

### 3 Ergebnisse

Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen sich in drei Bereiche gliedern. Der erste Bereich befaßt sich mit der Funktionsuntersuchung von Ksp-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül und dessen Einfluß auf die Zellmorphologie sowie auf Komponenten des Zytoskeletts von CHO-Zellen. Im zweiten Teil werden die Herstellung von LI-Cadherin-Fc Fusionsproteinen und die damit analysierten Bindungseigenschaften der LI-Cadherin-Trans-Interaktion beschrieben. Der abschließende Bereich behandelt die heterotypische Interaktion von LI- mit E-Cadherin, die in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen wurde.

#### 3.1 Analyse der zelladhäsiven Eigenschaften von Ksp-Cadherin

##### 3.1.1 Stabile Expression von Ksp-, LI- und E-Cadherin in CHO-Zellen

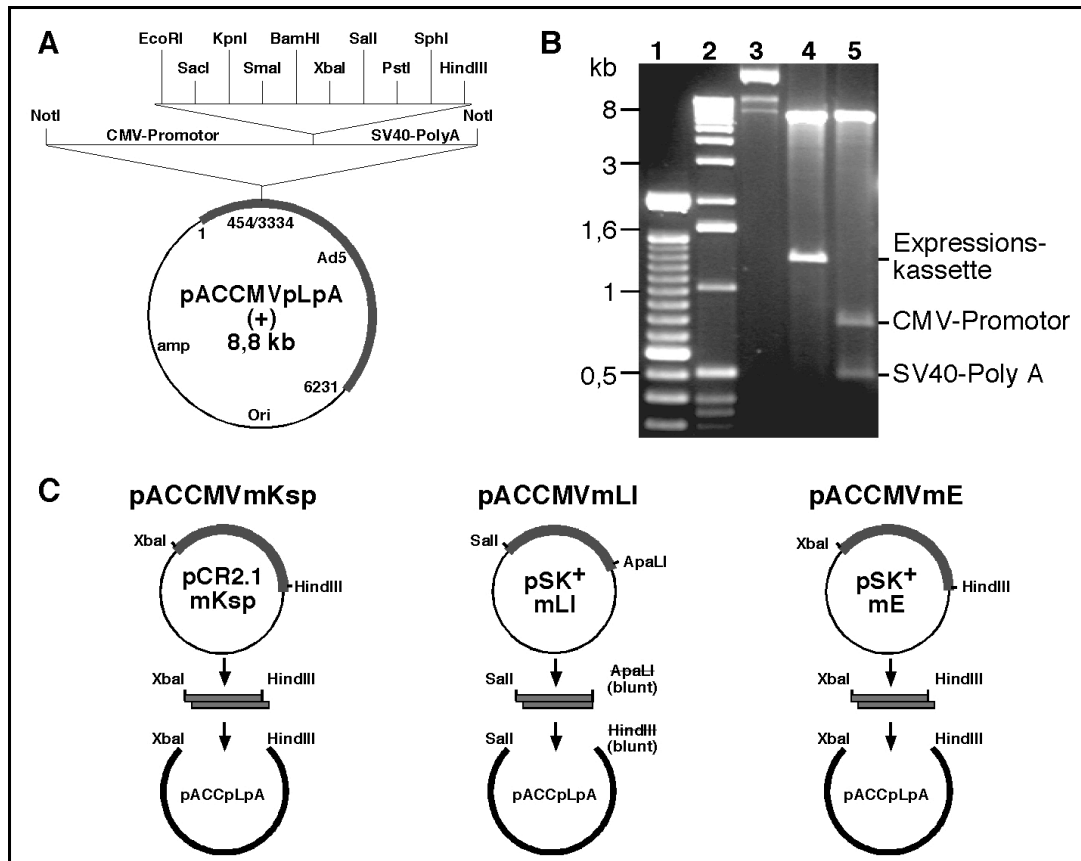
LI- und Ksp-Cadherin, die beiden Vertreter der 7D-Cadherine, zeigen gemeinsame strukturelle Merkmale, die sie von den klassischen Cadherinen unterscheiden. Für LI-Cadherin konnte bereits eine zelladhäsive Wirkung in Zellkultorexperimenten nachgewiesen werden (Berndorff et al., 1994; Kreft et al., 1997), jedoch wurde die Funktion von Ksp-Cadherin bislang nicht analysiert. Ob Ksp-Cadherin, ähnlich wie LI- und E-Cadherin, in der Lage ist Zellaggregation zu vermitteln, wurde hier an stabil transfizierten CHO-Zellen untersucht.

##### 3.1.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

Zur Expression von Ksp-, LI- und E-Cadherin in eukaryonten Zellen wurde jeweils die komplette codierende Region der murinen cDNA in die Expressionskassette des Vektors pACCMVpLpA (Gomez-Foix et al., 1992) ligiert. Dieser Expressionsvektor hat den Vorteil, daß er sich auch zur Herstellung rekombinanter Adenoviren verwenden läßt. In Abb. 7 ist der Expressionsvektor pACCMVpLpA schematisch dargestellt (A) und im Agarosegel mittels Restriktionsanalyse charakterisiert (B). Seine Expressionskassette besteht aus dem CMV-Promotor mit einer Länge von 760 bp (Thomsen et al., 1984), dem pUC19-Polylinker mit etwa 50 bp und der SV40-PolyA-Signalsequenz von 470 bp Länge (Van Doren and Gluzman, 1984). Insgesamt besitzt der Vektor eine Größe von 8,8 kb, von denen etwa 3350 bp Teilsequenzen aus dem Genom des Adenovirus Typ 5 sind (Gerard and Meidell, 1995).

Abb. 7C zeigt die Klonierungsstrategie für die drei Expressionsvektoren. Die cDNA des murinen Ksp-Cadherins wurde mittels der Restriktionsendonukleasen XbaI und HindIII aus dem Vektor pCR2.1mKsp (Hecking, 2002) isoliert (2,9 kb-Fragment) und nach Aufreinigung in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geöffneten pACCMVpLpA gerichtet einkloniert. Der Vektor pSK<sup>+</sup>mLI (Angres et al., 2001) wurde zunächst mit ApaLI linearisiert, bevor die Überhänge

aufgefüllt und der linearisierte Vektor aufgereinigt wurde. Nun wurde die murine cDNA (2,6 kb-Fragment) mit der Restriktionsendonuklease SalI isoliert und in die SalI- und aufgefüllte HindIII-Schnittstelle des pACCMVpLpA ligiert. Der Vektor pSK<sup>+</sup>mE (freundlicherweise von Dr. O. Huber zur Verfügung gestellt) wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und HindIII inkubiert. Das so gewonnene 2,7 kb-Fragment enthielt die murine E-Cadherin cDNA und wurde mit den gleichen Schnittstellen nach Isolierung und Aufreinigung in den Vektor pACCMVpLpA ligiert.



**Abb. 7: Konstruktion der Expressionsvektoren für Ksp-, LI und E-Cadherin.** Als Expressionsvektor wurde pACCMVpLpA (A) verwendet, der im analytischen Agarosegel durch Restriktionsverdau charakterisiert wurde (B). Der Vektor pACCMVpLpA besitzt eine Expressionskassette bestehend aus einem CMV-Promotor, einem Polylinker und einer SV40-PolyA-Signalsequenz. Die gesamte Expressionskassette konnte mit NotI isoliert und diese mit einem Doppelverdau von NotI und EcoRI in den CMV-Promotor und die SV40-PolyA-Signalsequenz zerlegt werden; 1: 100bp-Marker, 2: 1kb-Marker, 3: pACCMVpLpA, 4: pACCMVpLpA/NotI, 5: pACCMVpLpA/NotI/EcoRI. In (C) ist die Subklonierungsstrategie für die Ksp-, LI- und E-Cadherin cDNA schematisch dargestellt. Die zur Subklonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen sind angegeben.

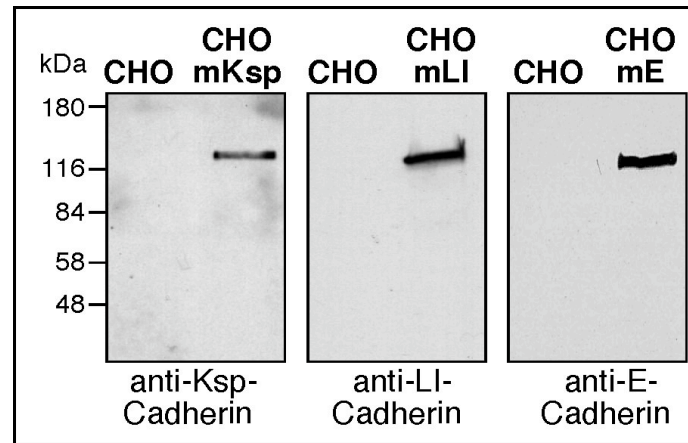
Alle Expressionsvektoren wurden zunächst in Bakterien amplifiziert, um größere Mengen DNA aufzureinigen zu können. Sodann wurden sämtliche Konstrukte durch Sequenzierung beider DNA-Stränge überprüft. Die hier beschriebenen Expressionsvektoren wurden als pACCMVmKsp, pACCMVmLI und pACCMVmE bezeichnet.

### ***3.1.1.2 Stabile Expression der Cadherine in CHO-Zellen***

Um die Funktion von Ksp-Cadherin mit der von LI- und E-Cadherin vergleichen zu können, wurden die drei Cadherine jeweils in eukaryonten Zellen stabil exprimiert. Hierfür wurden CHO-Zellen (Puck, 1958) verwendet, da diese schon mehrfach erfolgreich zur Untersuchung der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion eingesetzt wurden und keine detektierbare Expression von Cadherinen aufweisen (Niessen and Gumbiner, 2002; Salomon et al., 1992). Des Weiteren exprimieren CHO-Zellen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin, die beide für die Interaktion von E-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett notwendig sind (Ozawa et al., 1989; Rimm et al., 1995).

Um ein gleichmäßig hohes Expressionsniveau der Cadherine in CHO-Zellen zu erreichen, wurden diese stabil transfiziert und auf eine starke Expression von Ksp-, LI- bzw. E-Cadherin selektioniert. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz GeneJammer™ von Stratagene (Heidelberg). Um den Erfolg der Transfektion zu kontrollieren, wurden CHO-Zellen parallel mit dem Reporterplasmid pEGFP-C1 transfiziert, wobei ein bis zwei Tage nach erfolgreicher Transfektion die Expression von GFP (Green Fluorescence Protein) im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Nach einer Selektion der Zellen für 2-3 Wochen wurden G418-resistente Klone subkloniert und im Immunoblot bezüglich der Expression von Ksp-, LI- und E-Cadherin getestet.

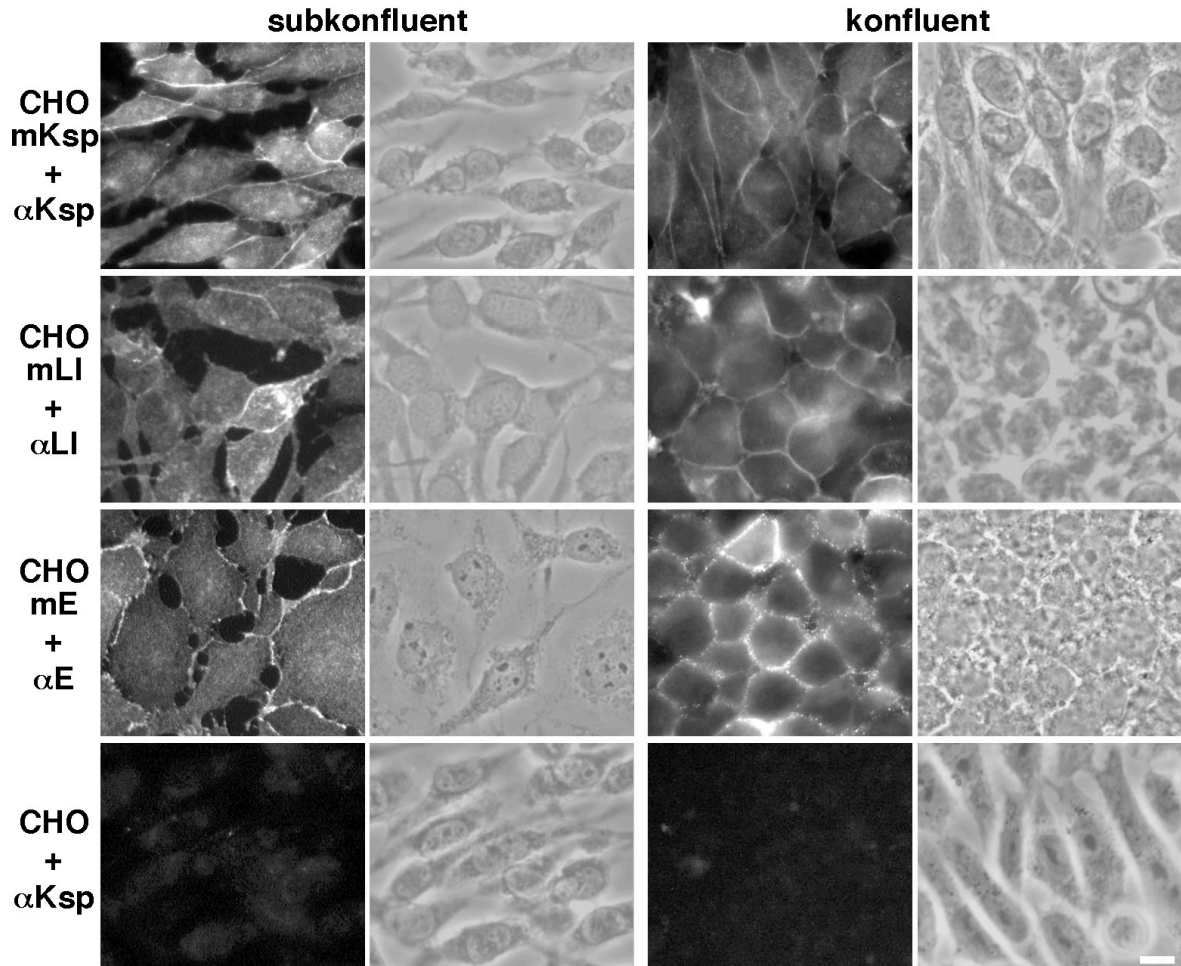
Abb. 8 zeigt das Ergebnis von Immunoblots, bei denen Zellysate von Primärklonen, die entweder mit pACCMVmKsp, pACCMVmLI oder pACCMVmE transfiziert worden waren, im Vergleich zu untransfizierten CHO-Zellen hinsichtlich der Expression von Ksp-, LI- und E-Cadherin untersucht wurden. Ksp-, LI- und E-Cadherin konnten mit spezifischen Antikörpern in den jeweiligen transfizierten CHO-Zellen nachgewiesen werden und zeigten wie erwartet molekulare Massen von jeweils etwa 120 kDa. Untransfizierte CHO-Zellen zeigten keine nachweisbare Expression von Ksp-, LI- oder E-Cadherin und auch keine Kreuzreaktion mit einem der verwendeten Antikörper. Die Primärantikörper gegen Ksp-, LI- und E-Cadherin erwiesen sich im Immunoblot als spezifisch, da sie auch mit den jeweils anderen Cadherinen nicht kreuzreagierten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 8: Nachweis der Expression von Ksp-, LI- und E-Cadherin in CHO-Zellen.** Gesamtproteinlysate (10 µg pro Spur) von untransfizierten CHO-Zellen (CHO) und von pACCMVmKsp-, pACCMVmLI- oder pACCMVmE-transfizierten CHO-Zellen (CHOmKsp, CHOmLI, CHOmE) wurden einer SDS-PAGE unterzogen und im Immunoblot auf Expression der jeweiligen Cadherine getestet. Die Größen des Molekulargewichtsstandards in Kilodalton (kDa) sind angegeben.

Es zeigte sich, daß die Transfektion und anschließende Selektion der Klone erfolgreich war und CHO-Zelltypen hergestellt werden konnten, die Ksp-, LI- oder E-Cadherin stabil exprimieren. Diese werden im folgenden als CHOmKsp, CHOmLI und CHOmE bezeichnet.

Die subzelluläre Lokalisation von Ksp-, LI- und E-Cadherin in den CHO-Zellen und der Einfluß der Cadherine auf die Zellmorphologie wurde bei verschiedenen Zelldichten mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Abb. 9 zeigt Immunfluoreszenz-Aufnahmen (erste und dritte Spalte) und die korrespondierenden Phasenkontrast-Aufnahmen (zweite und vierte Spalte) von Ksp-, LI- und E-Cadherin-exprimierenden sowie untransfizierten CHO-Zellen. Während Ksp- und LI-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen im subkonfluenten Zustand den spindelförmigen Phänotyp der untransfizierten CHO-Zellen aufweisen, zeigen CHOmE-Zellen eine Ausdehnung des Zellkörpers, der mit einer Maximierung der Zellkontakte verbunden ist. Allen Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen ist gemeinsam, daß die jeweiligen Cadherine in den Kontaktbereichen zu Nachbarzellen konzentriert sind. Im konfluenten Zustand ist der morphologische Unterschied zwischen den 7D-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen und den CHOmE-Zellen weniger deutlich ausgeprägt. Während untransfizierte CHO-Zellen im konfluenten Zustand ihre Spindelform weitgehend beibehalten, zeigen konfluent gewachsene CHOmKsp-, CHOmLI- und CHOmE-Zellen eine kompakte, globuläre Morphologie mit einer Konzentration der jeweiligen Cadherine in den Plasmamembranbereichen. Dieser Phänotyp ist bei den CHOmE-Zellen am deutlichsten ausgeprägt, wobei E-Cadherin in zahlreichen *Punctae* (McNeill et al., 1993) entlang der Zellgrenzen konzentriert vorliegt.



