherins, Zellen zur Aggregation bringt (Kreft et al., 1997). Zudem konnten zytoplasmatische Bindungspartner des LI-Cadherins bislang nicht identifiziert werden.

Hinsichtlich einer möglichen Funktion des LI-Cadherins bei der Zelldifferenzierung gibt es einige Hinweise. So sind Transkriptionsfaktoren der Caudal-Familie, wie Cdx1 und Cdx2, an der Darmentwicklung der Maus beteiligt (Silberg et al., 2000). Interessanterweise reguliert Cdx2 unter anderem die Expression von LI-Cadherin im Darmepithel (Hinoi et al., 2002). Die Beobachtung, daß LI-Cadherin bei der intestinalen Metaplasie des Magens und bei Magenkarzinomen ektopisch



in den transformierten Zellen des Magenepithels exprimiert wird, liefert einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Funktion von LI-Cadherin bei Differenzierungsvorgängen (Grötzinger et al., 2001). Kürzlich wurde zudem ein Anstieg der LI-Cadherin-Expression mit dem Differenzierungsgrad von Adenokarzinomen des Pankreas in Verbindung gebracht (Takamura et al., 2003). LI-Cadherin kann somit als geeigneter Differenzierungsmarker für die Tumordiagnostik betrachtet werden.

### **Ksp-Cadherin**

Mit der Identifizierung des Ksp-Cadherins aus der Kaninchen-Niere wurde ein weiteres Mitglied der 7D-Cadherine entdeckt (Thomson et al., 1995). Wie LI-Cadherin, zeigt auch Ksp-Cadherin ein gewebespezifisches Expressionsmuster und eine vergleichbare subzelluläre Verteilung. Ksp-Cadherin ist in der basolateralen Membran aller Epithelzellen der Nierentubuli und des Sammelrohres lokalisiert, jedoch nicht in den Glomeruli der Niere nachzuweisen (Thomson and Aronson, 1999). Interessanterweise sind Transkripte des Ksp-Cadherins im Laufe der Embryonalentwicklung auch in der Lunge der Maus zu finden (Wertz and Herrmann, 1999). Diese potentielle transiente Expression in sich entwickelnden Organen läßt auf eine Beteiligung des Ksp-Cadherins bei der Differenzierung von Geweben schließen. Ein funktioneller Nachweis hierfür steht allerdings noch aus.

Promotoranalysen bezüglich der Nieren-spezifischen Expression von Ksp-Cadherin ergaben, daß der Ksp-Cadherin-Promotor durch HNF-1 $\beta$  (Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$ ) reguliert wird (Bai et al., 2002; Whyte et al., 1999). Ein Nachweis der Funktion von Ksp-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül fehlt bislang und auch über mögliche zytoplasmatische Interaktionen ist nichts bekannt.

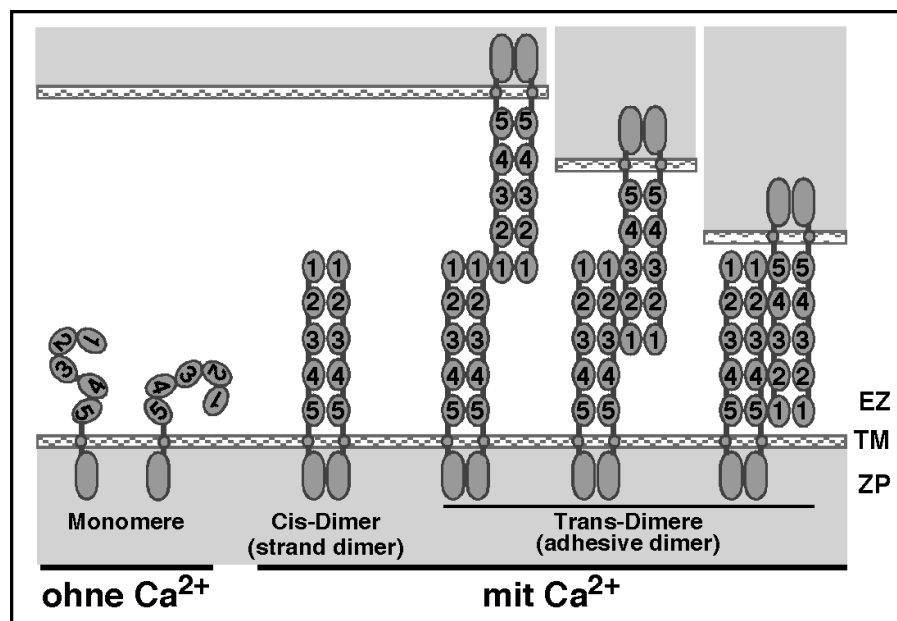
### **1.5 Modelle der homotypischen Cadherin-Interaktion**

