

## 4 Diskussion

Die Superfamilie der Cadherine umfaßt mehrere Familien glykosilierter Membranproteine, die eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zelladhäsion vermitteln und deren extrazellulärer Bereich durch eine Wiederholung von Cadherin-typischen Domänen (Cadherin-Domänen) gekennzeichnet ist (Angst et al., 2001). Cadherine werden in zahlreichen Geweben exprimiert und sind an morphoregulatorischen Prozessen während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus beteiligt (Takeichi, 1995; Vleminckx and Kemler, 1999).

Die 7D-Cadherine mit ihren Vertretern LI- und Ksp-Cadherin stellen eine eigene Familie innerhalb der Cadherin-Superfamilie dar, die sich strukturell klar von anderen Cadherinfamilien abgrenzt (Berndorff et al., 1994; Thomson et al., 1995). Sie besitzen sieben extrazelluläre Cadherin-Domänen und eine gegenüber klassischen Cadherinen stark verkürzte zytoplasmatische Domäne, die nur etwa 25 Aminosäuren umfaßt. LI-Cadherin vermittelt unabhängig von seiner zytoplasmatischen Domäne eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zellaggregation (Kreft et al., 1997). Ksp-Cadherin wurde hinsichtlich seines Nieren-spezifischen Expressionsmusters (Thomson and Aronson, 1999) und seines dafür verantwortlichen Promotors untersucht (Bai et al., 2002; Igarashi et al., 1999; Whyte et al., 1999). Über die Funktion von Ksp-Cadherin war bislang nichts bekannt, auch nicht, ob es überhaupt in der Lage ist, Zelladhäsion zu vermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Adhäsionseigenschaften der 7D-Cadherine charakterisiert. Ksp-Cadherin wurde erstmals hinsichtlich seiner Funktion als Adhäsionsmolekül in Zellkultur-experimenten untersucht. Für die homotypische LI-Cadherin-Interaktion konnte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluß und die Bindungsparameter definiert werden. Des weiteren wurde eine heterotypische Interaktion von LI- mit E-Cadherin in Zellkulturexperimenten nachgewiesen.

### 4.1 Die Funktion von Ksp-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül

Ksp-Cadherin wurde auf der Suche nach einem  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Transporter aus der Kaninchen-Niere isoliert und wies bezüglich seiner Proteinstruktur eine klare Homologie zu LI-Cadherin auf (Thomson et al., 1995). Während für LI-Cadherin die Vermittlung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zellaggregation in LI-Cadherin-transfizierten S2-Zellen nachgewiesen werden konnte, war bezüglich der Funktion von Ksp-Cadherin nichts bekannt. Der einzige Hinweis, daß sich der extrazelluläre Anteil von Ksp-Cadherin ähnlich dem anderer Cadherine verhält, war seine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Sensitivität gegenüber der proteolytischen Spaltung durch Trypsin (Thomson et al., 1995).

Um zu untersuchen, ob Ksp-Cadherin in der Lage ist, Zelladhäsion zu vermitteln, wurde die cDNA des murinen Ksp-Cadherins (Hecking, 2002) stabil in CHO-Zellen zur Expression gebracht. Zum Vergleich wurden auch LI-Cadherin, das zuerst beschriebene Mitglied der 7D-Cadherin-Familie

(Berndorff et al., 1994), und E-Cadherin (Schuh et al., 1986), der bekannteste Vertreter der klassischen Cadherine, in CHO-Zellen stabil exprimiert (Abb. 8).

#### 4.1.1 Einfluß der Ksp-Expression auf die Zellmorphologie von CHO-Zellen

Ksp-, LI- und E-Cadherin zeigten in CHO-Zellen eine membranständige Lokalisation und waren in den Bereichen der Zell-Zellkontakte konzentriert (Abb. 9). Bei geringerer Zelldichte unterschied sich die Morphologie von 7D-Cadherin- und E-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen. Im subkonfluenten Zustand ähnelten sowohl CHOmKsp- als auch CHOmLI-Zellen den untransfizierten CHO-Zellen, die einen spindelförmigen Phänotyp besitzen. E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen hingegen schienen die Zellkontakte zu benachbarten Zellen zu maximieren, indem sie ihre Zellkörper vergrößerten. Bei hoher Zelldichte induzierten sowohl die 7D-Cadherine als auch E-Cadherin im Vergleich zu untransfizierten CHO-Zellen eine kompakte, globuläre Morphologie, die bei CHOmE-Zellen am deutlichsten ausgeprägt war. E-Cadherin war hier in zahlreichen sogenannten "*Punctae*" konzentriert. Diese *Punctae* wurden von mehreren Arbeitsgruppen als Zwischenstufen bei der Ausformung der *Zonulae adhaerentes* beschrieben (Adams et al., 1998; McNeill et al., 1993; Vasioukhin et al., 2000; Yonemura et al., 1995). Ksp- und auch LI-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen wiesen keine *Punctae* auf, was wahrscheinlich mit der unterschiedlichen Zytoskelettverankerung dieser Cadherine zusammenhängt.

Für E-Cadherin ist bekannt, daß es über  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft ist und bei Überexpression zu einem Anstieg der Konzentration dieser Proteine führt (Nakagawa and Takeichi, 1995; Ozawa and Kemler, 1998b; Rimm et al., 1995). LI-Cadherin hingegen zeigt keine  $\beta$ - oder  $\alpha$ -Catenin-vermittelte Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett (Kreft et al., 1997). In stabil transfizierten CHO-Zellen konnten diese beiden Befunde bestätigt werden (Abb. 10 und 11). Ksp-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen zeigten einen gegenüber CHOmE-Zellen zwar geringeren, aber reproduzierbaren Anstieg von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin. Doch war mittels Koimmunpräzipitation, bei der die direkte Interaktion von E-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden konnte, eine Interaktion von Ksp-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin nicht zu beobachten (Abb. 11). Eine direkte Interaktion von Ksp-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin ist eher unwahrscheinlich, da die zytoplasmatische Domäne von Ksp-Cadherin keine Homologie zu der von klassischen Cadherinen aufweist und insbesondere die konservierten Bindungsmotive für die Catenin-Interaktion (Stappert and Kemler, 1994) fehlen.

Möglicherweise handelt es sich bei dem geringen Anstieg von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin in Ksp-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen um einen indirekten Effekt, der über endogene Adhäsionsmoleküle vermittelt wird. Allerdings zeigen CHO-Zellen eine niedrige Zell-Zelladhäsion, die erst nach Transfektion mit N-Cadherin (Levenberg et al., 1998; Salomon et al., 1992), C-Cadherin (Niessen and Gumbiner, 2002) oder VE-Cadherin (Breviario et al., 1995) stark ansteigt. Zudem war eine Expression von Ksp-, LI- oder E-Cadherin in untransfizierten CHO-Zellen nicht detektierbar (Abb. 8).