**Abb. 9: Lokalisation von Ksp-, LI- und E-Cadherin in CHO-Zellen.** Immunfluoreszenz-Aufnahmen (erste und dritte Spalte) und korrespondierende Phasenkontrast-Aufnahmen (zweite und vierte Spalte) von Ksp-, LI- und E-Cadherin-exprimierenden sowie parentalen CHO-Zellen, die mit den angegebenen Antikörpern inkubiert wurden. Die Immunfluoreszenz wurde mit den gleichen Primärantikörpern durchgeführt, die auch zur Detektion der verschiedenen Cadherine im Immunoblot verwendet wurden (Abb. 8) und sind hier als  $\alpha$ Ksp,  $\alpha$ LI und  $\alpha$ E bezeichnet. Untransfizierte CHO-Zellen wurden zur Kontrolle gegen Ksp-Cadherin gefärbt ( $\alpha$ Ksp). Größenmarker, 10  $\mu$ m.

Untransfizierte CHO-Zellen zeigen keine detektierbaren Signale bei Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen Ksp-Cadherin (Abb. 9, CHO +  $\alpha$ Ksp). Wie schon im Immunoblot (Abb. 8) sind untransfizierte CHO-Zellen auch in der Immunfluoreszenz negativ für LI- und E-Cadherin (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.2 Analyse der Ksp-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen

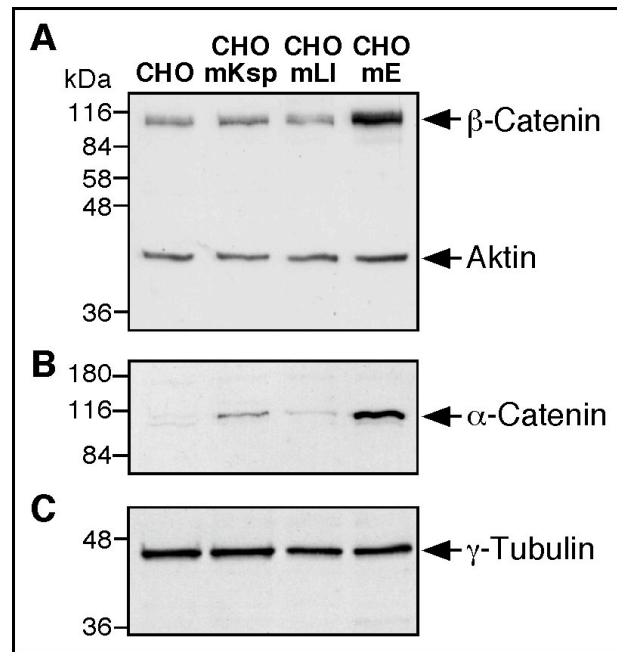
#### 3.1.2.1 Einfluß der Expression von Ksp-Cadherin auf das Zytoskelett

Klassische Cadherine zeigen eine Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett über die Armadillo-Proteine  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin und führen bei Überexpression zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Konzentration dieser Proteine (Ozawa and Kemler, 1998; Rimm et al., 1995). Für LI-Cadherin konnte bereits in metabolisch markierten L-Zellen nachgewiesen werden, daß keine Interaktion mit  $\beta$ - oder  $\alpha$ -Catenin stattfindet (Kreft et al., 1997). Ksp-Cadherin wurde hinsichtlich einer zytoplasmatischen Verankerung noch nicht untersucht.

Der Einfluß der in CHO-Zellen überexprimierten Cadherine auf die Konzentration verschiedener Zytoskelett-Proteine wurde im Western Blot analysiert. Jeweils 10  $\mu$ g Gesamtprotein der Zellysate wurden pro Spur aufgetragen und im Western Blot bezüglich der Expressionsstärke von  $\beta$ -Catenin,  $\alpha$ -Catenin, Aktin und  $\gamma$ -Tubulin analysiert. In Abb. 10A ist zu sehen, daß trotz vergleichbarer Gesamtproteinmengen die  $\beta$ -Catenin-Konzentrationen für die diversen CHO-Zelltypen variierten. Die stabile Expression von LI-Cadherin in CHO-Zellen verglichen mit untransfizierten CHO-Zellen zeigte keinen Einfluß auf die  $\beta$ -Catenin-Konzentration. Die Überexpression von E-Cadherin hingegen führte zu einem deutlichen Anstieg der  $\beta$ -Catenin-Menge im Vergleich zu untransfizierten und LI-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen. Interessanterweise wiesen Ksp-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen einen geringen aber reproduzierbaren Anstieg der  $\beta$ -Catenin-Menge auf. Dieses Ergebnis ließ sich auch für verschiedene Primärklone von CHOmKsp reproduzieren. Der Anteil von Aktin am Gesamtprotein blieb für alle untersuchten Zelllinien nahezu unverändert (Abb. 10A).

Wie für  $\beta$ -Catenin zeigte sich auch für  $\alpha$ -Catenin ein vergleichbarer Einfluß der Cadherin-Expression in CHO-Zellen (Abb. 10B). Auch hier blieb die  $\alpha$ -Catenin-Konzentration für LI-Cadherin-exprimierende Zellen im Vergleich zu untransfizierten CHO-Zellen unverändert. CHOmE-Zellen wiesen einen deutlichen und CHOmKsp-Zellen ein geringeren aber ebenfalls reproduzierbaren Anstieg der  $\alpha$ -Catenin-Konzentration auf. In Abb. 10C wurde als weitere Kontrolle der Anteil der  $\gamma$ -Tubulin-Menge am Gesamtproteingehalt untersucht. Dieser war in den untersuchten Zelllinien vergleichbar.

**Abb. 10: (nächste Seite) Einfluß der Cadherin-Expression auf Komponenten des Zytoskeletts.** Der Anteil von Komponenten des Zytoskeletts am Gesamtproteingehalt von untransfizierten CHO-Zellen und von CHO-Zellen, die Ksp-, LI- und E-Cadherin exprimieren, wurde im Immunoblot untersucht. Pro Tasche wurden 10  $\mu$ g Gesamtproteinlysate der jeweiligen CHO-Zellen aufgetragen und einem Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin und Aktin (A), gegen  $\alpha$ -Catenin (B) und gegen  $\gamma$ -Tubulin (C) unterzogen. Die Immunoblots entstammen einem Blotvorgang. Die Membran wurde entsprechend den molekularen Massen der zu detektierenden Proteine vor der Antikörperinkubation zerschnitten. Die Zytoskelettkomponenten konnten in allen Zellen nachgewiesen werden und zeigten die erwarteten relativen Molekulargewichte,  $\beta$ -Catenin (94 kDa), Aktin (42 kDa),  $\alpha$ -Catenin (102 kDa) und  $\gamma$ -Tubulin (46 kDa). Die Größen des Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

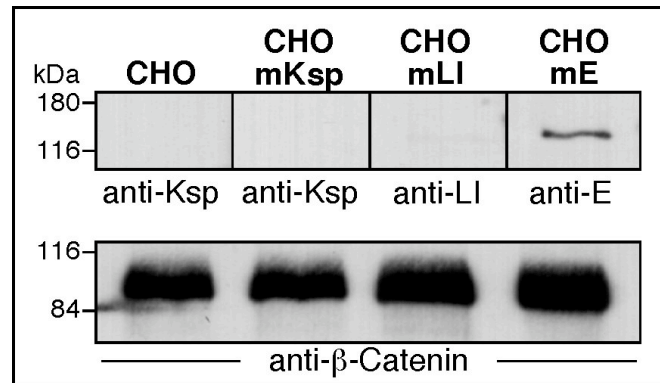


**Abb. 10:** Einfluß der Cadherin-Expression auf Komponenten des Zytoskeletts.

Der Einfluß der E-Cadherin-Expression auf die  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin-Konzentration ließ sich in transfizierten CHO-Zellen genauso bestätigen wie das Ergebnis, daß eine Überexpression von LI-Cadherin die  $\beta$ -Catenin-Menge nicht verändert. Der leichte Anstieg von  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin in Ksp-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen gegenüber untransfizierten CHO-Zellen wird im folgenden weiter untersucht.

### 3.1.2.2 Interaktion der Cadherine mit $\beta$ -Catenin

Um zu überprüfen, ob der Einfluß der Ksp-Cadherin Expression auf die Konzentration von  $\beta$ -Catenin in CHO-Zellen in einer direkten Interaktion beider Proteine begründet liegt, wurde mittels Koimmunpräzipitation mit anti- $\beta$ -Catenin-Antikörpern in den jeweiligen CHO-Zellen eine potentielle Interaktion der diversen Cadherine mit  $\beta$ -Catenin untersucht. Für E-Cadherin wurde die direkte Interaktion mit  $\beta$ -Catenin mittels Koimmunpräzipitation mehrfach nachgewiesen (Ilyas et al., 1997; Ozawa and Kemler, 1998b), während für LI-Cadherin in transfizierten L-Zellen eine Interaktion mit  $\beta$ -Catenin ausgeschlossen wurde (Kreft et al., 1997). In Abb. 11 sind die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation der jeweiligen Cadherine mit  $\beta$ -Catenin in den CHO-Zellen dargestellt.



**Abb. 11: Koimmunpräzipitation mit  $\beta$ -Catenin aus CHO-Zellen.** Zellysate von untransfizierten CHO-Zellen und von CHO-Zellen, die Ksp-, LI- und E-Cadherin stabil exprimieren, wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin und mit Protein A-Sepharose inkubiert. Die Präzipitate wurden im Immunoblot auf Anwesenheit der angegebenen Cadherine (oben) und auf  $\beta$ -Catenin-Anwesenheit (unten) getestet.

In allen Ansätzen ließ sich  $\beta$ -Catenin aus den CHO-Zellen präzipitieren, jedoch fand eine Koimmunpräzipitation nur für E-Cadherin statt. Unter den Bedingungen, bei denen eine Interaktion von E-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden konnte, ließ sich eine Interaktion von Ksp- oder LI-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin nicht zeigen.

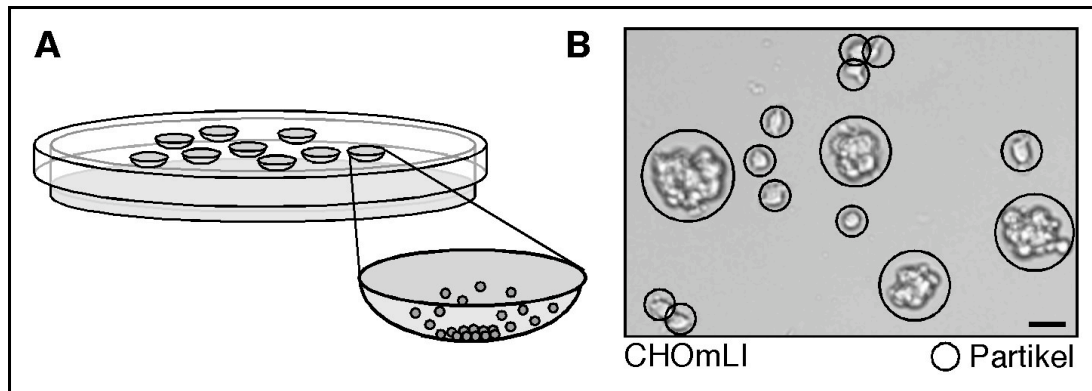
### 3.1.3 Funktion von Ksp-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül

#### 3.1.3.1 Verhalten von Ksp-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen im Aggregationsassay

Die Funktion von Ksp-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül wurde mit den in 3.1.1 beschriebenen Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen in Zellaggregationsassays untersucht und ihr Aggregationsverhalten quantifiziert. Um die Interaktion von Zellen unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurde der Aggregationsassay im hängenden Tropfen ("hanging drop", (Potter and Morris, 1985; Redfield et al., 1997)) etabliert. In Abb. 12 ist das Prinzip dieses Aggregationsassays (A) und seine quantitative Auswertung (B) erläutert. Eine definierte Anzahl von Zellen ( $10^3$ ) wird hierbei in einem kleinen Volumen Zellkultur-Medium ( $10 \mu\text{l}$ ) auf die Innenseite des Deckels einer mit PBS gefüllten Petrischale pipettiert und im Brutschrank unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Aufgrund der Schwerkraft sammeln sich die Zellen am tiefsten Punkt und können dreidimensionale Zellverbände ausbilden.



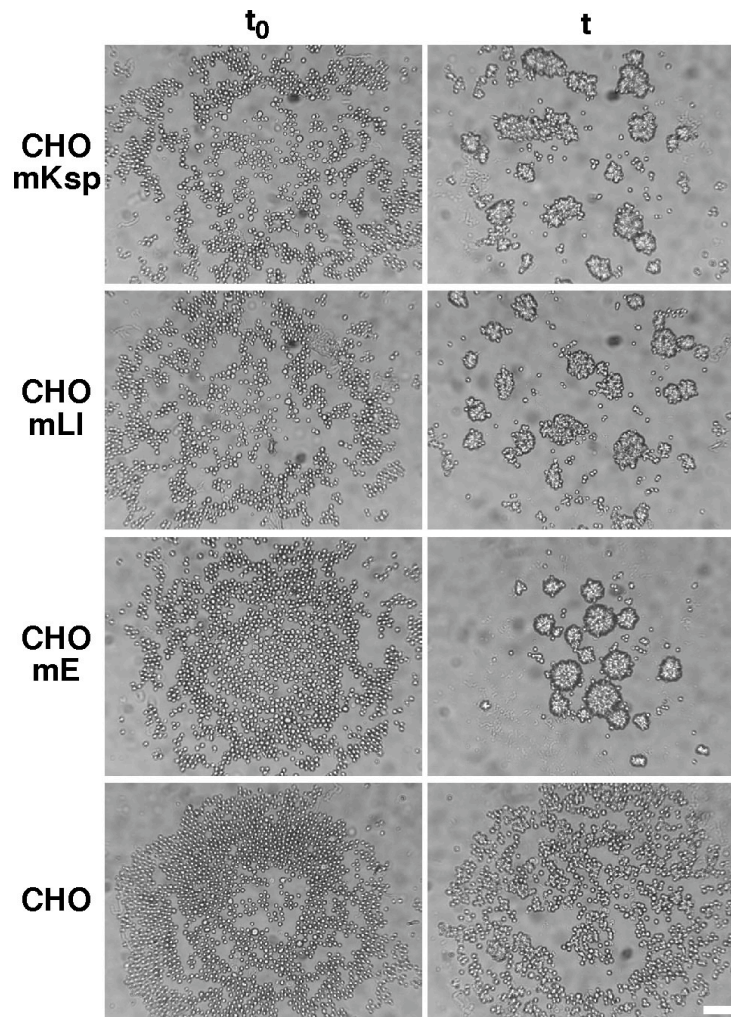
Durch das Auszählen von Einzelzellen und Aggregaten zu Beginn und nach einer definierten Zeitspanne läßt sich das Maß der Zellaggregation als Abnahme der Partikelzahl bestimmen. Hierbei werden Einzelzellansammlungen von bis zu 4 Zellen als 4 einzelne Partikel gezählt, während Zellcluster mit 5 und mehr Zellen als ein Partikel gewertet werden.



**Abb. 12: Prinzip des Aggregationsassays im hängenden Tropfen.** Abb. A zeigt schematisch den Aggregationsassay im hängenden Tropfen. In einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  wurden 1000 Zellen auf die Deckelunterseite einer mit PBS gefüllten Petrischale pipettiert und für 16 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach 15 min ( $t_0$ ) und nach 16 h ( $t$ ) wurden mindestens drei Tropfen pro Experiment und Zelltyp fotografiert und ausgewertet. Abb. B verdeutlicht am Beispiel von CHOmLI nach einer Inkubation von 16 h ( $t$ ) die Quantifizierung des Aggregationsassays. Einzelzellansammlungen von bis zu vier Zellen wurden als vier Partikel gezählt, Aggregate bestehend aus fünf und mehr Einzelzellen wurden als ein Partikel gewertet. Die Quantifizierung erfolgte nach der Formel  $1-(N_t/N_0)$ , wobei  $N_t$  die Anzahl der Partikel nach 16 h und  $N_0$  die Anzahl der Partikel nach 15 min angab (Nagafuchi and Takeichi, 1988). Größenmarker, 20  $\mu\text{m}$ .

Der Einfluß von nicht zu spezifizierenden Wechselwirkungen zwischen den Zellen auf das Ergebnis der quantitativen Auswertung sollte so minimiert werden.

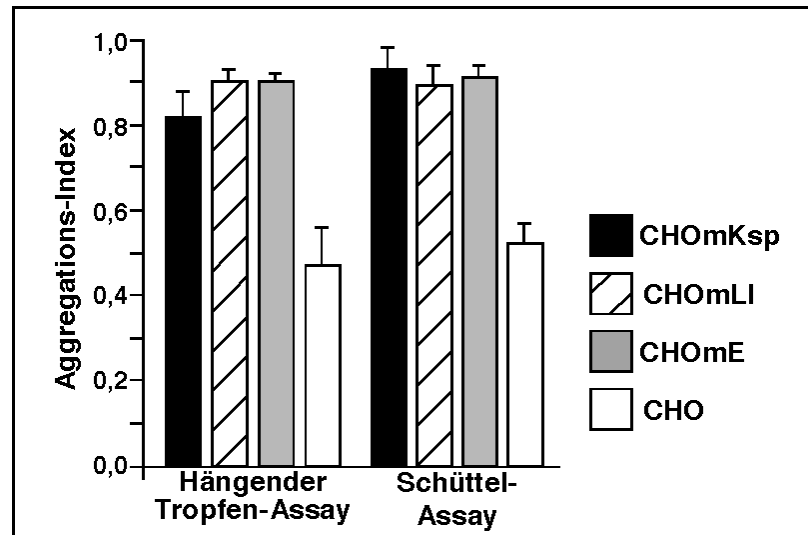
Abb. 13 zeigt Aufnahmen eines repräsentativen Aggregationsassays im hängenden Tropfen für die Cadherin-transfizierte und untransfizierte CHO-Zellen 15 min nach dem Ausbringen der Zellen ( $t_0$ ) und nach 16 h Inkubation ( $t$ ). Im Gegensatz zu untransfizierten CHO-Zellen (CHO), die nur wenige und kleinere Aggregate aufwiesen, war eine deutliche Ausbildung von dreidimensionalen Aggregaten bei transfizierten CHO-Zellen, die Ksp-, LI- oder E-Cadherin stabil exprimieren, zu erkennen. Die stabile Expression von Ksp-Cadherin vermittelte also eine Aggregation von CHO-Zellen im hängenden Tropfen, die sich mit der Wirkung von LI- und E-Cadherin auf CHO-Zellen im selben Assay vergleichen ließ. Auffallend war hier jedoch die kompakte globuläre Morphologie der Aggregate von E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen im Vergleich zu Ksp- oder LI-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen, die eher unregelmäßige Aggregate ohne klare Umgrenzung ausbildeten.