Der Mechanismus der homotypischen Cadherin-Interaktion ist nicht eindeutig aufgeklärt, allerdings werden für klassische Cadherine unterschiedliche Modelle dieser Interaktion diskutiert (Alattia et al., 1999; Koch et al., 1999; Leckband and Sivasankar, 2000).

Die Entdeckung, daß Zellpopulationen, die unterschiedliche klassische Cadherine exprimieren, separate Aggregate bilden können, lieferte einen ersten Hinweis für eine homotypische Interaktion zwischen Cadherinmolekülen (Nose et al., 1988). Unabhängig voneinander konnte gezeigt werden, daß Cadherine lateral über ihre extrazellulären Bereiche parallel dimerisieren (Cis-Dimere oder "strand dimer"), und daß diese Cis-Dimere Voraussetzung für die Adhäsionsvermittlung sind (Briher et al., 1996; Chitav and Troyanovsky, 1998; Shapiro et al., 1995; Takeda et al., 1999). Somit sind die Cis-Dimere als funktionelle Einheiten der Cadherine anzusehen, die eine Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion über die Bildung sogenannter Trans-Dimere ("adhesive dimer") durch antiparallele Interaktion mit einem Cis-Dimer auf der gegenüberliegenden Zelle erst ermöglichen. Unklarheit besteht aber darüber, welche Cadherin-Domänen für die laterale Interaktion und welche für die Ausbildung von Trans-Dimeren verantwortlich sind. Abb. 4 faßt die Bildung

homotypischer Cadherin-Dimere und den Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Konformation der Cadherin-Ektodomäne am Beispiel eines klassischen Cadherins schematisch zusammen.

Untersuchungen des Adhäsionsverhaltens von chimären Proteinen, die aus unterschiedlich großen extrazellulären Anteilen von E- und P-Cadherin bestehen, führten zu der Annahme, daß die erste Cadherin-Domäne (EC1) für die Spezifität der Adhäsion allein verantwortlich ist (Nose et al., 1990). Insbesondere wurde dem in klassischen Cadherinen des Typs I konservierten HAV-Motiv eine besondere Rolle zugeschrieben (Blaschuk et al., 1990), jedoch zeigen neuere Arbeiten, in denen dieses Sequenzmotiv mutiert oder deletiert wurde, daß das HAV-Motiv die homotypische Interaktion nicht beeinflusst (Kitagawa et al., 2000; Renaud-Young and Gallin, 2002).



**Abb. 4: Modell der Cadherin-Interaktion.** Erst bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen weisen Cadherin-Ektodomänen eine rigide, perlschnurartige Konformation auf, die eine parallele Dimerisierung zu Cis-Dimeren ermöglicht. Cis-Dimere bilden bei weiterer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration antiparallele Trans-Dimere mit Cis-Dimeren auf einer gegenüberliegenden Zelle aus. Hierbei sind verschiedene Überlappungsgrade möglich. Die Zahlen von 1 bis 5 markieren die Cadherindomänen. EZ: extrazellulär, TM: transmembran und ZP: zytoplasmatisch.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der von Cadherinen vermittelten Zellaggregation konnte auf eine direkte Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an E-Cadherin (Ringwald et al., 1987), die eine Konformationsänderung des extrazellulären Anteils zur Folge hat (Pokutta et al., 1994), zurückgeführt werden. Pertz et al. zeigten (Pertz et al., 1999) an extrazellulären Anteilen des E-Cadherins mittels Elektronenmikroskopie, daß die Ausbildung von Cis-Dimeren bei geringerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $500 \mu\text{M}$ ) erfolgt als die Bildung von Trans-Dimeren ( $> 1 \text{ mM}$ ). Ob auch physiologisch die Adhäsionsfähigkeit von Cadherinen über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert wird, bleibt fraglich. Es gibt allerdings Hinweise, daß dies zumindest für neuronale Zellkontakte möglich ist. Für Nervenzellen des Hippocampus wurde beschrieben, daß eine elektrische Aktivität an den Synapsen

zu einer transienten Senkung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt, welche wiederum das Lösen von Cadherin-vermittelten Kontakten zwischen prä- und postsynaptischer Membran begünstigt (Murase and Schuman, 1999).