Dennoch gibt es Hinweise, daß CHO-Zellen nach Transfektion mit Subtypen des muscarinischen Acetylcholinrezeptors und Aktivierung derselben eine verstärkte Zell-Zelladhäsion aufweisen, die mit der Expression endogener Cadherine, wie E-, K- und T1-Cadherin, in Zusammenhang gebracht wurde (Shafer et al., 1999). In Lungenkarzinom-Zellen führt die Stimulation des Acetylcholinrezeptors vom Subtyp  $M_3$  zur Aktivierung der durch E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion (Williams et al., 1993). Jedoch konnte mittels Immunoblot keine Expression von E- oder K-Cadherin in Ksp-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Es ist fraglich, ob die Expression dieser Cadherine unterhalb der Nachweisgrenze im Immunoblot einen Einfluß auf  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin ausüben kann. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß die Expression von Ksp-Cadherin zur Hochregulierung eines anderen klassischen Cadherins führt, welches wiederum eine Erhöhung der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin-Konzentration in CHOmKsp-Zellen induziert. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse aus den Aggregationsassays.

#### **4.1.2 Aggregationsverhalten von Ksp-Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen**

Im Gegensatz zu untransfizierten CHO-Zellen bilden Ksp-, LI- und E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen im Aggregationsassay große, globuläre Aggregate aus (Abb. 13). Die Expression der jeweiligen Cadherine führte im hängenden Tropfen, bei dem nur die Schwerkraft als äußerer Einfluß auf die Zellen einwirkt, und in einem Schüttel-Assay, bei dem die Zellen einer horizontalen Rotation unterworfen werden, zu einem deutlichen Anstieg der Aggregationsfähigkeit im Vergleich zu untransfizierten CHO-Zellen (Abb. 14). Die Expression von Ksp-Cadherin induzierte also in CHO-Zellen eine Zunahme der Aggregation, die vergleichbar ist mit der durch LI- oder E-Cadherin induzierten Zellaggregation in CHO-Zellen. Eine quantitative Aussage über Unterschiede der Adhäsionsstärke zwischen Ksp-, LI, und E-Cadherin wurde in diesen Assays nicht getroffen, da hierzu eine Standardisierung auf ein vergleichbares Expressionsniveau der jeweiligen Cadherine in den CHO-Zellen notwendig gewesen wäre. Das Aggregationsverhalten von Zellen, insbesondere die Adhäsionsstärke und die Spezifität der Interaktion, hängt stark vom Expressionsniveau der Cadherine ab (Duguay et al., 2003).

Die durch Ksp-Cadherin vermittelte Zellaggregation ist  $Ca^{2+}$ -abhängig. Bei  $Ca^{2+}$ -Entzug durch Zugabe des  $Ca^{2+}$ -Chelators EGTA fiel die Aggregationsfähigkeit der Cadherin-exprimierenden CHO-Zellen wieder auf das Grundniveau der untransfizierten CHO-Zellen zurück (Abb. 15A). Dies spricht dafür, daß die Grundaggregation der CHO-Zellen auf  $Ca^{2+}$ -unabhängige Zelladhäsionsmechanismen zurückzuführen ist, also nicht primär durch möglicherweise endogen exprimierte Cadherine vermittelt wird.

Die Aggregation Ksp-Cadherin-exprimierender CHO-Zellen konnte spezifisch durch Zugabe von Antikörpern, die gegen die ersten beiden Cadherindomänen (EC12) von Ksp-Cadherin gerichtet sind, inhibiert werden (Abb. 15B). Diese Antikörper hatten keinen negativen Effekt auf die durch

LI- oder E-Cadherin-vermittelte Zellaggregation. Eine indirekte Aggregationsvermittlung durch Ksp-Cadherin über sekundär hochregulierte Cadherine ist also unwahrscheinlich.

Die Inhibition dieser Aggregationsvermittlung durch Ksp-Cadherin-spezifische, polyklonale Antikörper kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann die Bindung von Antikörpermolekülen an den extrazellulären Bereich des Ksp-Cadherins zu einer Konformationsänderung dieses Bereichs führen, die eine spezifische Interaktion mit anderen Ksp-Cadherin-Molekülen nicht mehr ermöglicht. Zum anderen kann eine sterische Hinderung durch die bindenden Antikörper eine parallele und antiparallele Zusammenlagerung der Ksp-Cadherin-Ektodomänen verhindern. Dies könnte zu einer Schwächung der durch Ksp-Cadherin induzierten Zelladhäsion führen. Da die Antikörper gegen die Cadherin-Domänen 1 und 2 des Ksp-Cadherins gerichtet sind, ist eine Beteiligung dieser Domänen an der homotypischen Bindung naheliegend. Allerdings könnten die Antikörper aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen sterischen Hinderung durchaus auch andere Bereiche der Ksp-Cadherin-Ektodomäne negativ beeinflussen.

Unter der Annahme, daß Ksp-Cadherin eine – für Cadherine übliche – homotypische Interaktion eingeht, läßt sich Ksp-Cadherin nun auch funktionell den Cadherinen zuordnen. Ksp-Cadherin ist also in der Lage, spezifisch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zellaggregation zu vermitteln, offensichtlich ohne über  $\beta$ -Catenin mit dem Zytoskelett verankert zu sein. Ksp-Cadherin verhält sich diesbezüglich vergleichbar mit LI-Cadherin (Kreft et al., 1997). Dies legt den Schluß nahe, daß Ksp- und LI-Cadherin nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Gemeinsamkeiten aufweisen.

Auf die mögliche Rolle der Zelladhäsionsvermittlung von Ksp-Cadherin *in vivo* wird später eingegangen (4.4.1).

#### **4.2 Eigenschaften der homotypischen LI-Cadherin Interaktion**

LI-Cadherin vermittelt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zellaggregation. Dies wurde bereits in LI-Cadherin-transfizierten S2- (Berndorff et al., 1994), L- (Kreft et al., 1997) und nun auch in CHO-Zellen (die vorliegende Arbeit) nachgewiesen. Zudem scheint diese Fähigkeit unabhängig von einer zyttoplasmatischen Verankerung zu sein, wie mittels eines Fusionskonstrukts, bestehend aus der gesamten LI-Cadherin Ektodomäne fusioniert an einen GPI-Anker, gezeigt wurde (Kreft et al., 1997). Die Transfektion dieses Fusionsproteins in S2-Zellen zeigte keinen Unterschied in der Qualität der vermittelten Zellaggregation gegenüber S2-Zellen, die mit Wildtyp-LI-Cadherin transfiziert wurden. Die adhäsiven Eigenschaften des LI-Cadherins scheinen also hauptsächlich von seiner Ektodomäne bestimmt zu werden. Um die Eigenschaften der homotypischen LI-Cadherin-Interaktion auf Molekülebene zu charakterisieren, sollte also die Untersuchung der LI-Cadherin-Ektodomäne ausreichend sein, um allgemeingültige Aussagen über diese Interaktion treffen zu können.