**Abb. 13: Aggregationsverhalten von CHOmKsp, CHOmLI, CHOmE und CHO-Zellen im hängenden Tropfen.** Das Aggregationsverhalten von Ksp-, LI- und E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen sowie von untransfizierten CHO-Zellen wurde im hängenden Tropfen getestet. Je ein Tropfen pro Zelllinie wurde 15 min ( $t_0$ ) und 16 h ( $t$ ) nach dem Ausbringen fotografiert. Größenmarker, 100  $\mu\text{m}$ .

In vielen Arbeiten wurden Aggregationsassays durchgeführt, die auf einer horizontalen Rotation beruhen, um die Wahrscheinlichkeit von Zell-Zell-Kontakten zu erhöhen (Kawano et al., 2002; Takeda et al., 1999). Um die Aussagekraft des Aggregationsassays im hängenden Tropfen einschätzen zu können, wurde dieser mit einem Schüttelassay verglichen. Der Aggregationsassay im hängenden Tropfen ist in Abb. 14 im Vergleich mit einem Schüttelassay, bei dem die Zellen für die Dauer der Inkubation einer horizontalen Rotation unterzogen wurden, für die verschiedenen CHO-Zelltypen quantifiziert. Hierbei stammen die Zellen, die in den parallel durchgeführten Assays eingesetzt wurden, aus jeweils identischen Ansätzen. Die Ergebnisse von drei Aggregationsassays im hängenden Tropfen verglichen mit den Ergebnissen von drei Schüttelassays wurden hier zusammengefasst. Beide Assays zeigten für nicht transfizierter CHO-Zellen eine Grundaggregation

mit einem Aggregations-Index von 0,5. Der Aggregations-Index der Cadherin-transfizierten CHO-Zellen lag mit 0,8 bis 0,9 jedoch deutlich höher.



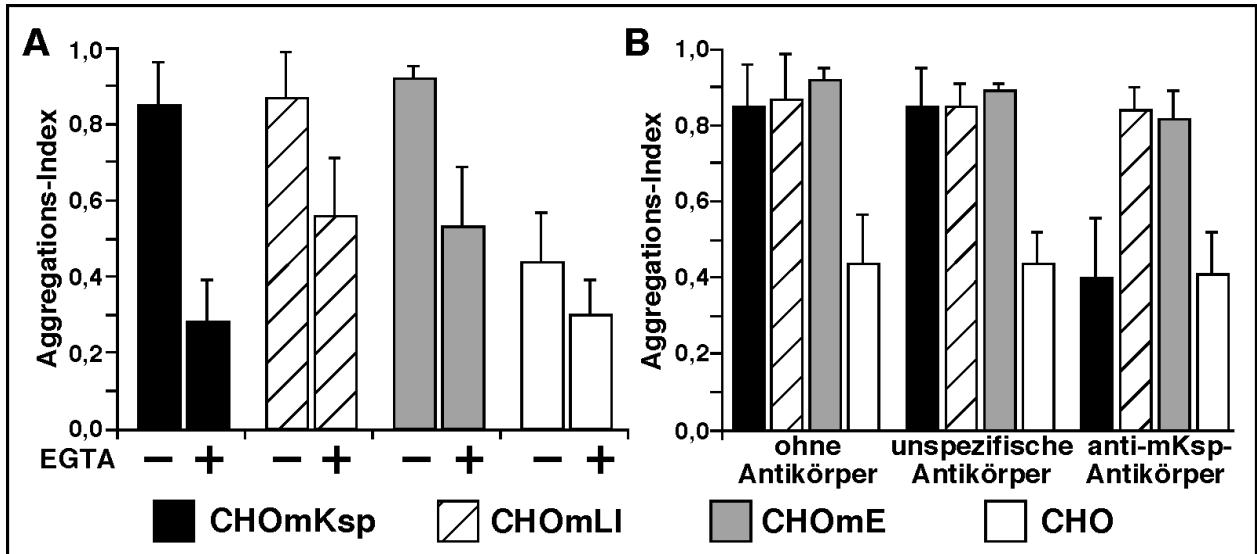
**Abb. 14: Vergleich der CHO-Zelltypen in zwei verschiedenen Aggregationsassays.** Ksp-, LI- und E-Cadherin-exprimierende sowie untransfizierte CHO-Zellen wurden im “Hängenden Tropfen”-Assay und im Schüttel-Assay untersucht. Die verschiedenen Aggregationsassays wurden parallel durchgeführt, so daß die Zellen zu Beginn eines Experimentes die gleiche Anzahl von Passagen und eine vergleichbare Konfluenz aufwiesen. Für beide Assays wurden jeweils drei unabhängige Experimente zusammengefasst, bei denen pro Experiment drei Tropfen ausgewertet wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Im hängenden Tropfen zeigten CHOmKsp-Zellen einen Aggregations-Index von 0,82 und CHOmLI- bzw. CHOmE jeweils von 0,9. Dieser leichte Unterschied im Aggregationsverhalten von Ksp-, LI- und E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen war im Schüttelassay nicht gegeben. Hier lagen alle Cadherin-transfizierten CHO-Zellen im Bereich von etwa 0,9. Es zeigte sich, daß der Aggregationsassay im hängenden Tropfen geeignet war, das unterschiedliche Verhalten von Zellen bezüglich einer Clusterbildung darzustellen. Weiterhin konnte in zwei verschiedenen Aggregationsassays nachgewiesen werden, daß Ksp-Cadherin eine mit LI- und E-Cadherin vergleichbare Zellaggregation in CHO-Zellen vermittelt. Die Unterschiede in der Morphologie der Zellaggregate (Abb. 13) spiegelte sich allerdings nicht in der numerisch quantifizierten Aggregationsfähigkeit der Cadherin-transfizierten CHO-Zellen wieder.

### **3.1.3.2 Inhibition der Ksp-Cadherin-vermittelten Zellaggregation**

Im nächsten Schritt wurde die Spezifität der Ksp-Cadherin-vermittelten Aggregation im hängenden Tropfen analysiert. Zum einen sollte sich eine auf Cadherine beruhende Zellaggregation durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug blockieren lassen, zum anderen sollten Antikörper, die spezifisch gegen die Ektodomäne von Ksp-Cadherin gerichtet sind, eine Ksp-Cadherin-vermittelte Zellaggregation inhibieren können.

In Abb. 15 wurden jeweils die Ergebnisse von drei unabhängigen Aggregationsassays zusammengefaßt. Die Ksp-, LI- und E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen zeigten in Anwesenheit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA (2 mM) einen verminderten Aggregations-Index, der im Bereich der Grundaggregation von untransfizierten CHO-Zellen lag (Abb. 15A). Die Ksp-Cadherin-vermittelte Zellaggregation erwies sich als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig.



**Abb. 15: Inhibition der Ksp-Cadherin-vermittelten Aggregation im hängenden Tropfen.** Ksp-, LI- und E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen sowie untransfizierte CHO-Zellen wurden im Aggregationsassay untersucht. In (A) wurde das Aggregationsverhalten der Zellen ohne und mit EGTA (2 mM) analysiert. Abb. B zeigt das Aggregationsverhalten der Zellen in Anwesenheit von unspezifischen Antikörpern oder Ksp-Cadherin-spezifischen Antikörpern, die jeweils in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt wurden. In (A) und (B) wurden je drei unabhängige Experimente zusammengefaßt, bei denen für jede Zelllinie pro Assay drei Tropfen ausgewertet wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

In Abb. 15B ist der Aggregationsassay im hängenden Tropfen für die verschiedenen CHO-Zelltypen in Anwesenheit von unspezifischen Antikörpern oder von Ksp-Cadherin-spezifischen Antikörpern zusammengefaßt. Die Zugabe von unspezifischen Antikörpern verringerte das Aggregationsverhalten der verschiedenen CHO-Zelltypen im Vergleich zu den Ansätzen ohne Zugabe von Antikörpern nicht. Während die Inkubation mit Ksp-Cadherin-spezifischen Antikörpern die Aggregation von Ksp-Cadherin-exprimierenden Zellen deutlich inhibierte, zeigten LI- und E-Cadherin-exprimierende sowie untransfizierte CHO-Zellen keine veränderte Aggregation im Vergleich zu den Ansätzen ohne Antikörper-Zugabe. Ksp-Cadherin-spezifische polyklonale Antikörper, die gegen die Cadherindomänen 1 und 2 (EC12) von Ksp-Cadherin gerichtet sind, waren also in der Lage, die durch Ksp-Cadherin vermittelte Zellaggregation spezifisch zu inhibieren.

## **3.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von LI-Cadherin**

Sowohl für LI- (Berndorff et al., 1994; Kreft et al., 1997) als auch für Ksp-Cadherin (die vorliegende Arbeit) wurde eine Funktion als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül nachgewiesen. Am Beispiel von LI-Cadherin wurden im folgenden die Bindungseigenschaften der 7D-Cadherine auf Einzelmolekülebene detailliert untersucht.

### **3.2.1 Herstellung von rekombinanten LI-Fc-Fusionsproteinen**

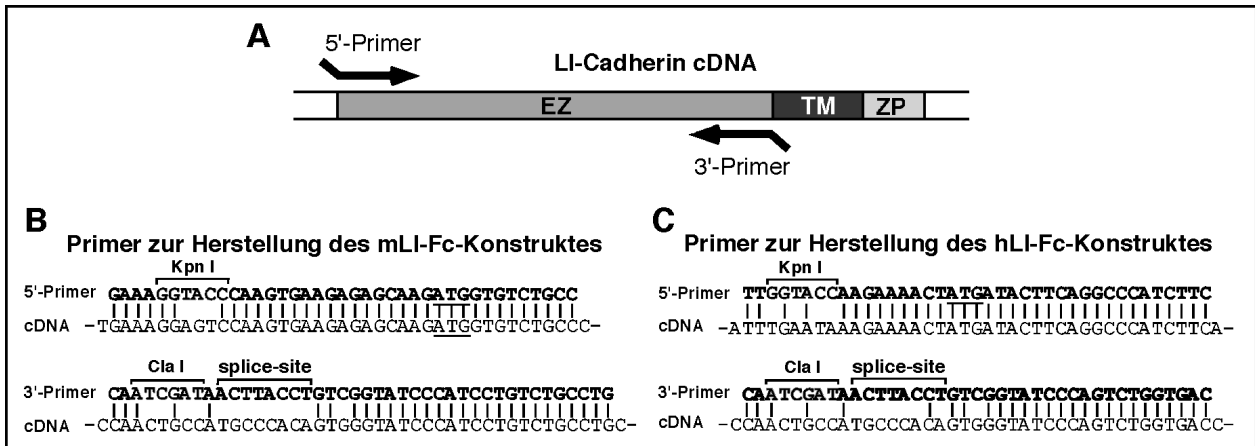
Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften des LI-Cadherins wurden Fusionsproteine hergestellt, die aus dem gesamten extrazellulären Anteil des LI-Cadherins aus Maus oder Mensch fusioniert an den Fc-Teil des humanen IgG1 bestehen (mLI-Fc und hLI-Fc). Ausgehend von mLI-Fc wurde zusätzlich ein deletiertes Fc-Fusionsprotein erstellt, dem die Cadherin-Domänen 2 und 3 fehlen ( $\Delta$ 23LI-Fc).

Cadherin/Fc-Fusionsproteine wurden bislang nur zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens klassischer Cadherine eingesetzt (Baumgartner et al., 2000a; Higgins et al., 1998; Lambert et al., 2000; Niessen and Gumbiner, 2002). Die Cadherin-Fc-Konstrukte liegen nativ als Dimere vor, da sie über die Cysteine des Fc-Teils kovalent verbrückt werden. Dadurch wird die parallele Anlagerung von Cadherin-Ektodomänen begünstigt, welche als Voraussetzung für die Funktion der Cadherine gilt (Takeda et al., 1999). Des weiteren werden die Fc-Fusionsproteine von eukaryonten Zellen sekretiert und lassen sich über ihren Fc-Anteil mittels Protein A-Sepharose leicht aus Zellkulturüberständen aufreinigen (Ey et al., 1978). Gleichermäßen ist über den Fc-Anteil mittels Protein A oder Fc-spezifischer Antikörper eine gerichtete Kopplung der Fusionsproteine an diverse Trägermaterialien möglich.

#### **3.2.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren für mLI-Fc und hLI-Fc**

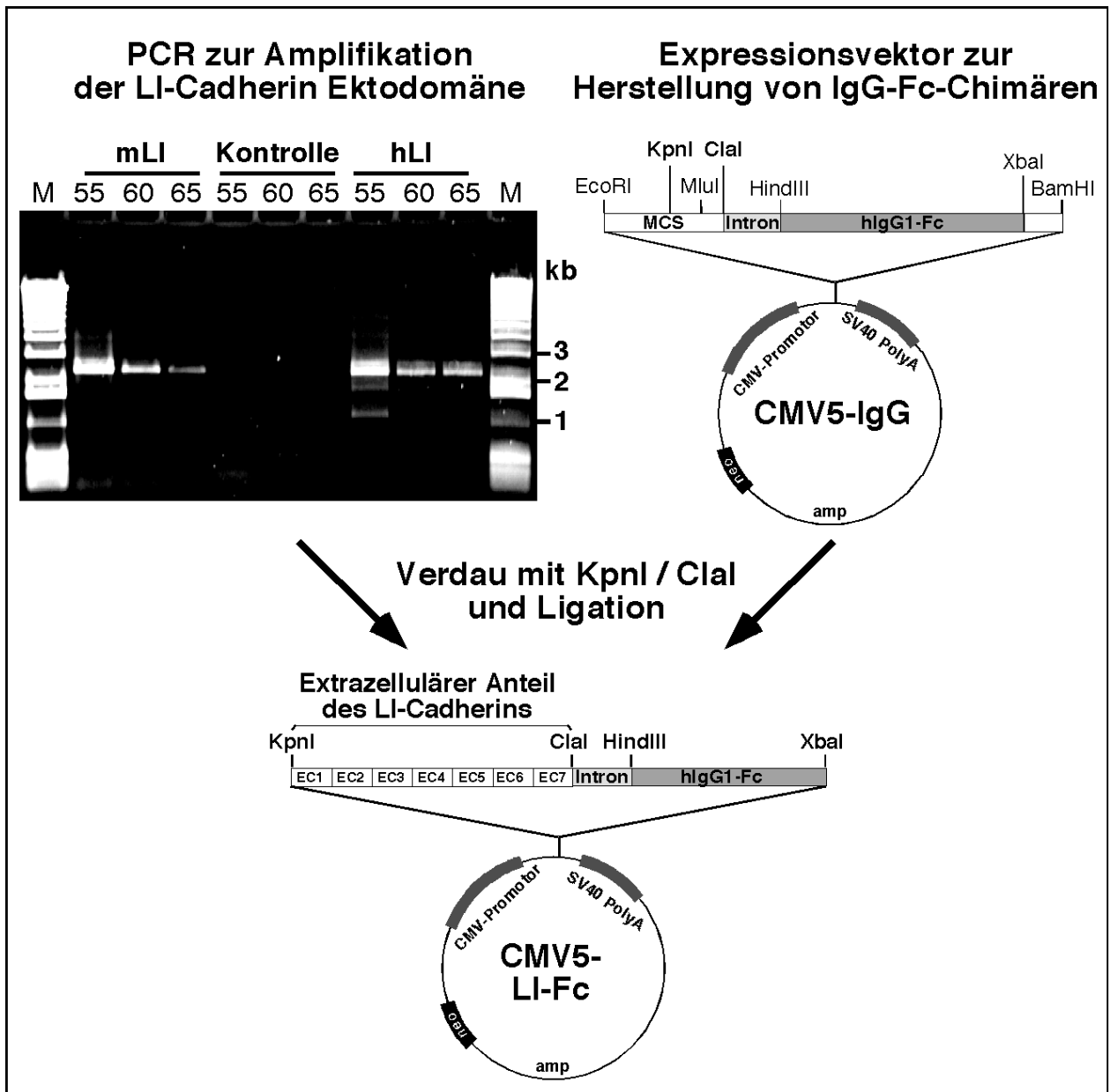
Zur Herstellung des chimären Proteins mLI-Fc wurde ein 2376 bp-Fragment, welches den kompletten extrazellulären Anteil des murinen LI-Cadherins repräsentiert (Methionin 1 bis Threonin 783), mittels PCR aus der cDNA des murinen LI-Cadherins (pSK<sup>+</sup>mLI; (Angres et al., 2001)) amplifiziert. Parallel wurde die codierende Region für die humane LI-Cadherin-Ektodomäne (pSK<sup>+</sup>hLI; (Zitt, 1997)), die aus einem 2387 bp-Fragment besteht, amplifiziert (Methionin 1 bis Threonin 790). In Abb. 16 ist die Lage der jeweiligen Primer schematisch verdeutlicht (A) und die Primersequenzen zur Amplifikation der murinen (B) und humanen Ektodomäne (C) dargestellt.