Durch Röntgenstrukturanalysen von Cadherin-Einzeldomänen erhoffte man sich ein detaillierteres Bild der Cadherin-Interaktion. Die Strukturdaten lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. So zeigte die Kristallstruktur der ersten Cadherin-Domäne (EC1) des N-Cadherins sowohl eine parallele als auch eine antiparallele Anordnung der Einzeldomänen, so daß die EC1 als verantwortlich für die Ausbildung von Trans-Dimeren angesehen wurde (Shapiro et al., 1995). Die parallele Interaktion zu einem Cis-Dimer wurde dem Tryptophan 2 (Trp2) der EC1 eines Cadherin-Monomers zugeschrieben, welches in eine hydrophobe Tasche der EC1 des benachbarten Cadherin-Monomers bindet. Das bereits beschriebene HAV-Motiv hingegen soll an der antiparallelen Bindung (Trans-Dimere) zweier EC1-Domänen beteiligt sein. Interessanterweise zeigen die Kristallstrukturen der ersten beiden Domänen (EC12) von N- und E-Cadherin diese antiparallele Anordnung nicht (Nagar et al., 1996; Tamura et al., 1998).

Die Kristallstruktur des gesamten extrazellulären Anteils des C-Cadherins ist mittlerweile aufgeklärt (Boggon et al., 2002). Zwar findet sich auch hier eine Interaktion von Trp2 mit der hydrophoben Tasche der EC1, jedoch stammt das Trp2 überraschenderweise nicht von einer Cis-Interaktion mit einer benachbarten Cadherindomäne sondern von einer Trans-Interaktion, bei der sich die N-terminalen Cadherin-Domänen parallel anlagern. Dies ist möglich, da der gesamte extrazelluläre Anteil des C-Cadherins um etwa  $90^\circ$  gekrümmt ist, so daß der in früheren Strukturanalysen definierte "Strand Dimer" nicht, wie zuvor angenommen, durch eine Cis- sondern durch eine Trans-Interaktion zweier EC1-Domänen entstehen könnte (Boggon et al., 2002).

Funktionelle Untersuchungen an Deletions-Konstrukten, die aus sukzessiv deletierten Cadherin-Domänen des C-Cadherins fusioniert an die IgG-Fc-Domäne bestehen, ergaben, daß EC1 notwendig jedoch nicht hinreichend für die homotypische Interaktion ist und daß mindestens drei Cadherin-Domänen inklusive EC1 für eine Adhäsionsvermittlung vorhanden sein müssen (Chappuis-Flament et al., 2001). Da die Adhäsionsstärke mit der Anzahl der Cadherin-Domänen ansteigt, ist davon auszugehen, daß jede einzelne Cadherin-Domäne ihren Anteil an der homotypischen Cadherin-Interaktion hat. Dies wurde auch durch biophysikalische Untersuchungen mittels eines "Surface-Force-Apparatus" an C-Cadherin bestätigt (Sivasankar et al., 1999). Hierbei wurden adhäsive und repulsive Oberflächenkräfte zwischen zwei gegenüberliegenden Membranen, an denen über Linker-Moleküle der gesamte extrazelluläre Anteil von C-Cadherin gerichtet gebunden wurde, als Funktion ihres Abstandes voneinander gemessen. Für C-Cadherin konnten so drei Energieminima in Abhängigkeit ihres Abstandes zueinander entdeckt werden (Sivasankar et al., 2001). Diese wurden als verschieden starke Überlappungsgrade von Trans-Interaktionen gedeutet,

wobei die stärkste Bindung bei einer vollständigen Verzahnung der Cadherin-Ektodomänen auftrat (s. auch Abb. 4).