Zu diesem Zweck wurde der komplette extrazelluläre Bereich des LI-Cadherins an den Fc-Teil des humanen IgG1 fusioniert, in CHO-Zellen exprimiert und aufgereinigt (s. 3.2.1). Die Fusion einer

Cadherin-Ektodomäne an einen Fc-Teil führt zur Dimerisierung der Proteine über Disulfidbrücken zwischen zwei Fc-Teilen (Abb. 19). Parallele Cadherin-Dimere (Cis-Dimere) gelten als funktionelle Einheit der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion, da sowohl die ersten beiden Cadherin-Domänen des E-Cadherins (Nagar et al., 1996) als auch die erste Cadherin-Domäne des N-Cadherins (Shapiro et al., 1995) in ihren Kristallstrukturen parallele Dimere aufweisen. Zudem konnten Takeda und Kollegen durch Quervernetzung von E-Cadherin-Molekülen auf der Oberfläche von L-Zellen das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Auftreten von E-Cadherin-Cis-Dimeren nachweisen (Takeda et al., 1999).

Cadherin-Fc-Konstrukte wurden bereits zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von E-Cadherin (Corps et al., 2001; Goodwin et al., 2003; Higgins et al., 1998), von N-Cadherin (Lambert et al., 2000), von VE-Cadherin (Baumgartner et al., 2000a) und von C-Cadherin (Chappuis-Flament et al., 2001) eingesetzt. Bisher wurden jedoch nur klassische Cadherine untersucht. Mit dem LI-Cadherin-Fc Fusionsprotein (LI-Fc) bestand nun die Möglichkeit, die Untersuchung des Cadherin-Bindungsverhaltens von klassischen Cadherinen auf die 7D-Cadherinfamilie auszudehnen.

#### **4.2.1 Bedeutung der unterschiedlichen Anzahl von Cadherin-Domänen**

Die Anzahl von Cadherin-Domänen im extrazellulären Anteil von Cadherinen variiert von 2 bis 34, wobei jedoch die meisten Cadherine, die extrazellulär ausschließlich Cadherin-Domänen besitzen, zwischen 5 und 7 Cadherin-Domänen aufweisen (Nollet et al., 2000). Funktionelle Analysen an sukzessiv deletierten Cadherin-Domänen eines Fc-Fusionsproteins mit der C-Cadherin-Ektodomäne zeigten, daß mindestens drei Cadherin-Domänen inklusive der Domäne EC1 notwendig sind, um eine homotypische Interaktion *in vitro* nachweisen zu können (Chappuis-Flament et al., 2001). In Verbindung mit dem Befund, daß Cadherin-Ektodomänen verschiedene, energetisch begünstigte Überlappungsgrade aufweisen (Sivasankar et al., 1999), ist eine Beteiligung aller Cadherin-Domänen an der homotypischen Interaktion und wohl auch die Verstärkung der Adhäsionsstärke durch eine Mehrzahl von Cadherin-Domänen wahrscheinlich. Da aber bislang nur klassische Cadherine biophysikalisch untersucht wurden, ist der tatsächliche Beitrag einer Vielzahl von Cadherin-Domänen nicht ausreichend analysiert.

Durch die Herstellung von Fc-Fusionsproteinen, die N-terminal die LI-Cadherin-Ektodomäne besitzen, konnte nun auch ein Vertreter der 7D-Cadherine bezüglich seiner Adhäsionseigenschaften untersucht werden. Die aufgereinigten Fusionsproteine LI-Fc und  $\Delta 23\text{LI-Fc}$  lagen nativ als Dimere vor und zeigten bezüglich der LI-Cadherin-Ektodomäne eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Sensitivität gegenüber Trypsin (Abb. 22), wie sie auch für andere Cadherine beschrieben wurde (Hyafil et al., 1981; Hyafil et al., 1980; Takeichi, 1990). In einem FACS-gestützten Aggregationsassay mit LI-Fc-beschichteten, fluoreszierenden Mikroperlen konnte die Funktionsfähigkeit hinsichtlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aggregationsvermittlung sowohl für LI-Fc als auch für  $\Delta 23\text{LI-Fc}$  nachgewiesen werden (Diplomarbeit von Anja Köhler (Köhler, 2003)).

Das LI-Fc-Konstrukt verhält sich also bezogen auf die Struktur der Ektodomäne und auf die zelladhäsive Funktion vergleichbar mit dem Wildtyp-LI-Cadherin. Eine Deletion der Cadherin-Domänen 2 und 3 (EC23), bei dem aus einem 7D-Cadherin ein – bezogen auf den extrazellulären Anteil – klassisches Cadherin mit fünf Cadherin-Domänen entstanden ist, scheint keinen negativen Einfluß auf die Adhäsionsvermittlung auszuüben. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen an C-Cadherin-Deletionsmutanten, die auch noch bei einer Anzahl von nur drei Cadherin-Domänen (EC1 und zwei beliebige Cadherin-Domänen des C-Cadherins) eine Interaktion zeigten (Chappuis-Flament et al., 2001).

Durch die Deletion von EC23 des LI-Cadherins wurde auch der Domänenübergang von EC2 nach EC3, der keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung aufweist (Zitt, 1997), entfernt. Aufgrund der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Strukturänderung von Cadherin-Ektodomänen (Pertz et al., 1999; Pokutta et al., 1994), könnte ein Fehlen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen zwischen Cadherin-Domänen eine größere Beweglichkeit in dieser Region zur Folge haben, so daß für LI-Cadherin das Domänenpaar EC12 gegenüber den restlichen Domänen (EC3 bis EC7) mehr Freiheitsgrade besitzen könnte. Die Analyse potentieller Unterschiede der Adhäsionseigenschaften von LI-Fc und  $\Delta$ 23LI-Fc mittels biophysikalischer Methoden wird erste Hinweise hierauf geben. In dieser Arbeit wurden jedoch zunächst die Bindungseigenschaften (Bindungsstärke, Lebensdauer,  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit) von LI-Fc definiert.

#### **4.2.2 Der Einfluß von Calciumionen auf die homotypische LI-Cadherin-Interaktion**

Calciumionen dienen als intrazellulärer Botenstoff (Carafoli, 1987), spielen aber auch eine wichtige Rolle für die Stabilität und Funktion zahlreicher extrazellulärer Proteine (Maurer et al., 1996). So ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit auch ein besonderes Merkmal der zelladhäsiven Funktion von Cadherinen (Ringwald et al., 1987).

Um zu überprüfen, in welcher Weise die homotypische LI-Cadherin-Bindung von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst wird, wurde das Bindungsverhalten des LI-Fc-Konstruktes im Rasterkraftmikroskop (Binnig and Quate, 1986) und mit der Laserpinzette (Svoboda and Block, 1994) bei unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen untersucht. Für die AFM-Experimente wurde LI-Fc über einen PEG-Linker (Hinterdorfer et al., 2000) an die abzutastende Oberfläche und an die Spitze des Hebelarms gekoppelt. Unter definierten Bedingungen wurde lediglich die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Meßpuffer variiert und die Bindungsaktivität von LI-Fc über die Auswertung von Kraft-Weg-Kurven bestimmt.