Die Primer enthalten Restriktionsschnittstellen für KpnI und ClaI, die ein vereinfachtes Subklonieren des PCR-Produktes in den Expressionsvektor CMV5-IgG (freundlicherweise von Prof. D. Vestweber zur Verfügung gestellt) ermöglichten.



**Abb. 16: Primer zur Herstellung der Expressionsvektoren für mLI-Fc und hLI-Fc.** (A) Schema zur PCR-gestützten Amplifikation der LI-Cadherin Ektodomäne; EZ: extrazellulär, TM: transmembran, ZP: zytoplasmatisch. Die sequenzspezifischen Primer zur Amplifikation der für den extrazellulären Bereich codierenden Region der murinen (B) und humanen (C) LI-Cadherin cDNA verfügen zusätzlich über Restriktionsschnittstellen für KpnI und ClaI, die ein Subklonieren des PCR-Produktes in den Expressionsvektor erleichtern. Darüber hinaus beinhalten die 3'-Primer je eine Spleiß-Consensussequenz (splice-site), die bei korrekter Prozessierung die Fusion der LI-Cadherin-Ektodomäne an den Fc-Teil gewährleistet. Das Startcodon ist in der cDNA- und in der 5'-Primer-Sequenz unterstrichen dargestellt.

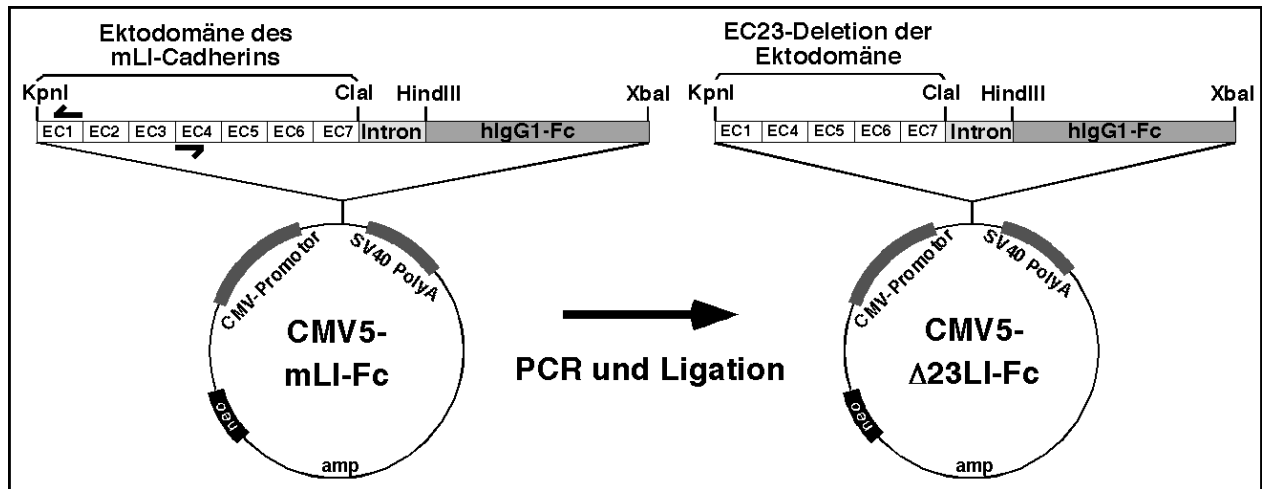
Zusätzlich beinhalten die 3'-Primer eine Spleiß-Consensussequenz, die bei korrekter Transkription das Spleißen des im Vektor enthaltenen Introns bewirkt und somit die Fusion der Ektodomäne mit dem Fc-Teil ermöglicht. Abb. 17 zeigt das Konstruktionsschema für die Expressionsvektoren CMV5-LI-Fc zur Expression von hLI-Fc und mLI-Fc. Die PCR-Bedingungen wurden für beide Konstrukte optimiert, um ein spezifisches PCR-Produkt zu erhalten. Die PCR-Produkte für das murine und humane LI-Cadherin sind bei verschiedenen Anlagerungstemperaturen (55, 60 und 65°C) im analytischen Agarosegel dargestellt. Mit zunehmender Temperatur nahm die Spezifität der PCR-Produkte zu. Das spezifische PCR-Produkt der Amplifikationen aus der murinen und humanen cDNA bei einer Anlagerungstemperatur von 65°C wurde jeweils aufgereinigt, mit KpnI und ClaI verdaut und in den ebenso behandelten Expressionsvektor CMV5-IgG ligiert. Durch bidirektionale Sequenzierung der gesamten codierenden Bereiche wurden Kandidaten überprüft, bevor größere Mengen Plasmid-DNA präpariert wurden.



**Abb. 17: Herstellung der Expressionsvektoren für mLI-Fc und hLI-Fc.** Mittels PCR wurde die codierende Region der Ektodomänen des murinen und humanen LI-Cadherins amplifiziert. Die PCR wurde bei drei Anlagerungstemperaturen (55, 60 und 65°C) durchgeführt und als Kontrolle wurde der Ansatz zur Amplifikation der murinen Ektodomäne ohne cDNA-Matrize durchgeführt (analytisches Agarosegel; M: 1 kb-Marker; die Fragmentlängen in kb sind im Bereich der PCR-Produkte angegeben). Die Amplifikation der murinen und humanen Ektodomänen lieferte bei einer Anlagerungstemperatur von 60 und 65°C jeweils eine spezifische Bande. Diese PCR-Produkte wurden mit KpnI und ClaI verdaut und jeweils in den ebenso behandelten Expressionsvektor CMV5-IgG ligiert. Der Vektor besitzt bereits die codierende Region für den Fc-Teil des humanen IgG1 (hlgG1-Fc), welche über ein Intron mit dem Polylinker verbunden ist. Die Expressionskassette besteht aus einem CMV-Promotor und einem SV40-PolyA-Signal. Zusätzlich besitzt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (amp) zur Selektion in Bakterien und ein Neomycin-Resistenzgen (neo) zur Selektion in eukaryonten Zellen. EC1-EC7: Cadherin-Domänen 1 bis 7 des LI-Cadherins.

### 3.2.1.2 Konstruktion der Deletionsmutante $\Delta 23\text{LI-Fc}$

Ausgehend von dem murinen LI-Fc-Konstrukt wurde eine Deletionsmutante hergestellt, der die Cadherindomänen 2 und 3 (EC23) fehlen ( $\Delta 23\text{LI-Fc}$ ). Wie in Abb. 18 veranschaulicht, wurde eine PCR mit einem 3'-Primer, der innerhalb von EC1 liegt und an die Cadherindomäne EC2 grenzt, und einem 5'-Primer, der innerhalb von EC4 liegt und an die Cadherindomäne EC3 grenzt, durchgeführt.

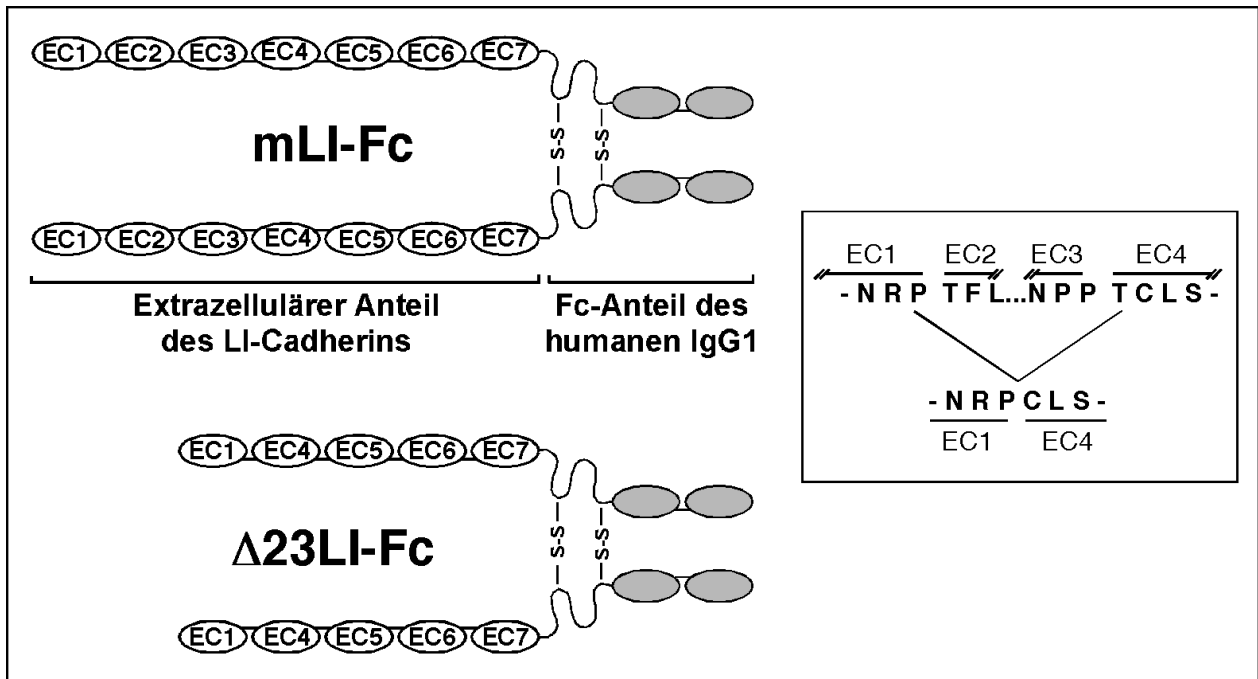


**Abb. 18: Konstruktion des Expressionsvektors für  $\Delta 23\text{LI-Fc}$ .** Ausgehend von CMV5-mLI-Fc wurden mittels PCR die Cadherindomänen 2 und 3 (EC23) deletiert. Der 5'-Primer liegt innerhalb von EC4 und grenzt an EC3, während der 3'-Primer innerhalb von EC1 liegt und an EC2 grenzt. Hierdurch wird bis auf die Cadherindomänen 2 und 3 der gesamte Expressionsvektor amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, ligiert und in Bakterien transformiert. EC1-EC7: Cadherin-Domänen 1 bis 7 des LI-Cadherins.

Hieraus resultierte die Amplifikation des gesamten Vektors, ausgenommen der Cadherindomänen EC2 und EC3 (CMV5- $\Delta 23\text{LI-Fc}$ ). Das lineare PCR-Produkt wurde nun ligiert und in Bakterien kloniert. Auch hier wurde die Plasmid-DNA positiver Klone durch Sequenzierung beider Stränge überprüft.

Abb. 19 zeigt die Konstrukte LI-Fc und  $\Delta 23\text{LI-Fc}$  im Modell. Das Konstrukt hLI-Fc besteht bei korrekter Expression aus 1121 Aminosäuren. Gegenüber mLI-Fc mit 1114 Aminosäuren ist das deletierte Konstrukt  $\Delta 23\text{LI-Fc}$  um 215 Aminosäuren verkürzt (Thr 124 bis Thr 338). Die Konstrukte sind in ihrem postulierten nativen Zustand als Dimere dargestellt, die über Disulfidbrücken im Fc-Teil entstehen.





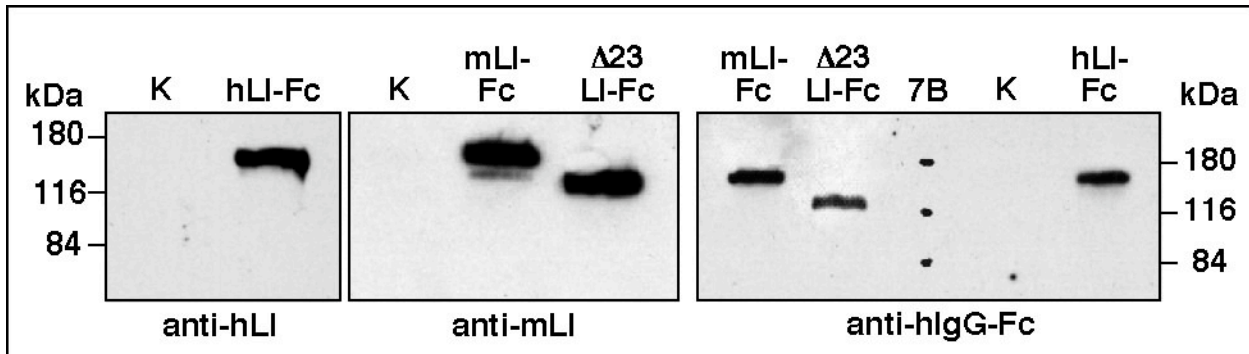
**Abb. 19: Modell der Fusionsproteine mLI-Fc und Δ23LI-Fc.** Schematische Darstellung der Fusionsproteine mLI-Fc und Δ23LI-Fc in ihrem angenommenen nativen Zustand als Dimere. Bei korrekter Prozessierung sind die Fusionsproteine über Disulfidbrücken im Fc-Teil dimerisiert. Die Deletion der Cadherindomänen 2 und 3 (EC2/3) und die somit veränderte Aminosäuresequenz in diesem Bereich sind veranschaulicht (kleiner Kasten). EC1-EC7: Cadherin-Domänen 1 bis 7 des LI-Cadherins.

Die aufgereinigte DNA der Expressionsvektoren für hLI-Fc, mLI-Fc und Δ23LI-Fc wurden nun zur Transfektion von CHO-Zellen eingesetzt.

### 3.2.1.3 Aufreinigung der Fusionsproteine aus Zellkulturüberständen

Die stabile Expression der Konstrukte hLI-Fc, mLI-Fc und Δ23LI-Fc in CHO-Zellen erfolgte wie die Herstellung der bereits beschriebenen Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen (3.1.1.2). CHO-Zellen wurden mittels GeneJammer™ mit der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert, für 2-3 Wochen in G418-haltigem Medium selektioniert und kloniert. Die Überstände von potentiellen Primärklonen wurden im ELISA auf das Vorhandensein von Fusionsproteinen getestet. Positive Klone wurden durch Endpunktverdünnung in Mikrotiterplatten subkloniert und die Überstände erneut im ELISA getestet. Mindestens fünf positive Subklone jeder Transfektion wurden weiter kultiviert. Aus den Überständen der positiven Subklone konnte mit Protein A-Sepharose das Fusionsprotein präzipitiert und im Immunoblot detektiert werden. Abb. 20 zeigt die Detektion der präzipitierten Proteine aus den Überständen von CHO-Zellen, die mit CMV5-hLI-Fc, CMV5-mLI-Fc oder CMV5-Δ23LI-Fc transfiziert wurden. Die chimären Proteine konnten mit LI-Cadherin-spezifischen und Fc-spezifischen Antikörpern im Immunoblot identifiziert werden. Die Banden

zeigten im denaturierenden Gel die erwarteten molekularen Massen von etwa 140 kDa für hLI-Fc und mLI-Fc sowie von 120 kDa für  $\Delta 23$ LI-Fc.

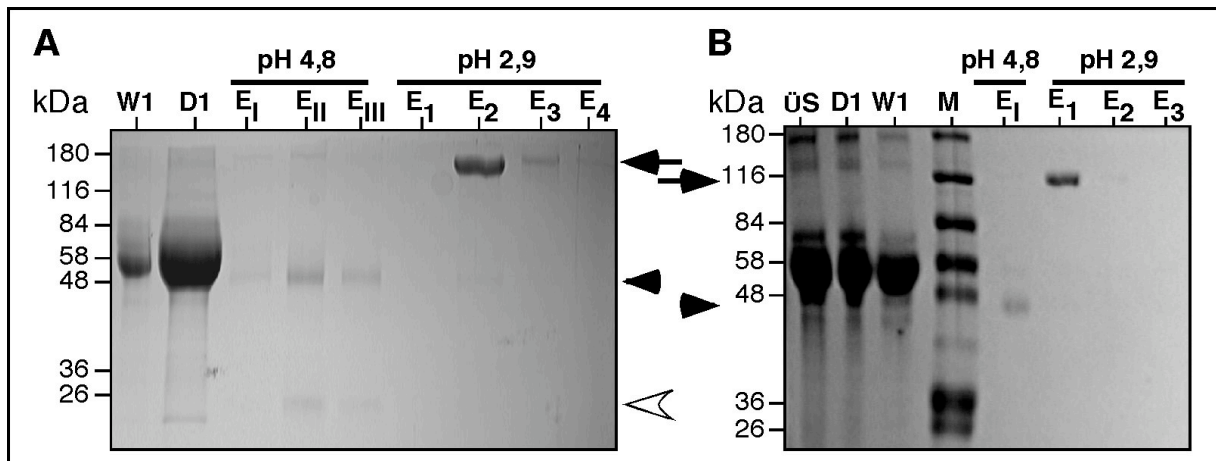


**Abb. 20: Immunoblot der Protein A-absorbierten Fusionsproteine hLI-Fc, mLI-Fc und  $\Delta 23$ LI-Fc.** Je 500  $\mu$ l von Zellkulturüberständen der mit CMV5-hLI-Fc, CMV5-mLI-Fc oder CMV5- $\Delta 23$ LI-Fc transfizierten CHO-Zellen sowie Überstand von untransfizierten CHO-Zellen (K) wurden mit 50  $\mu$ g Protein A-Sepharose inkubiert. Die jeweiligen Präzipitate wurden im Immunoblot gegen hLI (anti-hLI), mLI-Cadherin (anti-mLI) und gegen die Fc-Domäne des humanen IgG1 (anti-hIgG-Fc) getestet. 7B: Molekulargewichtsstandard; die Größen der Molekulargewichtsstandards sind angegeben.