Trotz zahlreicher Arbeiten bezüglich der Struktur und Funktion von Cadherinen gibt es noch kein einheitliches Modell zum Mechanismus der homotypischen Cadherin-Interaktion. Die Wichtigkeit der ersten Cadherin-Domäne (EC1) ist zwar unbestritten, jedoch lassen sich die Adhäsionseigenschaften der Cadherine nicht hierauf beschränken. Diesbezüglich stellt sich die Frage nach der Bedeutung einer unterschiedlichen Anzahl von Cadherin-Domänen, wie sie bei anderen Cadherin-Familien auftritt. So variiert die Anzahl der Cadherin-Domänen innerhalb der Cadherin-Superfamilie zwischen 2 und 34 (Nollet et al., 2000).

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob die zwei zusätzlichen Domänen der 7D-Cadherine funktionelle Bedeutung haben oder ob die große Anzahl von Cadherinen eine extrazelluläre Strukturänderung notwendig gemacht hat, um die Spezifität der einzelnen Cadherin-Interaktionen zu gewährleisten? Des Weiteren ist unklar, ob sich die Adhäsionseigenschaften der 7D-Cadherine aufgrund der Mehrzahl von Cadherin-Domänen und der fehlenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen zwischen EC2 und EC3 von denen der klassischen Cadherine unterscheiden.

### **1.6 Regulation der Cadherin-Interaktion**

Eine Regulation der Zelladhäsion ist notwendig, damit sich Zellen an die sich ständig verändernde Umgebung anpassen können, aber auch damit sie dynamische morphogenetische Prozesse, wie Zellteilung und -migration, umsetzen können (Webb et al., 2002). Hierfür müssen Kontakte zwischen Zellen schnell auf- und abgebaut werden. Als Beispiele seien hier nur die Kontrolle des parazellulären Durchtritts von Makromolekülen und Lymphozyten durch das Endothel (Vestweber, 2002) und die Beteiligung von Cadherinen bei der Keimblattentstehung während der Embryonalentwicklung des Krallenfroschs, *Xenopus laevis* (Detrick et al., 1990), erwähnt.

Die Regulation der Zelladhäsion auf molekularer Ebene kann auf zwei Arten erfolgen; zum einen durch Signaltransduktionswege, welche die Expression, Lokalisation und Funktion der Adhäsionsmoleküle beeinflussen, zum anderen durch eine Modulation des Interaktionsmechanismus selbst, wie einer Änderung der Spezifität oder der Adhäsionsstärke (Gumbiner, 2000; Yap et al., 1997).

Auf die Aspekte der Adhäsionsregulation über Signalwege, die im Zusammenhang mit der Umgestaltung und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts stehen, wird hier nicht weiter eingegangen, jedoch auf zwei Übersichtsartikel verwiesen (Braga, 2002; Jamora and Fuchs, 2002). Für das Verständnis der vorliegenden Arbeit sind Regulationsmechanismen, die direkt auf die Adhäsionseigenschaften von Cadherin-Ektodomänen wirken, von größerem Interesse.

Die Anzahl der Cadherinmoleküle auf der Zelloberfläche, gesteuert durch die Expressionsrate, ist ein wesentlicher Regulationsmechanismus. So haben Änderungen der Expressionsrate von

Cadherinen auch Veränderungen der Zelladhäsionsstärke zur Folge (Angres et al., 1996; Steinberg and Takeichi, 1994). Allerdings kann die Zelladhäsivität auch bei gleichbleibender Expressionsrate der Cadherine moduliert werden (Briher and Gumbiner, 1994; Vestweber et al., 1987). Dies ist durch das sogenannte "laterale Clustering" möglich (s. auch 1.5). Die Dimerisierung zweier benachbarter Cadherinmoleküle zu Cis-Dimeren, den funktionellen Einheiten der Cadherine (Briher et al., 1996; Takeda et al., 1999), aber auch die Konzentration von Adhäsionsmolekülen in spezialisierten Membranbereichen (Adams et al., 1998; Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996), verstärkt die Adhäsivität zwischen Zellen.

Ein alternativer Mechanismus zur schnellen Veränderung der Cadherinfunktion ist entweder durch die Modulierung der Affinitätseigenschaften von Cadherinmolekülen oder durch eine Koexpression von Cadherinen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften gegeben. Dieser Mechanismus war bis vor wenigen Jahren experimentell nur schwer zugänglich, da er sich auf Einzelmolekülebene abspielt. Erst mit Anwendung neuerer biophysikalischer Methoden, wie der Rasterkraftmikroskopie (AFM, "Atomic Force Microscopy"), der Verwendung optischer Pinzetten ("laser tweezer") oder der Plasmon-Resonanz (SPR, "Surface Plasmon Resonance"), können Bindungsstärken, Lebensdauer und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von Cadherin-Interaktionen genauer untersucht werden (Baumgartner et al., 2000a; Baumgartner et al., 2003; Sivasankar et al., 1999).