LI-Fc zeigte bis zu einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,5 mM keinen Anstieg der Bindungsaktivität. Zwischen 0,5 und 0,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  stieg jedoch die Bindungsaktivität rapide an, bis bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 2 mM eine Sättigung erreicht wurde (Abb. 23). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Bindungsaktivität war hochkooperativ mit einem Hill-Koeffizienten von etwa 12 bzw. einem Kooperationsindex von 1,5. Die apparente Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von  $\text{Ca}^{2+}$  für die gesamte LI-Cadherin-Ektodomäne errechnete sich auf 0,68 mM.

Zur parallelen Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit in Zellkulturexperimenten wurde LI-Fc gerichtet mittels Protein A an Mikroperlen gekoppelt und deren Bindungswahrscheinlichkeit auf LI-Cadherin-transfizierten CHO-Zellen (CHOmLI) mit Hilfe der Laserpinzette untersucht (Abb. 24). Auch hier stieg die Bindung der LI-Fc-beschichteten Mikroperlen an CHOmLI-Zellen zwischen einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,5 bis 1 mM stark an und erreichte dann ein Plateau. Der Hill-Koeffizient errechnete sich auf 14 und der Kooperationsindex auf 1,4. Die apparente  $K_D$  für  $\text{Ca}^{2+}$  betrug hier 0,64 mM. Bei der Bindung der LI-Fc-Mikroperlen auf CHOmLI-Zellen handelte es sich um eine spezifische Interaktion, da die gleichen Mikroperlen auf untransfizierten CHO-Zellen eine deutlich reduzierte Bindungswahrscheinlichkeit aufwiesen und VE-Fc-beschichtete Mikroperlen (Die Ektodomäne von VE-Cadherin fusioniert an den Fc-Teil des humanen IgG1; (Baumgartner et al., 2000a)) auf LI-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen eine ebenso reduzierte Interaktion zeigten. Zusätzlich ließ sich beobachten, daß LI-Fc-beschichtete Mikroperlen spezifisch zu einer Anreicherung von LI-Cadherin an den Kontaktbereichen zwischen Mikroperlen und CHOmLI-Zellen führten (Abb. 25).

Die Ergebnisse aus den Experimenten mit der Laserpinzette stimmen recht gut mit denen der AFM-Experimente überein. Eine weitere Bestätigung dieser Ergebnisse lieferten Untersuchungen von Domänenpaaren des LI-Cadherins mittels Gleichgewichtsdialyse und CD-Spektroskopie (Zitt, 1997). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der Cadherin-Domänenpaare EC12 und EC23 des LI-Cadherins wurden hierbei miteinander verglichen. Für das Domänenpaar EC12 konnte eine mittlere Bindung von 2,5  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 0,72 mM ermittelt werden. Das Domänenpaar EC23 wies bis zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 5 mM keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung auf. Dies deckt sich mit den Daten der CD-Spektroskopie, bei der nur das Domänenpaar EC12 eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Strukturänderung zeigte (Zitt, 1997). Die Spektren von EC23 waren mit oder ohne  $\text{Ca}^{2+}$  nahezu deckungsgleich. Dies läßt sich damit erklären, daß EC12 alle Cadherin-typischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsmotive besitzt, während EC23 über die Hälfte der konservierten sauren Aminosäurereste fehlen.

Die durchschnittlichen apparenten  $K_D$ -Werte von  $\text{Ca}^{2+}$  für das LI-Cadherin-Domänenpaar EC12 (0,72 mM; (Zitt, 1997)) und für die gesamte LI-Cadherin-Ektodomäne (0,68 mM im AFM bzw. 0,64 mM mit der Laserpinzette) sind vergleichbar. Hierin unterscheidet sich LI-Cadherin von E-Cadherin. Koch und Kollegen ermittelten für EC12 von E-Cadherin eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität mit einer durchschnittlichen  $K_D$  von 0,46 mM, wobei für die drei bindenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zwei identische Dissoziationskonstanten von 0,33 mM und eine von 2 mM gefunden wurden (Koch et al., 1997). Die durchschnittliche  $K_D$  der gesamten E-Cadherin-Ektodomäne für  $\text{Ca}^{2+}$  errechnete sich jedoch auf nur 0,03 mM (Koch et al., 1997), was für deutliche Unterschiede der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen spricht. Dies konnte durch Strukturanalysen des extrazellulären Anteils von E-Cadherin im Elektronenmikroskop bestätigt werden. E-Cadherin weist schon bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von über 50  $\mu\text{M}$  eine langgestreckte Struktur auf (Pertz et al., 1999). Eine laterale Dimerisierung (Cis-Dimer)

erfolgt allerdings erst bei Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf über  $500 \mu\text{M}$  und zur Ausbildung von antiparallelen Trans-Dimeren kommt es erst bei über  $1 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Die Cis-Dimerisierung allein scheint also nicht ausreichend für die Bildung von Trans-Dimeren zu sein, vielmehr muß auch eine hohe extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $> 1 \text{ mM}$ ) gewährleistet werden.

Die durchschnittliche Affinität von LI-Cadherin für  $\text{Ca}^{2+}$  ist gegenüber E-Cadherin etwa um den Faktor 20 geringer, jedoch hochkooperativ. Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung des EC12-Domänenpaares von E-Cadherin wurde ein Hill-Koeffizient zwischen 1,5 und 2,4 (Alattia et al., 1997) und für die gesamte Ektodomäne von etwa 1,6 (Pokutta et al., 1994) errechnet. Zwar zeigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung eine gewisse Kooperativität, jedoch liegt der Hill-Koeffizient für E-Cadherin deutlich unter dem der LI-Cadherin-Ektodomäne ( $n_H \approx 13$ ). Diese starke Kooperativität bei einer niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität deutet auf einen Regulationsmechanismus durch die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Sinne eines "Ein/Aus-Schalters" hin. Eine mögliche physiologische Beutung des unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einflusses auf LI- und E-Cadherin wird weiter unten im Hinblick auf die Koexpression beider Cadherine in Enterozyten des Darmes diskutiert (4.4.2).

Bislang wurde nur ein weiteres klassisches Cadherin hinsichtlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität detailliert untersucht. VE (Vascular Endothelial) -Cadherin wird in den Endothelzellen des Blutgefäßsystems exprimiert und mit dem Erhalt der Barrierefunktion in Verbindung gebracht (Drenckhahn, 1997; Lampugnani and Dejana, 1997). Baumgartner und Kollegen wiesen für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung der VE-Cadherin-Ektodomäne im AFM eine durchschnittliche Dissoziationskonstante von  $1,15 \text{ mM}$  bei einer hohen Kooperativität (Hill-Koeffizient von 5,04) nach (Baumgartner et al., 2000a). Die Dissoziationskonstante liegt im Bereich der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des Blutes und anderer Körperflüssigkeiten im adulten Organismus von  $1,2 \text{ mM}$  (Galyani, 1988). Die Autoren diskutierten, daß eine lokale Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Zelladhäsivität schwächen könnte und zu temporären Umgestaltungen des Epithelverbandes führen kann (Baumgartner et al., 2000a).