Die Präzipitation aus Medium von untransfizierten CHO-Zellen zeigte kein Signal im Western Blot für LI-Cadherin oder humanes IgG-Fc. Die CHO-Zellen, die stabil hLI-Fc, mLI-Fc oder  $\Delta 23$ LI-Fc exprimieren und sekretieren, wurden CHO<sub>h</sub>LI-Fc, CHO<sub>m</sub>LI-Fc beziehungsweise CHO $\Delta 23$ LI-Fc genannt. Im weiteren Verlauf wird nur noch die Aufreinigung und Charakterisierung des murinen LI-Fc-Konstruktes und der davon abgeleiteten Deletionsmutante  $\Delta 23$ LI-Fc beschrieben, da auch nur mit diesen weitere Analysen durchgeführt wurden. Die Abkürzung LI-Fc bezieht sich in der Folge daher ausschließlich auf das murine LI-Fc-Konstrukt.

Positive Subklone von CHO-Zellen, die LI-Fc oder  $\Delta 23$ LI-Fc stabil exprimierten und sekretierten, wurden auf DMEM mit nur 0,5% FKS konditioniert, um den Anteil boviner IgGs zu minimieren, welche die Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Protein A-Sepharose-Affinitätschromatographie erschwerten. Ein Umstellen der CHO-Zellen auf Serum-freies Medium (PanSerin von PanBiotech, Aidenbach) hatte zur Folge, daß die Expressionsmenge der Fusionsproteine stark abnahm und kam deswegen nicht in Betracht. Um die restlichen im FKS enthaltenen bovinen IgGs von den Fusionsproteinen zu trennen, erwies sich ein pH-Wert-Sprung bei der Elution als erfolgreich. Humane IgGs binden stärker an Protein A-Sepharose als bovine IgGs und können bei einem pH-Wert von 2,5 bis 3,0 eluiert werden (Current Protocols of Protein Science; John Wiley & Sons, USA). Durch einen Zwischenschritt bei der Elution von pH 4,8 eluierten die bovinen IgGs und ließen sich so von den Fusionsproteinen trennen. Abb. 21 zeigt die in der SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung analysierten Fraktionen der Aufreinigung von LI-Fc (A) und  $\Delta 23$ LI-Fc (B) aus Zellkulturüberständen (ÜS).

Im Durchfluß (D1) und im ersten Waschschrift (W1) ist bovines Serumalbumin (BSA) enthalten, welches durch Waschen mit Phosphatpuffer von der Säule entfernt werden konnte.



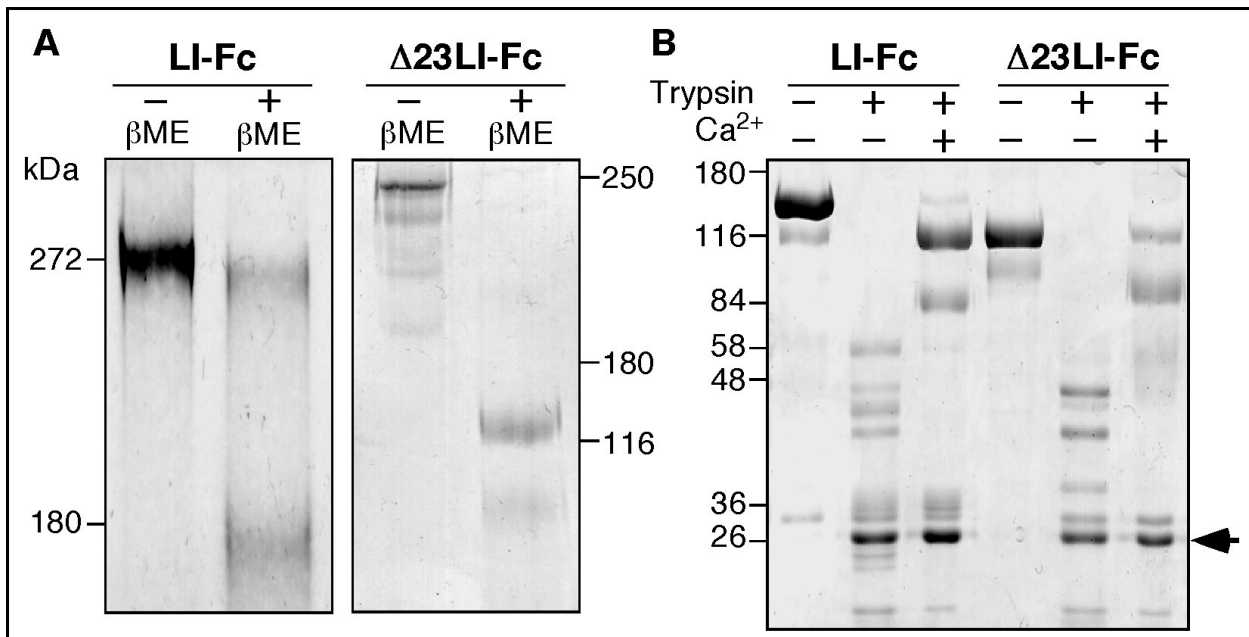
**Abb. 21: Fraktionen der LI-Fc- und  $\Delta$ 23LI-Fc-Aufreinigung aus Zellkulturüberständen.** Fraktionen von Zellkulturüberständen LI-Fc- (A) und  $\Delta$ 23LI-Fc- (B) exprimierender CHO-Zellen wurden nach Aufreinigung über Protein A-Sepharose-Säulen in der SDS-PAGE analysiert. Pro Spur wurden je 10  $\mu$ l von 1 ml-Fraktionen aufgetragen. Durch den pH-Zwischenschritt bei der Elution von pH 4,8 konnten die im FKS enthaltenen bovinen IgGs (schwere Kette: schwarzer Pfeilkopf; leichte Kette: weißer Pfeilkopf), die schwach an die Protein A-Sepharose binden, von den Fusionsproteinen (Pfeile) getrennt werden. ÜS: Überstand der Zellen, D1: erste Fraktion des Durchflusses, W1: erste Fraktion des Waschpuffers, E: Fraktionen des Elutionspuffers (pH 4,8 und pH 2,9); die Größen der Molekulargewichtsstandards (M) sind angegeben.

Bei einem pH-Wert von 4,8 (E<sub>I</sub>-E<sub>III</sub>) wurden die bovinen IgGs eluiert, die sich im reduzierenden Gel in die schwere (schwarzer Pfeilkopf) und leichte Kette (weißer Pfeilkopf) auftrennen. Erst bei einem pH-Wert von 2,9 (E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub>) eluierten die Fusionsproteine (Pfeile). Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurden jeweils 150 bis 300 ml Zellkulturüberstand pro 1 ml Säulenvolumen Protein A-Sepharose verwendet. Durchschnittlich lag die Ausbeute bei etwa 0,7 mg Fusionsprotein pro Liter Zellkulturmedium.

### 3.2.1.4 Charakterisierung der Fusionsproteine

Nach erfolgreicher Aufreinigung der Fusionsproteine LI-Fc und  $\Delta$ 23LI-Fc stellte sich nun die Frage, ob diese im nativen Zustand tatsächlich als Dimere vorliegen und ob sie sich bezüglich der extrazellulären Domäne wie andere Cadherine verhalten. Unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen wurde das Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE verglichen (Abb. 22A). LI-Fc läuft unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf der Höhe von etwa 270 kDa und wies bei Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol eine zusätzliche Bande auf der Höhe von etwa 140 kDa auf. Dies entspricht einer molekularen Masse des Monomers von LI-Fc (s. auch Abb. 20). Auch  $\Delta$ 23LI-Fc zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Molekularmasse von 240 kDa, welche etwa doppelt so groß war wie das Molekulargewicht unter reduzierenden Bedingungen (120 kDa in Abb. 20). Bei den zusätzlichen niedermolekularen Banden von  $\Delta$ 23LI-Fc handelte es sich

wahrscheinlich um unterschiedlich prozessierte oder um proteolytische Fragmente des Fusionsproteins.



**Abb. 22: Charakterisierung von LI-Fc und Δ23LI-Fc.** (A) Je 3 μg von LI-Fc und Δ23LI-Fc wurden unter nicht-reduzierenden (ohne βME) oder unter reduzierenden Bedingungen (mit βME) in der SDS-PAGE aufgetrennt. (B) Je 3 μg von LI-Fc und Δ23LI-Fc unbehandelt, mit 0,1% Trypsin (Pfeil) und 2 mM EGTA oder mit 0,1% Trypsin und 5 mM CaCl<sub>2</sub> wurden für 15 min bei RT inkubiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Größen der Molekulargewichtsstandards sind angegeben; βME: β-Mercaptoethanol.

Ein gemeinsames Merkmal der Cadherine ist ihr Ca<sup>2+</sup>-sensitiver proteolytischer Verdau durch Trypsin (Hyafil et al., 1981; Hyafil et al., 1980; Takeichi, 1990). In Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> sind Cadherine vor dem Verdau durch Trypsin geschützt. In Abb. 22B wurden je 3 μg von LI-Fc bzw. Δ23LI-Fc einem Trypsinverdau mit und ohne Ca<sup>2+</sup> unterzogen und in der SDS-PAGE aufgetrennt. In Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> wurde LI-Fc von Trypsin proteolytisch verdaut, so daß nur noch ein Bandenmuster von Fragmenten kleiner als 60 kDa zu detektieren war. In Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> jedoch wurde dieser starke Abbau von LI-Fc durch Trypsin reduziert. Lediglich das Auftreten von Fragmenten mit molekularen Massen zwischen 26 und 36 kDa konnte durch Ca<sup>2+</sup>-Zugabe nicht verhindert werden. Hierbei handelte es sich um den Fc-Teil des Fusionsproteins, wie durch einen Immunoblot mit Fc-spezifischen Antikörpern bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Bei den prominenten Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 26 kDa (Pfeil) handelte es sich um Trypsin. Ca<sup>2+</sup> zeigt für Δ23LI-Fc ebenso einen protektiven Effekt. Zwar treten auch mit Ca<sup>2+</sup> proteolytische Fragmente auf, jedoch ist der proteolytische Verdau durch Trypsin bei Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> deutlich verringert.

LI-Fc und Δ23LI-Fc lagen also nativ als Dimere vor und die jeweiligen LI-Cadherin-Anteile der Fusionsproteine zeigten das Cadherin-typische, Ca<sup>2+</sup>-abhängige Verhalten bei der Proteolyse durch

Trypsin. In einem als Diplomarbeit vergebenen mit dieser Arbeit assoziierten Projekt wurde ein auf fluoreszierenden Mikroperlen basierender und im FACS auswertbarer Aggregationsassay etabliert (Köhler, 2003). In diesem Assay wurde zunächst qualitativ der Nachweis erbracht, daß sowohl LI-Fc als auch  $\Delta 23$ LI-Fc eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, homotypische Aggregation von Mikroperlen vermitteln. Somit waren beide Konstrukte geeignet, zur weiteren Untersuchung der Bindungseigenschaften homotypischer LI-Cadherin-Interaktionen eingesetzt zu werden.

### **3.2.2 Untersuchung der homotypischen Interaktion von LI-Cadherin**

Da über die molekularen Bindungseigenschaften des LI-Cadherins wenig bekannt war, wurden diese mit Hilfe des LI-Fc-Fusionsproteins in verschiedenen Assays untersucht. Die Möglichkeit der gerichteten Kopplung von LI-Fc an verschiedene Oberflächen ermöglichte hierbei eine Analyse des Bindungsverhaltens unter definierten Bedingungen.

#### **3.2.2.1 Einfluß der extrazellulären Calcium-Konzentration auf die LI-Cadherin-Interaktion**

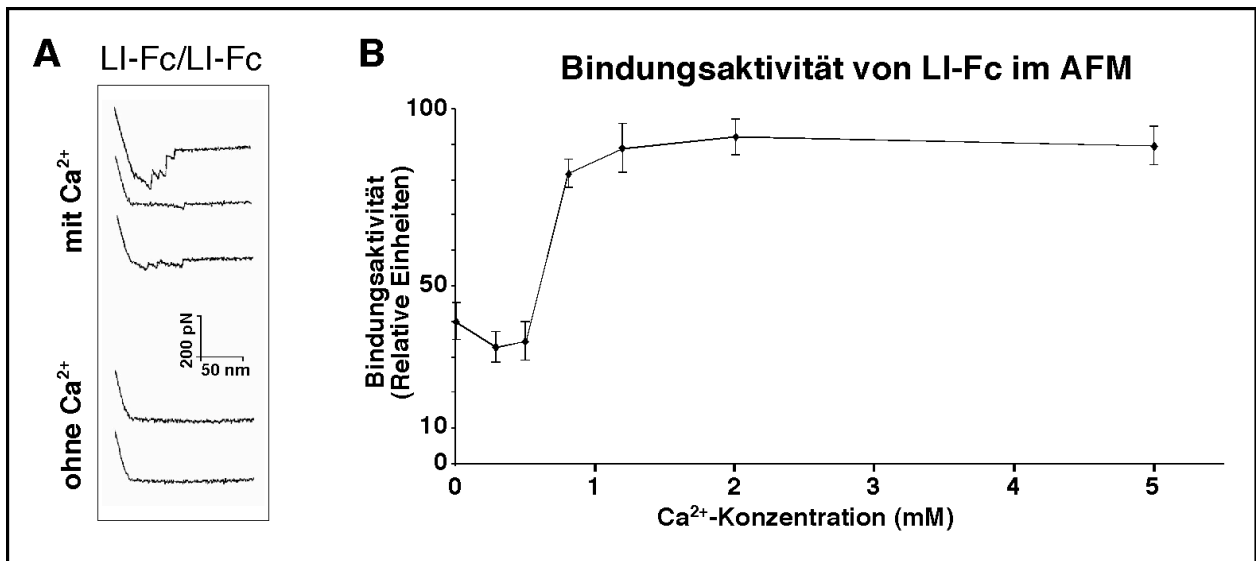
$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind für die Stabilisierung der extrazellulären Cadherin-Struktur, für den Schutz der Cadherine gegen Proteasen und für die Cadherin-vermittelte Zell-Adhäsion von großer Bedeutung (Hyafil et al., 1981; Pokutta et al., 1994; Takeichi, 1991). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der homotypischen LI-Cadherin-Bindung wurde mit den Methoden der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) und der Laserpinzette untersucht.

#### **Analyse der $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von LI-Cadherin-Bindungen im AFM**

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM; (Binnig and Quate, 1986)) liefert Informationen über Molekül-Interaktionen durch die Messung von Abrißkräften zwischen Einzelmolekülen in wässriger Lösung (s. 2.5.4). Der Abstand einer mit LI-Fc beschichteten Oberfläche zu einer Sondenspitze, an die ebenfalls LI-Fc gekoppelt ist, wird zyklisch verändert, so daß die LI-Fc-Moleküle erst in Kontakt zueinander gebracht und dann wieder voneinander entfernt werden. Treten Interaktionen zwischen den Molekülen auf, so muß eine gewisse Kraft aufgewendet werden, um die Molekül-Interaktion aufzuheben (Abrißkraft). Diese Abrißkräfte werden im AFM bezogen auf die Distanz zwischen Oberfläche und Sondenspitze gemessen .

Der Einfluß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die homotypische Interaktion von LI-Fc Fusionsproteinen wurde im AFM bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen untersucht. Abb. 23A zeigt Beispiele von Kraft-Weg-Kurven homotypischer LI-Cadherin Interaktionen mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$ , wobei nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  Bindungsereignisse auftraten. Die abgebildeten Kraft-Weg-Kurven wiesen eine unterschiedliche Anzahl von Bindungsereignissen auf. Für die statistische Auswertung wurden mindestens 500 Kraft-Weg-Kurven pro Experiment analysiert, wobei mindestens 400 Kraft-Weg-Kurven Abrißereignisse aufwiesen.

In Abb. 23B ist die Bindungsaktivität der homotypischen LI-Cadherin Interaktion als Funktion der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen. Bis zu einer Konzentration von 0,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zeigte sich kein Einfluß auf die Bindungsaktivität von LI-Fc Fusionsproteinen.