Experimente mit Einzelmolekülen von C- und VE-Cadherin lassen auf eine multivalente niederaffine Interaktion zwischen klassischen Cadherinen schliessen. Hierbei wurden Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich und eine Lebensdauer der Cadherin-Interaktion von etwa 0,5 s gemessen (Baumgartner et al., 2000a; Chappuis-Flament et al., 2001). Ob sich die Bindungseigenschaften von Cadherinen verschiedener Subfamilien unterscheiden und wie sich die Affinitätseigenschaften eines Cadherinmoleküls modulieren lassen, ist bislang nur unzureichend untersucht.

### **1.7 Fragestellung der Arbeit**

LI- und Ksp-Cadherin bilden zusammen die Familie der 7D-Cadherine. Sie lassen sich bezüglich der sieben extrazellulären Cadherin-Domänen und des kurzen zytoplasmatischen Anteils strukturell klar von anderen Cadherin-Familien abgrenzen. Ob sich die 7D-Cadherine aufgrund ihrer strukturellen Besonderheiten auch funktionell von anderen Cadherin-Familien, insbesondere den koexprimierten klassischen Cadherinen, unterscheiden, ist Thema dieser Arbeit.

LI-Cadherin interagiert im Gegensatz zu klassischen Cadherinen nicht über  $\beta$ -Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett, vermittelt aber Zell-Zell-Aggregation. Hierzu ist es auch in der Lage, wenn es nur über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist. Über die Funktion von Ksp-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül war zu Beginn der Arbeiten nichts bekannt.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit die Beantwortung folgender Fragestellungen:

#### **1. Besitzen LI- und Ksp-Cadherin gemeinsame funktionelle Eigenschaften?**

Die Funktion von Ksp-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül soll in Zellkulturexperimenten nachgewiesen und mögliche Auswirkungen der Ksp-Cadherin-Expression auf das Zytoskelett untersucht werden. Ob Ksp-Cadherin, ähnlich wie LI-Cadherin, keine Bindung zu  $\beta$ -Catenin zeigt, ist ein weiterer Untersuchungsgegenstand. Hierzu sollen stabil transfizierte CHO-Zellen hergestellt werden, die Ksp-, LI- und E-Cadherin exprimieren. Diese sollen in zu etablierenden Zellaggregationsassays im Hinblick auf den Einfluß der Ksp-Cadherin-Expression untersucht werden.

#### **2. Unterscheiden sich die Bindungseigenschaften der 7D-Cadherine von denen klassischer Cadherine?**

Zur Klärung dieser Frage soll das Bindungsverhalten am Beispiel von LI-Cadherin mittels zellbiologischer und biophysikalischer Methoden analysiert werden. Zu diesem Zweck sollen Fusionsproteine, die aus dem extrazellulären Anteil von LI-Cadherin und der humanen IgG-Fc-Domäne bestehen (LI-Fc), und eine Deletionsmutante dieses Fusionsproteins, der die Cadherin-Domänen 2 und 3 fehlen ( $\Delta$ 23LI-Fc), hergestellt werden. Das chimäre Protein LI-Fc soll auf Mikroperlen immobilisiert und in Verbindung mit Cadherin-transfizierten CHO-Zellen für die Methode der Laserpinzette und zusätzlich im Rasterkraftmikroskop (AFM) eingesetzt werden. So sollen die Bindungsparameter der homotypischen LI-Cadherin-Interaktion bestimmt werden.

#### **3. Gibt es heterotypische Interaktionen von 7D-Cadherinen mit anderen Cadherinen?**

Um die Spezifität der 7D-Cadherin-Interaktion zu analysieren, wird das rekombinante LI-Fc-Konstrukt in Kombination mit eukaryonten Zellen, die verschiedene Cadherine exprimieren, aber auch mit anderen Cadherin-Fc Konstrukten mittels biophysikalischer Methoden untersucht. Mögliche heterotypische LI-Cadherin-Interaktionen sollen hinsichtlich ihrer Spezifität und zytoplasmatischer Verankerung charakterisiert werden.