Zwar wird angenommen, daß die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Gleichgewicht mit der des Blutes steht (Galyani, 1988), jedoch ist es methodisch aufwendig lokal und/oder zeitlich begrenzte Änderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels *in vivo* aufzulösen. Warum sollten jedoch extrazelluläre Proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Eigenschaften aufweisen, wenn die freie extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration immer konstant gehalten wird?

Mittlerweile gibt es mehrere Hinweise, daß die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht konstant ist. So variiert z.B. die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Blut, in der Cerebrospinal-Flüssigkeit und auch in der Lunge während der Embryonalentwicklung von Vertebraten (Brown et al., 1995). Mit der Entdeckung eines spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Rezeptors (CaR,  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing Receptor) wurde erstmals ein Protein isoliert, welches *in vivo* durch geringe Änderungen der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration moduliert wird und somit die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  als extrazellulären Signalgeber nahelegt (Brown and MacLeod, 2001). Im weiteren Sinne stellen auch Cadherine  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifische Rezeptoren dar, indem



sie abhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine Strukturänderung vollziehen, dimerisieren und so auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signale in das Zytoplasma weiterleiten könnten.

Wie das Beispiel von LI-Cadherin zeigt, unterscheiden sich Cadherine bezüglich ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungseigenschaften. Der Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Cadherin-Struktur und -Funktion ist eng miteinander verknüpft, so daß sich potentiell über die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Adhäsionseigenschaften der Cadherine modulieren ließen. Allerdings gibt es bislang keine *in vivo* Untersuchungen hinsichtlich einer Regulation der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion durch die Veränderung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

#### **4.2.3 Parameter der homotypischen LI-Cadherin-Bindung**

Nach Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einflusses auf die LI-Cadherin-Interaktion, stellte sich die Frage nach den Bindungseigenschaften der LI-Cadherin-Ektodomäne bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Sättigung. Mittels AFM und einer von Baumgartner and Drenckhahn entwickelten Methode basierend auf der Affinitätschromatographie konnten diese untersucht werden (Baumgartner and Drenckhahn, 2002b).

Im AFM konnten Abrißkräfte von LI-Cadherin Trans-Interaktionen bei unterschiedlicher Abrißgeschwindigkeit ermittelt werden (Abb. 26). Die Abrißkräfte sind ein Maß für die Stärke der homotypischen LI-Cadherin-Interaktion. Nach Bell (Bell, 1978) besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Abrißkraft von sich trennenden Molekülbindungen und der von außen auf diese Bindung einwirkende Kraft (hier definiert durch die Abrißgeschwindigkeit). Somit ist die Abrißkraft nicht konstant sondern hängt von der Abrißgeschwindigkeit ab (Evans and Ritchie, 1997; Evans and Ritchie, 1999). Dieser Zusammenhang wurde bereits experimentell bestätigt (Merkel et al., 1999; Piper et al., 1998; Rief et al., 1997). Für die Trans-Interaktion von LI-Cadherin ergaben sich Abrißkräfte zwischen 27 pN und 51 pN bei Abrißgeschwindigkeiten von 150 nm/s bis 3000 nm/s (s. Tab. 1). Diese Werte liegen im Bereich der Abrißkräfte des VE-Cadherins. Für VE-Cadherin konnten Abrißkräfte von 35-55 pN bei Abrißgeschwindigkeiten von 200-4000 nm/s im AFM ermittelt werden (Baumgartner et al., 2000a). Mit einem Flußkammer-Assay basierend auf der Fließgeschwindigkeit von Mikroperlen auf einer Oberfläche, die beide mit dem Cadherin-Domänenpaar EC12 von E-Cadherin beschichtet waren, konnte die Kraft dieser homotypischen Domänen-Interaktion auf 2,4 pN bestimmt werden (Perret et al., 2002).

Im AFM zeigte LI-Cadherin verglichen mit dem klassischen Cadherin, VE-Cadherin, keinen auffallenden Unterschied bezüglich der Adhäsionsstärke. Allerdings wurde pro Kraft-Weg-Kurve immer nur jeweils das zuletzt auftretende Abrißereignis, also die noch einzig mögliche Interaktion bei maximalen Abstand von Trans-Dimeren der LI-Cadherine, ausgewertet. Über eine möglicherweise höhere Anzahl von Überlappungsgraden der Ektodomänen von LI-Cadherin gegenüber klassischen Cadherinen kann mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden.

Die Untersuchung von Ektodomänen des C-Cadherins in einem "Surface Force Apparatus" (SFA), bei der Kräfte zwischen Cadherin-tragenden Oberflächen gemessen werden, ergab für die Interaktion von C-Cadherin multiple Bindungsereignisse in Abhängigkeit ihres Abstandes zueinander (Leckband and Sivasankar, 2000; Sivasankar et al., 1999). Hierdurch könnte für die Cadherin-Interaktion eine zusätzliche Dynamik erreicht werden, um ein plötzliches Abreißen des Kontaktes auf Molekülebene und somit auch bezogen auf die gesamte Zell-Zell-Kontaktfläche zu verhindern.

Die Kräfte von Cadherin-Interaktionen sind relativ schwach verglichen mit den Kräften wie sie bei der Bindung von rekombinantem P-Selektin an seinen Liganden PSGL-1 (159 pN bei 2800 nm/s; (Fritz et al., 1998)) oder bei der Interaktion von Albumin-spezifischen Antikörpern mit Albumin auftreten (244 pN bei 200 nm/s; (Hinterdorfer et al., 1996)). Ein weiterer Hinweis für die schwache Cadherin-Interaktion ergibt sich aus der Bestimmung der Lebensdauer dieser Bindungen. Aus der Beziehung der Maximalkräfte zu den jeweiligen Abrißgeschwindigkeiten (Abb. 27) ergab sich für die homotypische Trans-Interaktion des LI-Cadherins eine durchschnittliche Lebensdauer von 1,4 s. Auch diese ist vergleichbar mit der für die Domänenpaare EC12 von E-Cadherin bestimmte Lebensdauer von 2 s (Perret et al., 2002) und der für die VE-Cadherin-Ektodomänen ermittelten Lebensdauer von 0,55 s (Baumgartner et al., 2000a).

Über eine LI-Fc beschichtete Säule konnte durch den Vergleich der Mobilität von löslichem LI-Fc in An- und Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (Abb. 28) die Dissoziationskonstante der homotypischen LI-Cadherin-Interaktion näherungsweise auf einen Wert zwischen 19 und 55  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Bislang wurden die Dissoziationskonstanten für die Ektodomäne von C-Cadherin (64  $\mu\text{M}$ ; (Chappuis-Flament et al., 2001)), von VE-Cadherin (80  $\mu\text{M}$ , (Baumgartner and Drenckhahn, 2002b)) und für das Cadherin-Domänenpaar EC12 von E-Cadherin (80  $\mu\text{M}$ , (Koch et al., 1997)) ermittelt. Verglichen mit den bislang untersuchten Cadherinen weist LI-Cadherin eine geringfügig affinere, homotypische Bindung auf. Ob dies eine physiologische Relevanz besitzt, möglicherweise aufgrund der zusätzlichen Cadherin-Domänen oder der fehlenden zytoplasmatischen Verankerung von LI-Cadherin, ist bislang jedoch unklar. Auch wenn die berechneten Dissoziationskonstanten wahrscheinlich nicht exakt den tatsächlichen Werten entsprechen, so spiegeln sie doch die extrem niederaffine Bindung zwischen Cadherinmolekülen wieder.