**Abb. 23: Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von LI-Cadherin-Interaktionen im AFM.** Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der homotypischen LI-Cadherin-Interaktion wurde mittels LI-Fc-Konstrukten im Rasterkraftmikroskop (AFM) gemessen. Abb. A zeigt Beispiele von Kraft-Weg-Diagrammen der LI-Fc-Interaktion in Anwesenheit und in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. In B ist die Bindungsaktivität der LI-Cadherin Interaktion als Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen. Als Bindungsaktivität ist die Größe der Fläche (also das Integral unter der Kurve) zwischen den Abrißereignissen und der Nulllinie (kein Abrißereignis) definiert. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert der Bindungsaktivität aus mindestens 500 ausgewerteten Kraft-Weg-Diagrammen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

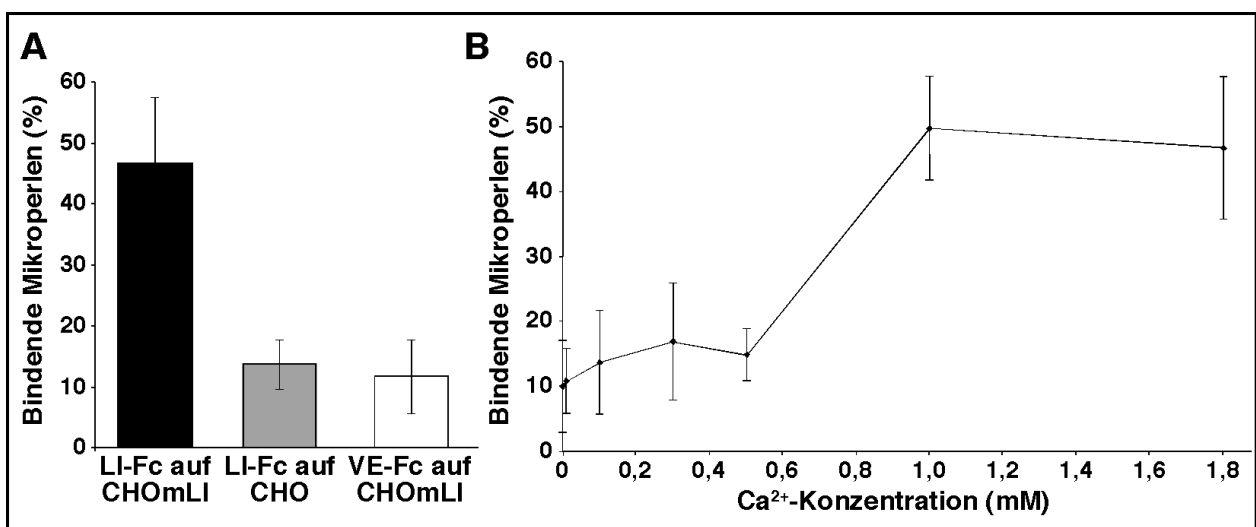
Zwischen 0,5 und 0,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  stieg jedoch die Bindungsaktivität sprunghaft an und erreichte ab einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1,2 mM ein Plateau. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der LI-Cadherin-Interaktion ist hochkooperativ. Der Kooperativitätsindex errechnete sich auf  $R_s=1,5$  und der Hill-Koeffizient auf  $n_H=11,7$  (nach (Bisswanger, 2000; Koshland, 1976; Zech, 1986)). Die apparente Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) für  $\text{Ca}^{2+}$  bezogen auf die gesamte LI-Cadherin-Ektodomäne entspricht hier der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei halbmaximaler Bindungsaktivität (Sättigung) und lag bei etwa 0,68 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Bindungsverhalten von LI-Cadherin-Fc beschichteten Mikroperlen auf CHOmLI-Zellen

Ob sich der Einfluß der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die LI-Cadherin-Interaktion in Zellkulturexperimenten bestätigen ließ, wurde mittels Laserpinzette (Sterba and Sheetz, 1998) untersucht, wobei das Bindungsverhalten von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen auf CHO-Zellen, die LI-Cadherin stabil exprimieren (CHOmLI), analysiert wurde. Die Verwendung von Mikroperlen in Kombination mit eukaryonten Zellen bot den Vorteil, daß eine definierte Oberfläche mit homogener Proteinzusammensetzung (beschichtete Mikroperle) einer komplex zusammengesetzten

Zellmembran präsentiert werden konnte. Durch die Möglichkeit der Manipulation von Mikroperlen konnten nun die Bindungseigenschaften der Interaktion von Oberflächen-gekoppelten Fusionsproteinen mit den zellständigen Cadherinen untersucht werden.

An Protein A-beschichtete Polystyren-Mikroperlen (Dynabeads von Dynal; Oslo, Norwegen) mit einem Durchmesser von  $2,8 \mu\text{m}$  wurden LI-Fc Fusionsproteine gerichtet gebunden und für 15 min mit LI-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen inkubiert. Bei einer konstanten Laserleistung von 30 mW wurde der Anteil anhaftender Mikroperlen bestimmt. Abb. 24 faßt die Ergebnisse von je drei unabhängigen Laserpinzetten-Experimenten zusammen.

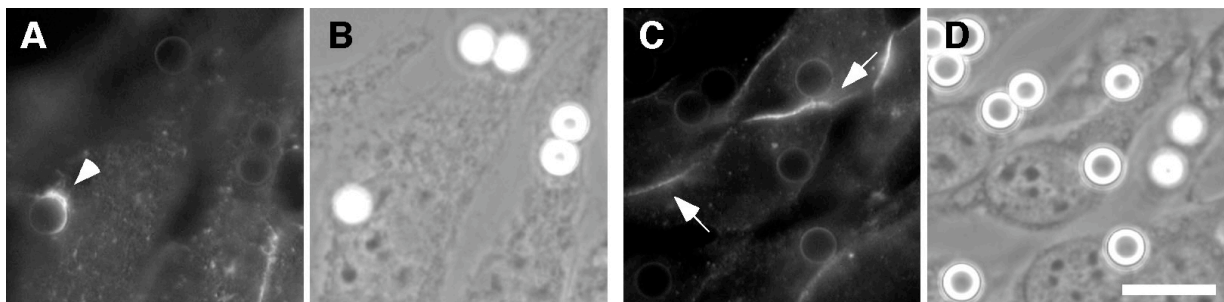


**Abb. 24: Bindungsverhalten LI-Fc-beschichteter Mikroperlen auf CHOMLI-Zellen.** Das Bindungsverhalten von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen auf LI-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen (CHOMLI) wurde mit Hilfe der Laserpinzette untersucht. Jeder Datenpunkt repräsentiert die aus drei unabhängigen Experimenten gemittelte Bindungswahrscheinlichkeit von mindestens 200 Mikroperlen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. In (A) ist das Bindungsverhalten von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen auf CHOMLI-Zellen bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1,8 mM dem Bindungsverhalten der gleichen Mikroperlen auf untransfizierten CHO-Zellen gegenübergestellt. Als weitere Kontrolle dienten Mikroperlen, die mit einem Fusionsprotein bestehend aus der VE-Cadherin-Ektodomäne und dem Fc-Teil des humanen IgG1 (VE-Fc) beschichtet waren. In (B) wurde der Anteil bindender LI-Fc-Mikroperlen auf CHOMLI-Zellen in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration analysiert.

Jeder Datenpunkt repräsentiert die gemittelte Bindungswahrscheinlichkeit von mindestens 200 Mikroperlen. Bei physiologischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (1,8 mM) wurden etwa 47% ( $\pm 11\%$ ) der LI-Fc-beschichteten Mikroperlen auf CHOMLI-Zellen gebunden, während nur 14% ( $\pm 4\%$ ) der Mikroperlen auf untransfizierten CHO-Zellen haften blieben (Abb. 24A). In einem weiteren Kontrollexperiment wurden die Mikroperlen mit VE-Cadherin-Fc, der VE-Cadherin-Ektodomäne fusioniert an den Fc-Teil des humanen IgG (Baumgartner et al., 2000a), beschichtet und mit CHOMLI inkubiert. VE-Cadherin-Fc-beschichtete Mikroperlen hafteten nur zu 12% ( $\pm 6\%$ ) an LI-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen. VE-Cadherin (Cadherin 5) gehört zu den klassischen Cadherinen vom Typ 2 und wird vorwiegend in Endothelzellen exprimiert (Heimark et al., 1990;

Lampugnani and Dejana, 1997). Die Kontrollen zeigten, daß die LI-Fc-beschichteten Mikroperlen eine spezifische Interaktion mit CHOmLI-Zellen eingingen. In Abb. 24B ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit dieser Interaktion dargestellt. Der prozentuale Anteil von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen, die an CHOmLI-Zellen hafteten, ist als Funktion der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen. Wie schon im AFM (Abb. 23), so zeigte sich auch mit der Laserpinzette ein sprunghafter Anstieg der Bindungsaktivität für LI-Fc-beschichtete Mikroperlen bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwischen 0,5 und 1,0 mM. Der Kooperativitätsindex ( $R_s$ ) errechnete sich hier auf 1,4 (Hill-Koeffizient  $n_H=14$ ) und die apparente  $K_D$  für  $\text{Ca}^{2+}$  lag bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,64 mM. Diese Werte deckten sich recht gut mit den Daten aus den AFM-Experimenten (Abb. 23B).

Ein Vorteil des Mikroperlen-Zell-Systems ist die Möglichkeit, die Kontaktbereiche der Mikroperlen mit den Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz charakterisieren zu können. Da jedoch die für die Laserpinzette verwendeten Mikroperlen eine starke Autofluoreszenz aufwiesen, waren diese hierfür nicht zu verwenden. Latexperlen von Interfacial Dynamics (Portland, USA) mit einem Durchmesser von 4  $\mu\text{m}$  und geringer Eigenfluoreszenz waren für diese Experimente besser geeignet. Die Mikroperlen wurden mit LI-Fc oder mit BSA beschichtet, in einem Verhältnis von 1:2 mit unbeschichteten Mikroperlen gemischt und für 90 min mit CHOmLI-Zellen bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen die zytoplasmatische Domäne des LI-Cadherins durchgeführt. Somit konnte zelleigenes LI-Cadherin von dem Fusionsprotein LI-Fc auf den Mikroperlen unterschieden werden. Abb. 25 zeigt Immunfluoreszenz-Aufnahmen (A, LI-Fc-Mikroperlen; C, BSA-Mikroperlen) mit den korrespondierenden Phasenkontrast-Aufnahmen (B, D).



**Abb. 25: Charakterisierung des Kontaktbereichs von Mikroperlen und CHOmLI-Zellen.** LI-Fc-Mikroperlen (A, B) und BSA-Mikroperlen (C, D) wurden für 90 min mit CHOmLI-Zellen inkubiert und anschließend eine Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen die zytoplasmatische Domäne von LI-Cadherin durchgeführt. Fluoreszenz-Aufnahmen (A, C) und korrespondierende Phasenkontrast-Aufnahmen (B, D) sind dargestellt. Der Pfeilkopf in (A) deutet auf eine Anreicherung von LI-Cadherin im Kontaktbereich zu einer Mikroperle. Die Pfeile in (C) weisen auf membranständiges LI-Cadherin hin. Größenmarker, 10  $\mu\text{m}$ .

In Abb. 25A ist eine deutliche Akkumulation von LI-Cadherin im Kontaktbereich mit der LI-Fc-beschichteten Mikroperle zu erkennen (Pfeilkopf). BSA-Mikroperlen führten in LI-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen zu keiner Anreicherung von LI-Cadherin an ihren Kontaktbereichen, auch nicht, wenn diese in der Nähe von Zellgrenzen lagen, in denen LI-



Cadherin von vornherein konzentriert vorlag (Pfeile in C). Der Bindung von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen an CHOMLI-Zellen lag offensichtlich eine homotypische LI-Cadherin-Interaktion zugrunde.

### **3.2.2.2 Bindungseigenschaften der LI-Cadherin Ektodomäne**

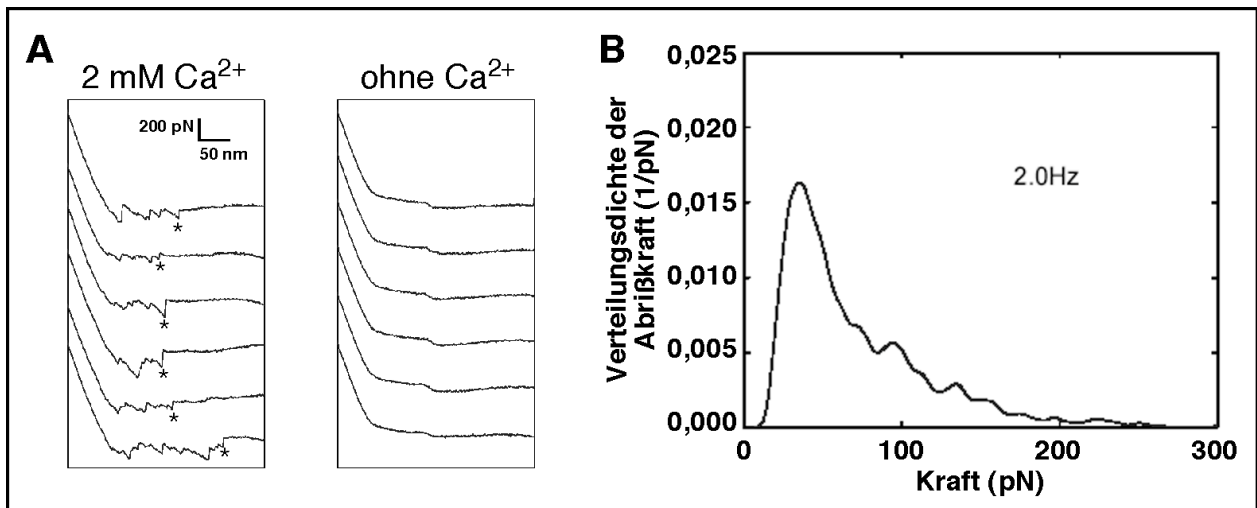
In Kooperation mit Dr. Werner Baumgartner von der Arbeitsgruppe Prof. Drenckhahn (Uni Würzburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie) wurden für die homotypische LI-Cadherin-Interaktion die Bindungsstärke, Lebensdauer und Dissoziationskonstante ermittelt .

#### **Bestimmung der Stärke und Lebensdauer der homotypischen LI-Cadherin-Bindung im AFM**

Da mittels AFM die Abrißkräfte zwischen Molekülinteraktionen gemessen werden können, ließ sich auch für das LI-Fc-Konstrukt die Bindungsstärke unter verschiedenen Bedingungen ermitteln. Die Messungen wurden bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 2 mM durchgeführt, da die Bindungsaktivität der homotypischen LI-Cadherin-Interaktion bei diesem Wert ihre Sättigung erreicht, wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration im AFM und mit der Laserpinzette gezeigt hat (3.2.2.1). Der Versuchsaufbau der AFM-Experimente glich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration im AFM mit der Ausnahme, daß die Abrißgeschwindigkeit variiert wurde. Theoretische Überlegungen (Bell, 1978; Evans and Ritchie, 1997; Grubmuller et al., 1996), aber auch experimentelle Befunde (Merkel et al., 1999; Rief et al., 1997) ließen darauf schließen, daß die Abrißkraft keinen konstanten Wert besitzt sondern von der Abrißgeschwindigkeit abhängt.

Abb. 26A zeigt Beispiele von Kraft-Weg-Kurven mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und ohne  $\text{Ca}^{2+}$  bei einer Abrißgeschwindigkeit von 600 nm/s (2 Hz). Nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  sind spezifische Abrißereignisse zu erkennen. Zur statistischen Auswertung wurde von den Kraft-Weg-Kurven immer das jeweils zuletzt auftretende Abrißereignis (Sternchen in 26A) berücksichtigt.

In Abb. 26B ist die Verteilungsdichte der auftretenden Abrißkräfte bei einer Abrißgeschwindigkeit von 600 nm/s aufgetragen. Die verschiedenen Gipfel stellen die Maximalkraft bei verschiedenen Bindungsereignissen dar, wobei der höchste Gipfel die Trans-Interaktion von zwei LI-Fc-Molekülen, die weiteren, kleineren Gipfel multimere Bindungsereignisse von drei und mehr LI-Fc-Molekülen repräsentieren. Durch einen kürzlich von Baumgartner und Drenckhahn veröffentlichten Algorithmus (Baumgartner and Drenckhahn, 2002c) wurden die Positionen der Kraftmaxima für die jeweils ersten Gipfel bei unterschiedlichen Abrißgeschwindigkeiten berechnet.



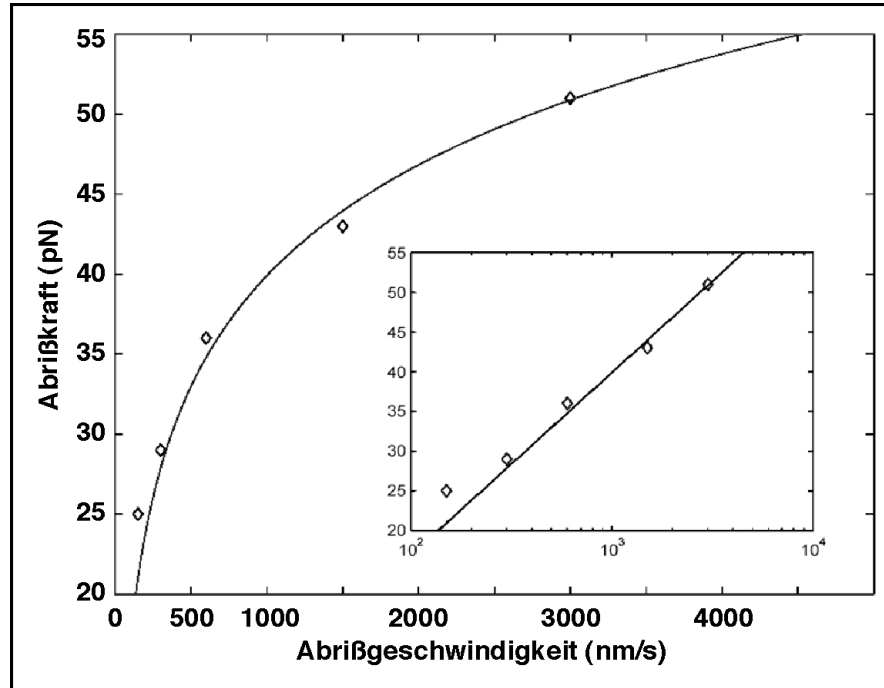
**Abb. 26: Untersuchung der Interaktionsstärke von LI-Cadherin-Bindungen.** (A) Beispiel von Kraft-Weg-Kurven der homotypischen LI-Cadherin-Interaktion im AFM bei einer Scan-Frequenz von 2 Hz in An- und Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>. In Anwesenheit von 2 mM Ca<sup>2+</sup> sind pro Kurve mehrere Abrißereignisse zu erkennen. Zur Auswertung der Bindungsstärke wurde das zuletzt auftretende Abrißereignis (Sternchen) von jeweils mindestens 500 Kraft-Weg-Kurven, von denen über 400 Abrißereignisse aufwiesen, ausgewertet. (B) Verteilungsdichtefunktion der auftretenden Abrißkräfte von LI-Cadherin-Interaktionen bei einer Scan-Frequenz von 2 Hz.

In Tabelle 1 sind die errechneten Kraftmaxima für die Trans-Interaktion von LI-Cadherin in Abhängigkeit von unterschiedlichen Abrißgeschwindigkeiten zusammengefaßt.

Frequenz (Hz)	Abrißgeschwindigkeit (nm/s)	Kraftmaximum (pN)
0,5	150	27
1,0	300	29
2,0	600	36
5,0	1500	42
10,0	3000	51

**Tabelle 1: Maximale Abrißkräfte der LI-Cadherin-Interaktion bei verschiedenen Abrißgeschwindigkeiten.** Unter Anwendung eines von Baumgartner und Drenckhahn entwickelten Algorithmus (Baumgartner and Drenckhahn, 2002c) konnte den jeweiligen höchsten Gipfeln der Verteilungsdichtefunktionen (Abb. 26B) von Abrißkräften bei unterschiedlichen Abrißgeschwindigkeiten eine Gauß-Funktion angepaßt werden und somit die maximalen Abrißkräfte bestimmt werden.