Wie lassen sich die relativ schwachen Interaktionen von Cadherin-Molekülen erklären? Im Gegensatz zu den hochaffinen Antikörper/Antigen-Wechselwirkungen werden an Cadherin-Bindungen andere physiologische Anforderungen gestellt. Die durch Cadherine vermittelten Zell-Zellkontakte müssen sich schnell auf- und abbauen lassen, damit dynamische Prozesse, wie die Zellmigration oder die Umstrukturierung der Zellmorphologie, ungehindert ablaufen können (Vasioukhin and Fuchs, 2001; Webb et al., 2002). Dies wird durch die schwachen Bindungskräfte, wie sie zwischen Cadherinen auftreten, begünstigt. Allerdings muß die Integrität der Zellkontakte

besonders in Epithelverbänden hinsichtlich der Barrierefunktion gewährleistet bleiben (Vlemminckx and Kemler, 1999).

Die schwache Interaktion von Cadherinen auf Einzelmolekülebene wird zum einen durch ihre Verankerung an das Zytoskelett und zum anderen durch ihre Konzentration in spezialisierten Membranbereichen, wie den *Zonulae adhaerentes* (adherens junction), auf der Zellebene verstärkt (Yap et al., 1997). So wird trotz einer niederaffinen Bindung mit kurzer Lebenszeit die lokale Cadherin-Konzentration stabilisiert und kumulative Bindungsereignisse vieler Cadherinmoleküle werden ermöglicht. Eine theoretische Bewertung solcher Interaktionen findet sich in Zhu (Zhu, 2000) und in Baumgartner und Drenckhahn (Baumgartner and Drenckhahn, 2002a). LI- und wohl auch Ksp-Cadherin sind nicht über  $\beta$ -Catenin mit dem Zytoskelett verknüpft und auch nicht in spezialisierten Zellkontakten konzentriert. Allerdings werden beide Cadherine jeweils mit E-Cadherin koexprimiert, was eine zu E-Cadherin komplementäre Funktion der 7D-Cadherine in hochprismatischen Epithelien nahelegt.

### **4.3 Die heterotypische Interaktion von LI- mit E-Cadherin**

LI- und E-Cadherin werden in den Enterozyten des Darmepithels koexprimiert (Angres et al., 2001; Boller et al., 1985). Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur (Gessner and Tauber, 2000), der zytoplasmatischen Verankerung (Kreft et al., 1997) und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität (s. 4.2.2).

In Kokultur-Experimenten und Aggregationsassays mit einer Mischung von CHOmLI- und CHOmE-Zellen, die unterschiedlich gefärbt waren, konnten gemeinsame, beide Cadherine enthaltende, Zellgrenzen bzw. Mischaggregate aus beiden Zelltypen beobachtet werden (Abb. 29). Im weiteren wurde ein heterotypisches Bindungsverhalten der LI-Cadherin-Ektodomäne an E-Cadherin-exprimierende CHO-Zellen mittels Laserpinzette nachgewiesen (Abb. 30A), welches mit einer Akkumulation von membranständigem E-Cadherin an den Kontaktbereichen zu den Mikroperlen, die mit LI-Fc beschichtet waren, verbunden war (Abb. 30B und 31). Die homotypische LI/LI- und die heterotypische LI/E-Cadherin-Interaktion induzierte ein Auswachsen von Plasmamembranbereichen der jeweiligen CHO-Zellen an den Kontaktstellen zu LI-Fc-Mikroperlen, wie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten (Abb. 32). Darüber hinaus reicherten sich auch  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin, über die E-Cadherin mit dem Zytoskelett verknüpft ist (Ozawa and Kemler, 1998b), an diesen Kontaktbereichen spezifisch an (Abb. 33).

Cadherine gelten als Zelladhäsionsmoleküle, die vorrangig eine homotypische Interaktion vermitteln. Diese Schlußfolgerung beruht auf Zellaggregationsexperimenten mit L-Zellen, die entweder E- oder P-Cadherin exprimierten, und nach ihrer Vermischung in einen auf horizontaler Rotation basierenden Assay distinkte, Cadherin-spezifische Aggregate ausbildeten (Nose et al., 1988). Diese Art von homotypischem Aggregationsverhalten wurde für mehrere klassische Cadherine beobachtet (Inuzuka et al., 1991; Miyatani et al., 1989; Munchberg et al., 1997). Cadherin-spezifische Sortierungsmechanismen wurden mit Migrationsprozessen von Zellen während der

Embryonalentwicklung und mit der Segregation von Zellpopulationen in Geweben in Zusammenhang gebracht (Takeichi, 1990; Takeichi, 1988).

Allerdings scheinen Cadherine nicht nur homotypische Interaktionen einzugehen. So zeigten Volk und Kollegen, daß E-Cadherin-exprimierende Leberzellen und N-Cadherin-exprimierende Zellen aus der Linse des Auges gemeinsame Zellkontakte ausbilden (Volk et al., 1987) und für L-Zellen, die sowohl R- als auch N-Cadherin exprimierten, konnte das Auftreten von Cis-Heterodimeren nachgewiesen werden (Shan et al., 2000). Auch CHO-Zellen, die entweder E-, N- oder C-Cadherin exprimierten, hafteten jeweils vergleichbar stark an immobilisierten Ektodomänen von E- bzw. C-Cadherin (Niessen and Gumbiner, 2002).

Dieser scheinbare Widerspruch in der Cadherin-Spezifität wurde schon recht früh auf Unterschiede im Expressionsniveau der untersuchten Cadherine zurückgeführt (Friedlander et al., 1989; Steinberg and Takeichi, 1994). Kürzlich konnten die experimentellen Bedingungen für die Segregation und Mischaggregation von Cadherinpaaren in transfizierten L-Zellen eingegrenzt werden (Duguay et al., 2003). Die Autoren zeigten, daß je nach Unterschieden in der Expressionstärke der untersuchten Cadherine in den L-Zellen und abhängig von den auftretenden Scherkräften in den Assays sowohl eine Koaggregation als auch ein Aussortieren der Zellen für die gleichen Cadherinpaare zu finden ist. Daraus zogen sie den Schluß, daß die beschriebene Segregation von Zellen, die verschiedene Cadherine exprimieren, aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl zur Verfügung stehender Cadherin-Bindungsstellen und weniger wegen der Spezifität der Cadherin-Interaktion zustande kommt.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Interaktion von LI- und E-Cadherin konnte nun auch eine heterotypische Bindung zwischen Mitgliedern verschiedener Cadherin-Familien in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden. Es scheint also so, als wären nicht nur klassische Cadherine untereinander zu heterotypischen Bindungen befähigt, sondern als würden Cadherine insgesamt ein breiteres Interaktionsspektrum aufweisen. Durch die heterotypischen Interaktionen von E-Cadherin mit  $\alpha\text{E}\beta 7$ -Integrin, welches in intraepithelialen Lymphozyten (IEL) exprimiert wird, (Cepek et al., 1994; Higgins et al., 1998) und durch die Beteiligung des FGF-Rezeptors (Fibroblast Growth Factor-) an dem durch N-Cadherin stimulierten Auswachsens von Neuronen (Williams et al., 2001), wird dies bestätigt.

Sehr interessant ist die Frage nach einer physiologischen Bedeutung dieser heterotypischen Interaktion von LI- und E-Cadherin. Zwar werden LI- und E-Cadherin in Enterozyten koexprimiert, jedoch ist der Großteil des E-Cadherins im adulten Organismus in spezialisierten Membrankontakten, den *Zonulae adhaerentes*, konzentriert, von denen LI-Cadherin ausgeschlossen ist (Berndorff et al., 1994; Boller et al., 1985). Allerdings ist auch ein geringerer Anteil des E-Cadherins eines Enterozyten entlang der basolateralen Membran lokalisiert und steht somit einer möglichen Interaktion mit LI-Cadherin zur Verfügung. Eine potentielle Bedeutung dieser

heterotypischen Interaktion während der Darmentwicklung und im adulten Organismus wird im folgenden diskutiert.

#### **4.4 Funktion der 7D-Cadherine in Epithelien**

Zwar besitzen die verschiedenen Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen unterschiedliche Aufgaben (Braga, 2002; Hynes, 1999), jedoch stellt sich die Frage, inwieweit sich die Funktionen innerhalb einer Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen unterscheiden? Erste Hinweise, daß nah verwandte Cadherine verschiedene Aufgaben in Zellen erfüllen können, erbrachten Vergleiche von diversen Zelllinien, die entweder E- oder N-Cadherin exprimierten. Während E-Cadherin mit dem Erhalt des Phänotyps von Epithelzellen in Verbindung gebracht und als Tumorsuppressor gehandelt wird (Behrens, 1999), scheint N-Cadherin einen gegensätzlichen Einfluß auf Zellen zu haben, da es promigratorisch wirkt und so die Invasivität von Zellen fördert (Hazan et al., 2000; Kim et al., 2000).

Für LI- und Ksp-Cadherin gibt es bislang keine funktionellen Daten, die über die Vermittlung der Zelladhäsion hinausgehen, jedoch weisen beide zusätzlich zu ihren strukturellen Merkmalen einige Gemeinsamkeiten auf, die möglicherweise auf ihre Funktion hindeuten. Interessanterweise wurden LI- und Ksp-Cadherin mit membranständigen Transportern in Zusammenhang gebracht. Das humane LI-Cadherin wurde von einer anderen Arbeitsgruppe als ein Protonen-abhängiger Peptidtransporter beschrieben (HPT-1, Human Peptide Transporter-1; (Dantzig et al., 1994)) und Ksp-Cadherin wurde auf der Suche nach einem  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Transporter isoliert (Thomson et al., 1995). Abgesehen davon und von dem Vorkommen verschiedener Peptidtransporter und 7D-Cadherinen in den gleichen Membranbereichen von Niere und Darm (Leibach and Ganapathy, 1996; Sweet et al., 2000), gibt es aber keine Hinweise, daß 7D-Cadherine an transmembranären Transportvorgängen beteiligt sind.

LI- und Ksp-Cadherin werden jeweils mit E-Cadherin koexprimiert, welches in den *Zonulae adhaerentes* konzentriert ist (Boller et al., 1985), während die 7D-Cadherine entlang der gesamten basolateralen Kontaktfläche lokalisiert sind (Berndorff et al., 1994; Thomson and Aronson, 1999; Thomson et al., 1995). LI-Cadherin wird in der Ratte in den Epithelzellen der Leber und des Darmes (Berndorff et al., 1994) und in der Maus spezifisch in den Enterozyten des Darmes exprimiert (Angres et al., 2001). Ksp-Cadherin wird ausschließlich in den Epithelien der Nierentubuli und des Sammelrohres exprimiert (Thomson and Aronson, 1999). Die 7D-Cadherine weisen also ein sehr spezifisches Expressionsmuster auf und sind in der basolateralen Membran von resorbierenden, hochprismatischen Epithelien zu finden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, vermittelt Ksp-Cadherin, vergleichbar mit LI-Cadherin, eine spezifische Zelladhäsion und scheint wie dieses und im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen, keine Verankerung über  $\beta$ -Catenin mit dem Zytoskelett zu besitzen. Diese Gemeinsamkeiten deuten auf eine vergleichbare Funktion von LI- und Ksp-Cadherin hin, die möglicherweise zu E-Cadherin komplementäre Eigenschaften aufweist.

#### **4.4.1 Die Rolle von Ksp-Cadherin in Epithelien der Nierentubuli**

Cadherine und die mit ihnen verbundenen Signalwege spielen bei der Nierenentwicklung eine entscheidende Rolle (Schedl and Hastie, 2000; Vainio and Uusitalo, 2000). So wurde die zeitlich und räumlich regulierte Expression von klassischen Cadherinen während der Nierenentwicklung, wie von E- (Vestweber et al., 1985), N- (Klein et al., 1988), R- (Goto et al., 1998), P- (Tassin et al., 1994) und von K-Cadherin (Xiang et al., 1994), bereits beschrieben (Cho et al., 1998).

Aufgrund des relativ zu den genannten klassischen Cadherinen späten Auftretens der Ksp-Cadherin-Expression, scheint seine Beteiligung bei einer frühen Phase der Nierenentwicklung unwahrscheinlich (Thomson and Aronson, 1999). Vielmehr könnte Ksp-Cadherin an der Aufrechterhaltung des Differenzierungsstatus der Epithelzellen beteiligt sein, da es in gleichbleibend hohen Konzentrationen entlang der gesamten basolateralen Kontaktbereiche der Epithelzellen von Nierentubuli exprimiert wird (Thomson and Aronson, 1999).

Überraschenderweise konnte während der murinen Embryonalentwicklung das transiente Auftreten von Ksp-Cadherin-Transkripten zwischen Tag 10,5 und 14,5 in der Lunge beobachtet werden (Wertz and Herrmann, 1999). Da dies aber kein Beweis für das tatsächliche Vorhandensein von funktionellem Ksp-Cadherin ist, bleibt seine Bedeutung für die Organogenese der Lunge fraglich.

Über eine mögliche Funktion von Ksp-Cadherin im ausdifferenzierten Gewebe im Hinblick auf die Koexpression mit E-Cadherin kann nur spekuliert werden, weil bis auf eine Vermittlung der Zelladhäsion (die vorliegende Arbeit) bislang keine funktionellen Daten für Ksp-Cadherin vorhanden sind. Da für LI-Cadherin detailliertere Ergebnisse vorliegen und angenommen wird, daß die 7D-Cadherine vergleichbare Aufgaben erfüllen, wird hier auf die weiter unten geführte Diskussion über die potentielle Funktion von LI-Cadherin verwiesen.