Ausgehend von diesen Werten wurde die Abhängigkeit der Abrißkraft von der Abrißgeschwindigkeit (Bell, 1978) in Abb. 27 graphisch dargestellt. Die Abrißkraft ist hier gegen die Abrißgeschwindigkeit einfach und in der Einfügung (kleines Bild) logarithmisch aufgetragen.



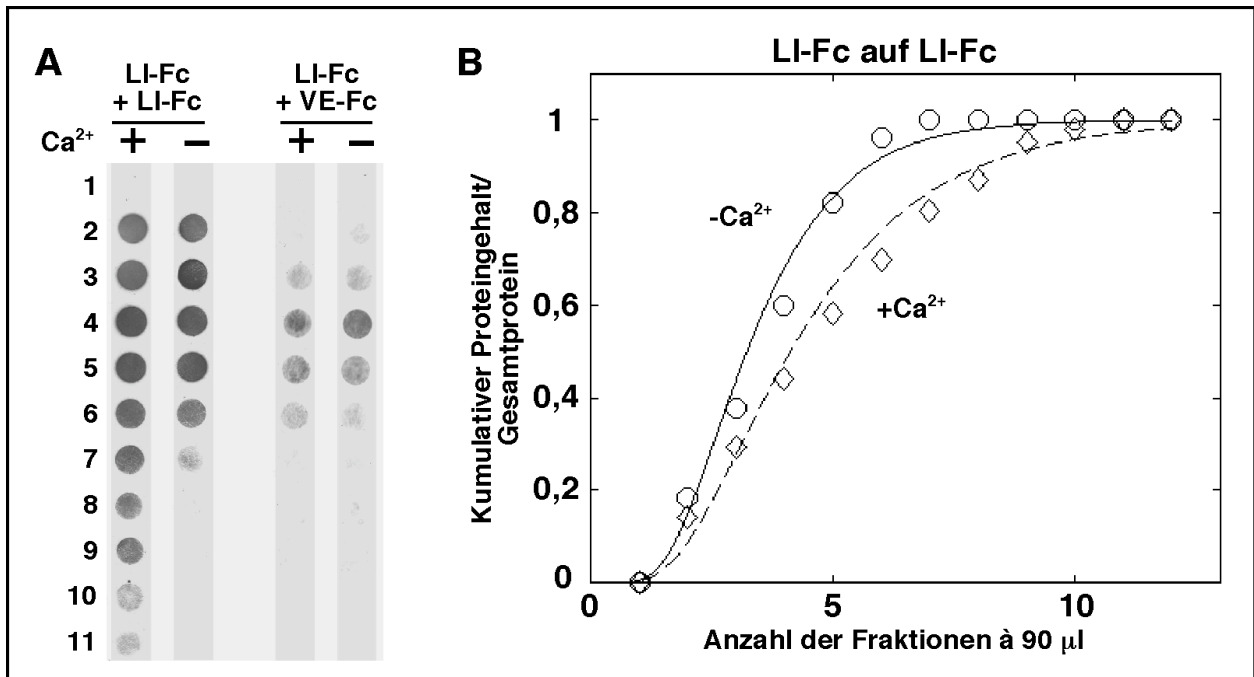
**Abb. 27: Abhängigkeit der Abrißkraft von der Abrißgeschwindigkeit der LI-Cadherin-Interaktion.** Die sich aus den verschiedenen Verteilungsdichtefunktionen bei unterschiedlichen Abrißgeschwindigkeiten ergebenden maximalen Abrißkräfte (Tabelle 1) sind hier gegen die Abrißgeschwindigkeiten einfach und im Einschub (kleines Bild) logarithmisch dargestellt. Durch Extrapolation kann die Lebensdauer der Molekül-Interaktion bei einer Abrißgeschwindigkeit von 0 ermittelt werden (Baumgartner et al., 2000a; Bell, 1978).

Die Erhöhung der Abrißgeschwindigkeit führte also zu einem logarithmischen Anstieg der Abrißkraft. Aus dieser Beziehung läßt sich nach Bell die Lebensdauer der Bindung bei einer Abrißkraft gleich 0 extrapolieren (Bell, 1978; Zhu, 2000). Für die LI-Cadherin-Bindung ergab sich so eine Lebensdauer von 1,4 s wenn keine äußere Kraft auf die Interaktion wirkt.

#### **Ermittlung der $K_D$ von LI-Cadherin-Interaktionen durch Affinitätschromatographie**

Zur Bestimmung der Affinitätskonstante von homotypischen VE-Cadherin-Interaktionen wurde eine auf der Affinitätschromatographie basierende Methode entwickelt (Baumgartner and Drenckhahn, 2002b). Hierbei wurde die Affinität von löslichen dimeren VE-Cadherin-Ektodomänen (VE-Fc) an stationärem VE-Fc, welches an eine CNBr-aktivierte Sepharose-Säule gebunden war, untersucht.

Die gleiche Methode wurde auch zur Analyse der Affinität von LI-Cadherin-Interaktionen angewendet. Über eine LI-Fc-Säule wurde in An- oder in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$  lösliches LI-Fc oder zur Kontrolle lösliches VE-Fc gegeben und 90  $\mu$ l-Fractionen des jeweiligen Durchflusses gesammelt. Abb. 28A zeigt den Nachweis der Fusionsproteine in den Fractionen mittels Tüpfelblot gegen die jeweiligen Cadherin-Ektodomänen. In Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  zeigte sich gegenüber des  $Ca^{2+}$ -freien Säulenlaufs eine deutliche Verzögerung im Laufverhalten von LI-Fc.

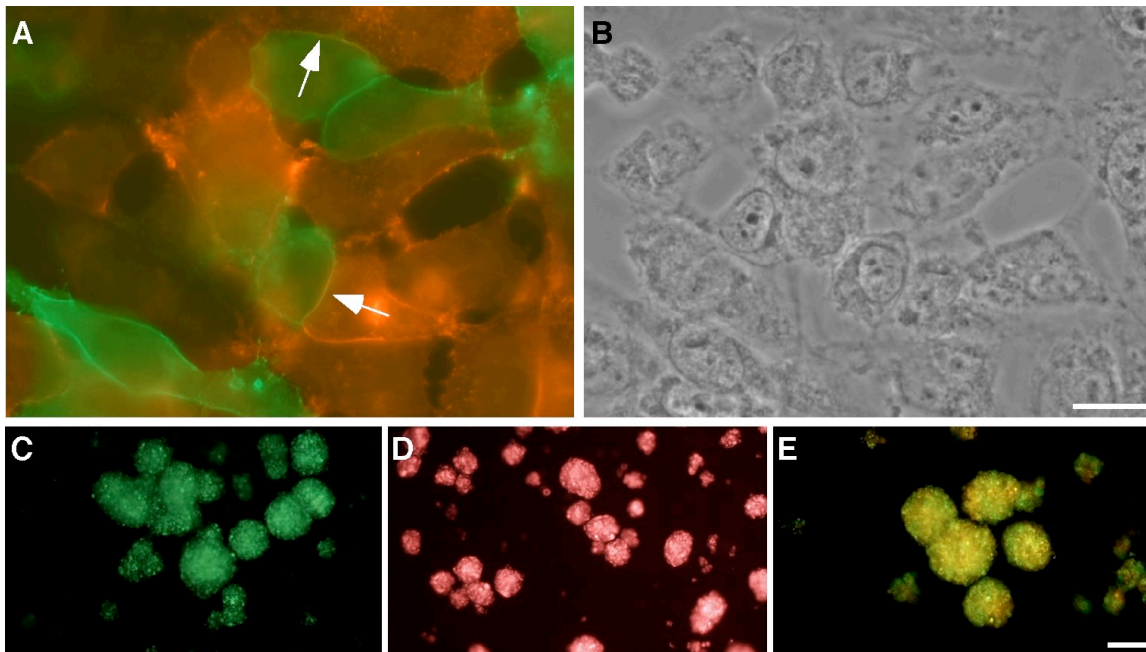


**Abb. 28: Affinitätschromatographie von LI-Fc auf einer LI-Fc-Säule.** LI-Fc (0,46mg) und BSA (0,45mg) wurden an eine CNBR-Sepharose-Säule immobilisiert. Über die Säule wurden einmal 11 µl lösliches LI-Fc und ein anderes Mal 11 µl lösliches VE-Fc (Baumgartner et al., 2000a) mit einer Konzentration von jeweils 1,7 mg/ml gegeben. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,09 ml/min wurden 90 µl-Fractionen in An- und Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> gesammelt und einem Tüpfelblot gegen die jeweiligen Cadherin-Ektodomänen unterzogen (A). In (B) wurde ein repräsentativer Säulenlauf ausgewertet, wobei die kumulative Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Fraktionsnummer graphisch dargestellt wurde. Für diese Auswertung ergab sich eine K<sub>D</sub> von etwa 29 µM. Es wurden n=4 Läufe durchgeführt. Die K<sub>D</sub>-Werte lagen zwischen 19 µM und 55 µM und waren logarithmisch normalverteilt.

Für VE-Fc war das Laufverhalten in der LI-Fc-Säule Ca<sup>2+</sup>-unabhängig und verhielt sich ähnlich wie LI-Fc unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen. Die unterschiedliche Signalstärke der Tüpfelblots erklärt sich aus der Verwendung verschiedener Primärantikörper zur Detektion von LI-Fc und VE-Fc. In Abb. 28B wurde der kumulative Proteingehalt der Fraktionen gegen die Anzahl der Fraktionen aufgetragen. Das Laufverhalten von LI-Fc bei Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>, also keiner LI-Fc-Interaktion, ermöglichte die Bestimmung des Ausschlußvolumens der Säule und des Diffusionskoeffizienten. Da die Durchflußgeschwindigkeit und die Konzentration des gekoppelten Proteins konstant gehalten wurden, konnte durch die Veränderung des K<sub>D</sub>-Wertes die Kurve den Werten in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-angepaßt werden und somit die K<sub>D</sub> nach Anpassung der Kurve bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte nach der gleichen Methode, wie sie bereits für VE-Cadherin beschrieben wurde (Baumgartner and Drenckhahn, 2002b). Es wurden vier unabhängige Läufe durchgeführt, wobei die gemittelte K<sub>D</sub> bei 27 µM lag. Für den Säulenlauf in Abb. 28 ergab sich ein K<sub>D</sub>-Wert von 29 µM, ansonsten lagen die Werte zwischen 19 µM und 55 µM.

### 3.3 Nachweis der heterotypischen Interaktion von LI- mit E-Cadherin

Bei der Untersuchung von Kokulturen LI- und E-Cadherin-exprimierender CHO-Zellen sowie von Mischaggregaten derselben Zellen im Aggregationsassay fiel auf, daß LI- und E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen gemeinsame Zellgrenzen beziehungsweise gemeinsame Aggregate ausbildeten. Abb. 29 zeigt eine Immunfluoreszenz-Aufnahme (A) mit korrespondierender Phasenkontrast-Aufnahme (B) der Mischkultur von CHOmLI- und CHOmE-Zellen nach Doppelfärbung gegen LI- (grün) und E-Cadherin (rot).



**Abb. 29: Mischkultur und Mischaggregate von CHOmLI- und CHOmE-Zellen.** Immunfluoreszenz-Aufnahme (A) mit korrespondierender Phasenkontrast-Aufnahme (B) von Mischkulturen bestehend aus CHOmLI- (grün) und CHOmE-Zellen (rot), die jeweils mit spezifischen Antikörpern gegen LI- bzw. E-Cadherin inkubiert wurden. Die Immunfluoreszenz-Aufnahme erfolgte mit einem Filtersatz, der die parallele Detektion der grünen (FITC) und der roten (Alexa Fluor 594) Fluoreszenz erlaubt. Beide CHO-Zelltypen weisen gemeinsame Zellgrenzen auf (Pfeile). Aggregations-Assay im hängenden Tropfen von DiO-gefärbten CHOmLI- (C), DiI-gefärbten CHOmE-Zellen (D) und von einer Mischung aus beiden Zelltypen (E). Die beiden Zelltypen wurden mit den Farbstoffen DiO und DiI zur Lebendfärbung von Zellen inkubiert und danach für den Aggregations-Assay getrennt oder im gleichen Verhältnis gemischt eingesetzt. Größenmarker in (B) 20  $\mu\text{m}$  und in (E) 100  $\mu\text{m}$ .

Die Pfeile deuten auf gemeinsame Zellgrenzen, die sowohl LI- als auch E-Cadherin enthalten und aufgrund der Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz gelblich erscheinen. Auch im hängenden Tropfen bildeten LI-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen gemeinsame Cluster mit CHOmE-Zellen. In Abb. 29 sind Aggregate von DiO-gefärbten CHOmLI-Zellen (C), von DiI-gefärbten CHOmE-Zellen (D) und Aggregate von den gefärbten CHOmLI- und CHOmE-Zellen zu sehen, die vor der Inkubation im gleichen Verhältnis gemischt wurden (E). Es zeigte sich, daß die gefärbten CHOmLI- (grün) und CHOmE-Zellen (rot) jeweils für sich globuläre Aggregate ausbildeten und daß bei einer Mischung dieser Zelltypen Cluster ausgebildet wurden, die sowohl

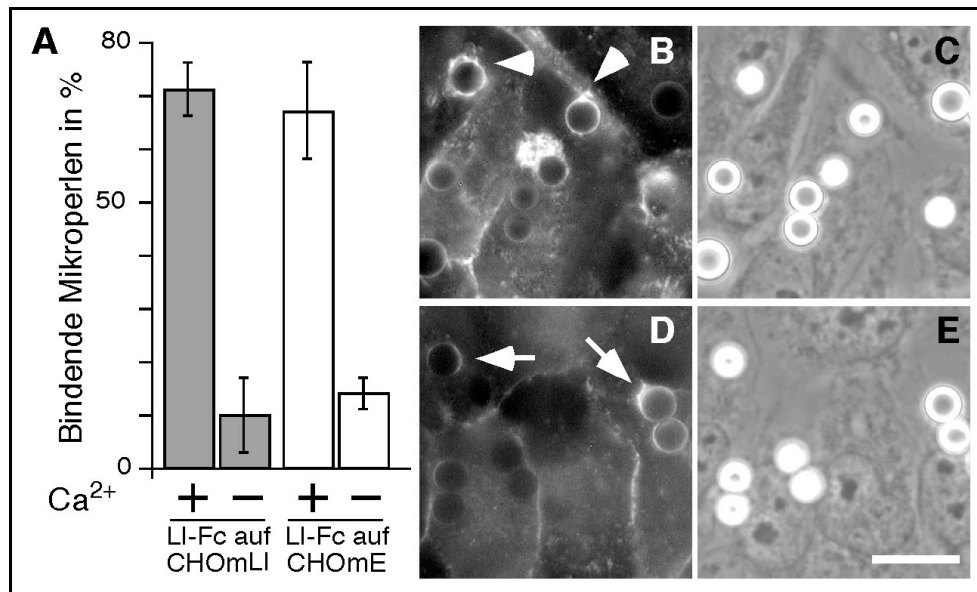
LI-Cadherin- als auch E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen enthielten (gelb). Hierin verhielten sich die Mischaggregate vergleichbar mit Aggregaten homogener Zellpopulation von CHOMLI- bzw. CHOMe-Zellen, von denen vor Durchführung des Aggregationsassays jeweils die eine Hälfte der Zellen mit DiI und die andere Hälfte mit DiO gefärbt wurde (Daten nicht gezeigt). Eine Segregation von LI- und E-Cadherin-exprimierenden Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Ob der Koaggregation von CHOMLI und CHOMe eine heterotypische Interaktion der beiden Cadherine zugrunde lag, war mit diesen Experimenten nicht eindeutig zu klären, da auch untransfizierte CHO-Zellen mit CHOMLI und CHOMe gemeinsame Zellgrenzen ausbildeten und sich in Aggregaten der jeweiligen Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen fanden (Daten nicht gezeigt). Im weiteren wurde diese Frage mit Hilfe der LI-Fc-beschichteten Mikroperlen unter definierten Bedingungen untersucht.

### **3.3.1 Bindung von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen auf CHOMe-Zellen**

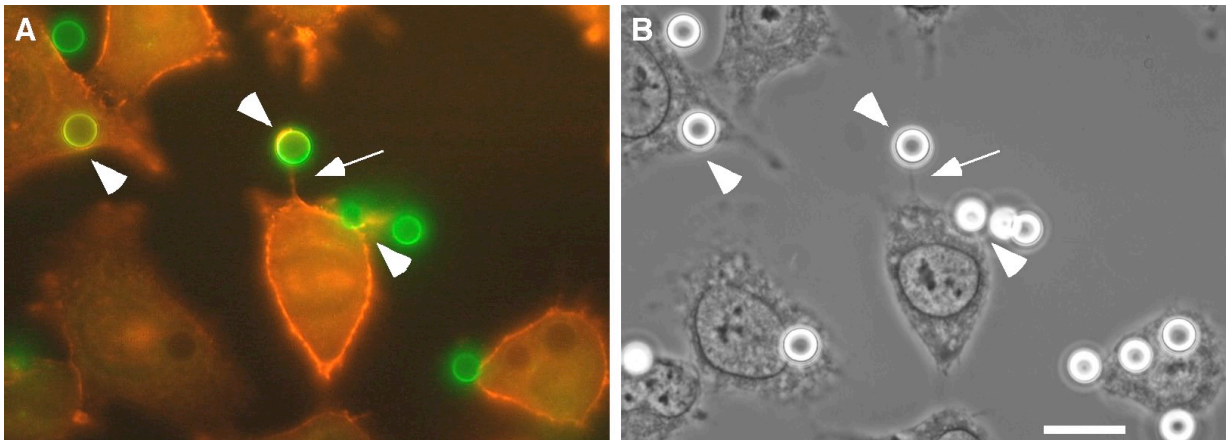
Mit Hilfe der Laserpinzette konnte die Bindungswahrscheinlichkeit von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen auf CHOMe-Zellen mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$  mit ihrem Bindungsverhalten auf CHOMLI-Zellen verglichen werden. Abb. 30A faßt die Daten von drei unabhängigen Experimenten zusammen, bei denen jeweils das Bindungsverhalten von mindestens 200 Mikroperlen untersucht wurde. Bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1,8 mM hafteten 71% ( $\pm 5\%$ ) der LI-Fc-Mikroperlen auf CHOMLI-Zellen, während ohne  $\text{Ca}^{2+}$  nur 10% ( $\pm 7\%$ ) hafteten. Eine vergleichbare Menge der LI-Fc-Mikroperlen (67%  $\pm 9\%$ ) interagierte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig auch mit E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen. Ohne  $\text{Ca}^{2+}$  ließen sich nur noch 14% ( $\pm 3\%$ ) der Mikroperlen nicht von den CHOMe-Zellen entfernen. Wie zuvor schon gezeigt (Abb. 24A), wiesen LI-Fc-Mikroperlen auf untransfizierten CHO-Zellen nur eine geringe Bindungswahrscheinlichkeit von 14% ( $\pm 4\%$ ) auf. Die höhere Bindungswahrscheinlichkeit von LI-Fc-Mikroperlen auf CHOMLI-Zellen gegenüber den Experimenten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration (Abb. 24A) kam durch die Verwendung einer neuen Charge Mikroperlen zustande, die eine höhere Beschichtungsdichte mit LI-Fc aufwiesen.

Des weiteren sind in Abb. 30 Immunfluoreszenz-Aufnahmen von LI-Fc-Mikroperlen auf CHOMLI nach Färbung gegen den zytoplasmatischen Anteil von LI-Cadherin (B) und auf CHOMe nach Färbung gegen E-Cadherin (D) mit ihren korrespondierenden Phasenkontrast-Aufnahmen (C und E) einander gegenübergestellt. Die Bindung von LI-Fc-Mikroperlen führte zur Akkumulation von LI-Cadherin (Pfeilköpfe) an den Kontaktbereichen zu den CHOMLI-Zellen und auch zur Anreicherung von E-Cadherin (Pfeile) in CHOMe-Zellen.



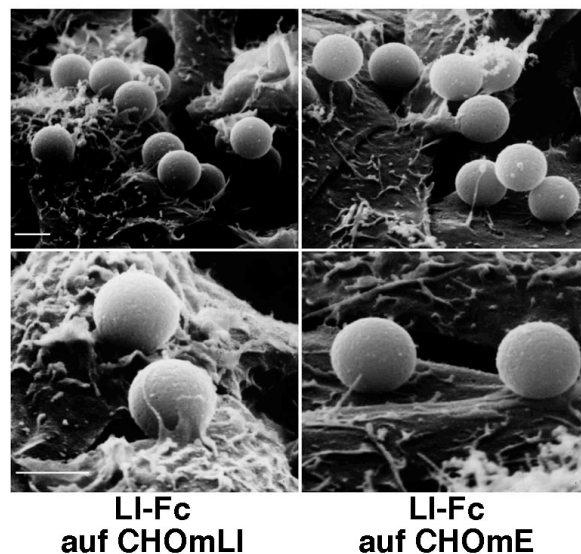
**Abb. 30: Bindungsverhalten von LI-Fc-Mikroperlen auf CHOME-Zellen.** In (A) ist das Bindungsverhalten von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen in An- und Abwesenheit (1,8 mM) von Ca<sup>2+</sup> sowohl auf CHOMLI- als auch auf CHOME-Zellen dargestellt. Die Datenpunkte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten wieder, bei denen jeweils mindestens 200 Mikroperlen untersucht wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Mit LI-Fc beschichtete Mikroperlen wurden mit CHOMLI- (B, C) und mit CHOME-Zellen (D, E) inkubiert und anschließend wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Abb. (B) zeigt eine Immunfluoreszenz-Aufnahme von CHOMLI-Zellen nach Detektion des zytoplasmatischen Anteils von LI-Cadherin. In (D) wurde E-Cadherin in CHOME-Zellen durch spezifische Antikörper detektiert. In den Kontaktbereichen der jeweiligen Zellen zu den LI-Fc-beschichteten Mikroperlen reicherte sich sowohl LI-Cadherin (Pfeilköpfe) als auch E-Cadherin (Pfeile) an. (C) und (E) zeigen die korrespondierenden Phasenkontrast-Aufnahmen. Größenmarker, 10 µm

Mittels Doppelfluoreszenzfärbung gegen LI- und E-Cadherin nach Inkubation von LI-Fc-Mikroperlen auf CHOME-Zellen wurde zusätzlich eine Kolo-kalisation von LI- und E-Cadherin nachgewiesen (Abb. 31). An den Kontaktbereichen von LI-Fc-Mikroperlen (grün) und CHOME-Zellen (rot) reicherte sich E-Cadherin an und führte durch die Fluoreszenzüberlagerung zu einer Gelbfärbung (Abb. 31B, Pfeilköpfe). Die Zelle in der Bildmitte besitzt einen Kontakt mit einer LI-Fc-Mikroperle über ein Filopodium (Pfeil). Der initiale Kontakt zwischen vereinzelteten Zellen wird in ähnlicher Weise über Filopodien vermittelt (s. auch Abb. 9).



**Abb. 31: Doppelfärbung von LI- und E-Cadherin nach Inkubation von LI-Fc-Mikroperlen mit CHOmE-Zellen.** Immunfluoreszenz-Aufnahme (A) mit korrespondierender Phasenkontrast-Aufnahme (B) von E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen, die mit LI-Fc-beschichteten Mikroperlen inkubiert wurden. Mittels Doppelfluoreszenzfärbung wurde LI- (grün) und E-Cadherin (rot) nachgewiesen. Die Zelle in der Bildmitte besitzt eine Verbindung mit der Mikroperle über ein Filopodium (Pfeil). Der Kontaktbereich zwischen Zellmembran und Mikroperle erscheint aufgrund der Fluoreszenzüberlagerung gelb (Pfeilköpfe). Größenmarker, 10  $\mu\text{m}$ .

Zusätzlich wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie die Kontakte LI-Fc-beschichteter Mikroperlen mit LI- und E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen untersucht. Sowohl CHOmLI- als auch CHOmE-Zellen zeigten spezifische Membranfortsätze, die mit der Oberfläche der Mikroperlen interagierten (Abb. 32). Der Kontakt der LI-Fc-Mikroperlen mit der Membranoberfläche induzierte also eine Spezialisierung der Zellmembran in den Kontaktbereichen.



**Abb. 32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von LI-Fc-Mikroperlen auf CHOmLI- und CHOmE-Zellen.** Mikroperlen wurden mit LI-Fc beschichtet und für etwa 20 min mit LI- oder E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen inkubiert, bevor diese für die Rasterelektronenmikroskopie mit 6,5% Glutaraldehyd in HBSS fixiert, in einer Acetonreihe entwässert und mit Palladium-Gold beschichtet wurden. Die Aufnahmen wurden mit einem JSM-840 Rasterelektronenmikroskop (Jeol, Tokyo, Japan) gemacht. Größenmarker, 2  $\mu\text{m}$ .



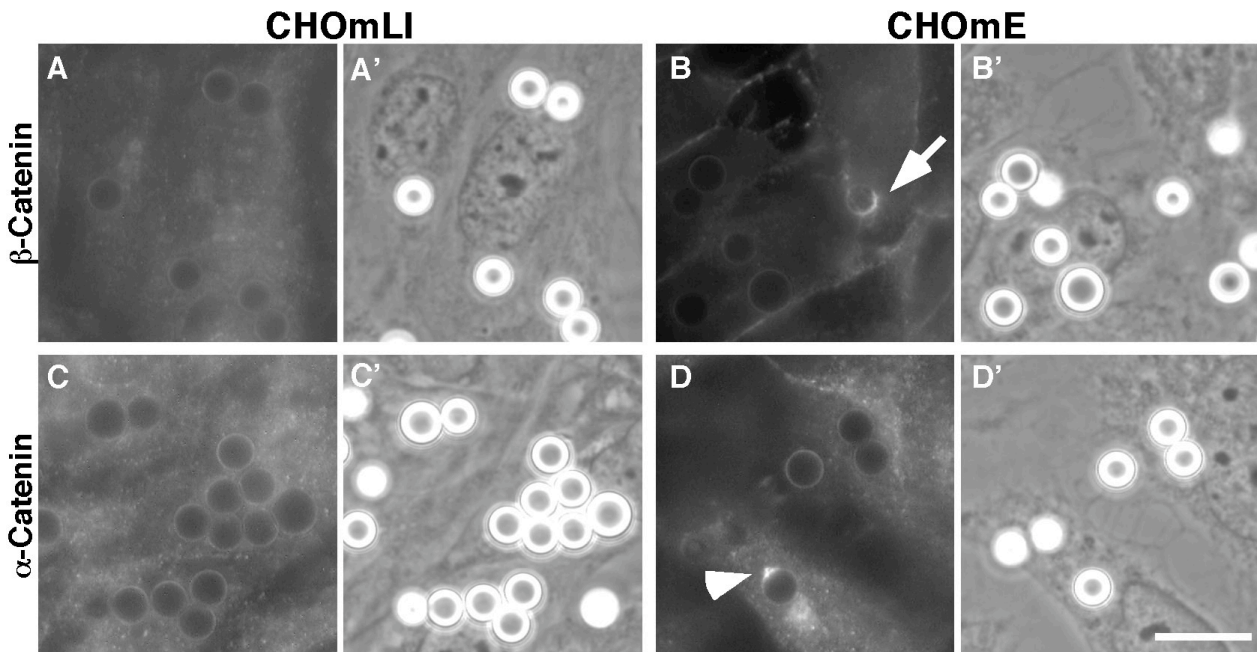
Untransfizierte CHO-Zellen wiesen im Rasterelektronenmikroskop genauso wenig spezialisierte Membranbereiche nach Inkubation mit LI-Fc-Mikroperlen auf wie CHOmLI-Zellen nach Inkubation mit BSA-beschichteten Mikroperlen (nicht gezeigt). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus den Laserpinzetten-Experimenten (s. auch Abb. 24). Der Befund einer möglichen heterotypischen Interaktion von LI- und E-Cadherin aus Kokulturen und aus den Mischaggregaten ließ sich also in den Experimenten mit der Laserpinzette bestätigen und auf eine spezifische Interaktion zwischen LI- und E-Cadherin zurückführen.

Es stellte sich die Frage, ob die Interaktion von LI- mit E-Cadherin in CHO-Zellen bezüglich der zytoplasmatischen Verankerung von E-Cadherin die gleiche Qualität aufwies wie eine homotypische E-Cadherin-Interaktion.

### **3.3.2 Charakterisierung der Adhäsionskontakte von Mikroperlen auf CHO-Zellen**

E-Cadherin ist zytoplasmatisch über  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft (Ozawa et al., 1989; Rimm et al., 1995) und führt auch in den hier beschriebenen CHOmE-Zellen zu einem Anstieg der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin-Konzentration gegenüber untransfizierten und LI-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen (3.1.2.1). Mittels LI-Fc-beschichteter Mikroperlen wurde bereits eine heterotypische Interaktion zwischen LI- und E-Cadherin nachgewiesen. Gleichmaßen wurde untersucht, ob diese heterotypische Interaktion auch zur Rekrutierung und Anreicherung von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin an die zytoplasmatischen Bereiche der Kontaktstellen von LI- und E-Cadherin führt (Abb. 33). LI-Fc-Mikroperlen wurden mit CHOmLI (A, A' und C, C') oder mit CHOmE-Zellen (B, B' und D, D') inkubiert, bevor eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin durchgeführt wurde .

Abb. 33 zeigt Immunfluoreszenz-Aufnahmen nach  $\beta$ -Catenin- (A, B) und nach  $\alpha$ -Catenin-Färbung (C, D) mit den korrespondierenden Phasenkontrast-Aufnahmen (A',B' bzw. C', D'). Für LI-Cadherin-exprimierende Zellen ergab sich keine Anreicherung von  $\beta$ - oder  $\alpha$ -Catenin, wie aufgrund der unveränderten Konzentration von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin gegenüber untransfizierten CHO-Zellen bereits vermutet werden konnte (Abb. 10). Dies zeigte sich auch in der gegenüber CHOmE-Zellen schwächeren Immunfärbung von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin in CHOmLI-Zellen (Abb. 33 A und C). E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen hingegen wiesen ein stärkeres Signal nach  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin-Detektion auf (B, D), welches auch an den Zell-Zellgrenzen konzentriert war.



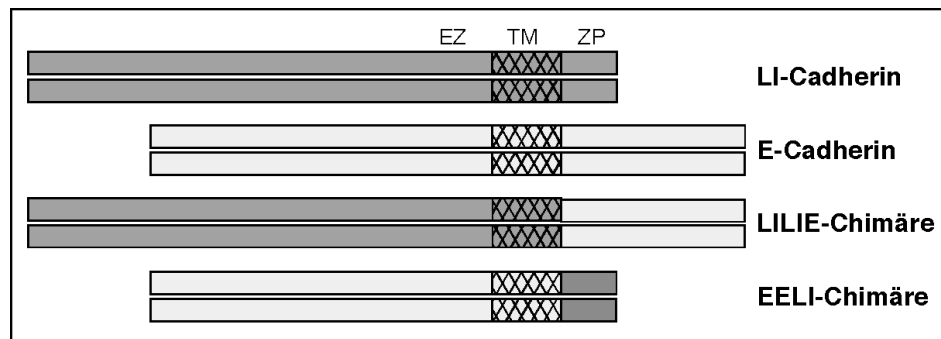
**Abb. 33: Ausbildung einer für E-Cadherin typischen Zytoskelett-Verankerung nach Inkubation von LI-Fc-Mikroperlen mit CHOmE-Zellen.** Immunfluoreszenz-Aufnahmen von CHOmLI- (A, C) und CHOmE-Zellen (B, D), die gegen  $\beta$ - (A, B) oder  $\alpha$ -Catenin (C, D) gefärbt wurden, mit ihren korrespondierenden Phasenkontrast-Aufnahmen (A', C' bzw. B', D'). CHOmLI-Zellen zeigen keine Akkumulation von  $\beta$ - (A) und  $\alpha$ -Catenin (C), während CHOmE-Zellen eine Rekrutierung von  $\beta$ - (B, Pfeil) und  $\alpha$ -Catenin (D, Pfeilkopf) an einigen Kontaktbereichen zwischen den Zellen und LI-Fc-Mikroperlen aufweisen. Größenmarker, 10  $\mu$ m.

Darüber hinaus induzierten einige Mikroperlen eine Akkumulation von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin an den Kontaktstellen zu CHOmE-Zellen (Pfeilkopf in C bzw. Pfeil in D).

Die Inkubation von BSA-beschichteten Mikroperlen mit CHOmE-Zellen induzierte keine Anreicherung von E-Cadherin,  $\beta$ - oder  $\alpha$ -Catenin in den Kontaktzonen von Zellen und Mikroperlen (Daten nicht gezeigt). Die heterotypische Interaktion von LI- mit E-Cadherin schien bezüglich der Kontakte mit  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin von gleicher Qualität zu sein wie die homotypische E-Cadherin-Interaktion.

### 3.3.3 Stabile Expression von E-/LI-Cadherin-Chimären in CHO-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der heterotypischen Interaktionen von LI- mit E-Cadherin und um den Beitrag der zytoplasmatischen Domänen von LI- und E-Cadherin für ihre Adhäsionseigenschaften zu untersuchen, wurden bereits CHO-Zelltypen hergestellt, die chimäre Proteine bestehend aus der extrazellulären und Transmembran-Domäne von LI-Cadherin und der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin (LILIE) oder ein reziprok aufgebautes Protein (EELI) stabil exprimieren (Abb. 34).



**Abb. 34: Schema der Cadherin-Chimären bestehend aus unterschiedlichen Anteilen von LI- und E-Cadherin.** EZ, Extrazellulärer Anteil; TM, Transmembran-domäne; ZP: zyttoplasmatische Domäne.

Das chimäre Konstrukt EELI wurde durch XbaI und SalI aus dem Vektor pSK<sup>+</sup>EELI isoliert und gerichtet in die gleichen Schnittstellen des Expressionsvektors pACCMVpLpA ligiert. Zur einfacheren Subklonierung der LILIE-Chimäre wurde in die SacI-Schnittstelle von pSK<sup>+</sup>LILIE ein Linker mit einer XbaI-Schnittstelle eingebaut. Nun konnte über XbaI die codierende Region für LILIE isoliert und in die dephosphorylierte XbaI-Schnittstelle von pACCMVpLpA ligiert werden. Bei diesem Ansatz war eine gerichtete Ligation nicht möglich, folglich wurde die korrekte Orientierung des Fragmentes mittels analytischem Restriktionsendonukleaseverdau kontrolliert. Die codierende Region der Expressionsvektoren wurde durch bidirektionale Sequenzierung überprüft. Die Expressionsvektoren pACC-EELI und pACC-LILIE wurden bereits stabil in CHO-Zellen transfiziert, so daß nun auch CHO-Zelltypen vorhanden sind, die die chimären Proteine EELI und LILIE exprimieren (CHO-EELI und CHO-LILIE).

Diese Zellen sollen in Zukunft hinsichtlich der Lokalisation und Funktionalität der chimären Proteine charakterisiert und bezüglich ihrer Bindungseigenschaften von Cadherin-Fc-Konstrukten mit der Laserpinzette untersucht werden.