#### **4.4.2 Die Bedeutung von LI-Cadherin im intestinalen Epithel**

##### ***4.4.2.1 LI-Cadherin während der Darmentwicklung***

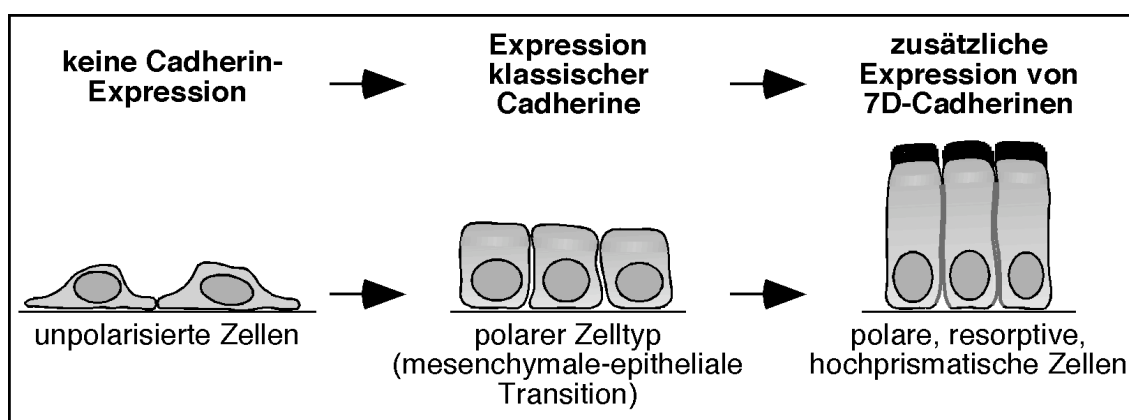
LI-Cadherin wird in Mensch und Maus entlang der gesamten gastrointestinalen Achse von *Duodenum* über *Jejunum*, *Ileum* bis hin zum *Colon descendens* in vergleichbarer Menge exprimiert (Angres et al., 2001; Zitt, 1997). Gleichsam wird murines LI-Cadherin auch in allen Epithelzelltypen entlang der Krypte-Villus-Achse exprimiert und sein relativ zu E-Cadherin spätes zeitliches Auftreten während der Embryonalentwicklung ab Tag 12,5 p.c. deutet nicht auf eine Beteiligung an frühen morphogenetischen Prozessen während der Darmentwicklung hin (Angres et al., 2001). Allerdings beginnt die LI-Cadherin-Expression kurz bevor sich das fötale Darmgewebe von einem undifferenzierten, vielschichtigen Epithel zu einem hochprismatischen, einschichtigen Epithel umlagert. Ob diese zeitliche Koinzidenz auch kausal zusammenhängt, ist jedoch noch nicht geklärt.

Hinsichtlich der Embryonalentwicklung und der Koexpression von LI- und E-Cadherin in Enterozyten ist die in dieser Arbeit nachgewiesene heterotypische Interaktion zwischen beiden

Cadherinen interessant. Während der Nierenentwicklung und der Entwicklung des zentralen Nervensystems treten distinkte und sich überlappende Expressionsmuster verschiedener Cadherine auf, die oftmals morphologischen Grenzen entsprechen (Cho et al., 1998; Redies, 2000; Takeichi, 1995). Vielleicht spielt die zeitlich versetzte Expression von LI- und E-Cadherin eine Rolle bei Differenzierungsvorgängen im sich entwickelnden Darm. Zusätzlich wird während der murinen Darmentwicklung R-Cadherin, ein weiteres klassisches Cadherin, exprimiert (Sjodin et al., 1995), was auf eine Vielzahl beteiligter Cadherine bei der Darmentwicklung hindeutet.

Eine Segmentierung von Körperachsen während der Embryonalentwicklung wurde detailliert im Modellorganismus der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) beobachtet und genauer untersucht (Macdonald and Struhl, 1986). Mechanismen der Genregulation, wie sie durch Transkriptionsfaktoren vermittelt werden, sind hierfür verantwortlich. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören auch die Homeobox-Gene, wie z.B. Caudal (Moreno and Morata, 1999). Die Caudal-verwandten Transkriptionsfaktoren, Cdx1 und Cdx2, wurden kürzlich hinsichtlich ihrer Expression und Bedeutung für die Darmentwicklung in der Maus untersucht (Silberg et al., 2000). Darüber hinaus zeigte sich, daß die ektopische Expression von Cdx2 in transgenen Mäusen zu einer gastrointestinalen Metaplasie führen kann. Interessanterweise reguliert Cdx2 auch die Expression von LI-Cadherin im Darmepithel (Hinoi et al., 2002).

Die Beobachtung, daß auch LI-Cadherin ektopisch bei der intestinalen Metaplasie des Magens exprimiert wird (Grötzinger et al., 2001), wurde in einer Microarray-gestützten Expressionsanalyse von etwa 5600 humanen Genen bei Magenkarzinomen bestätigt (Hippo et al., 2002). Diese ektopische Expression von LI-Cadherin bei morphologischen Veränderungen, wie sie bei der Magenmetaplasie auftreten, kann als eine Beteiligung LI-Cadherins an Differenzierungsvorgängen gedeutet werden, wie in Abb. 35 als hypothetisches Modell dargestellt.



**Abb. 35: Hypothese zur Cadherin-induzierten Zelldifferenzierung hochprismatischer Epithelien.** Durch die Expression von klassischen Cadherinen wird über die Ausbildung eines Adhäsionsgürtels (*Zonula adhaerens*) eine Polarisierung der Zelle induziert. Bei zusätzlicher Expression von 7D-Cadherinen, die entlang der basolateralen Membran lokalisiert sind, entsteht eine hochprismatische Epithelzelle.

Kürzlich wurde die LI-Cadherin-Expression in 102 Biopsaten des Adeno-Pankreaskarzinoms untersucht (Takamura et al., 2003). Hierbei konnte eine erhöhte LI-Cadherin-Expression mit einem steigenden Differenzierungsgrad des Karzinoms korreliert werden. Eine morphoregulatorische Rolle des LI-Cadherins läßt auch die Charakterisierung des LI-Cadherin-Orthologs aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*) vermuten, welches in Leber, Darm und embryonal auch in der Vorniere exprimiert ist, wo es entscheidend für deren Morphogenese ist (Horsfield et al., 2002).

#### **4.4.2.2 LI-Cadherin im adulten Organismus**

Eine potentielle Funktion von LI-Cadherin hinsichtlich der Koexpression von LI- und E-Cadherin in den Enterozyten des ausdifferenzierten Darmepithels könnte mit den besonderen Eigenheiten dieses Epithels zusammenhängen. Trotz seiner Barrierefunktion ist das Darmepithel ein hochdynamischer Zellverband (Gordon, 1989).

Das Epithel wird innerhalb von 3-5 Tagen ständig erneuert, wobei die Nachkommen von Stammzellen in den Krypten auf ihrem Weg zur Villusspitze ausdifferenzieren und in das Darmlumen abgegeben werden (Brittan and Wright, 2002; Potten and Loeffler, 1990). Die Epithelzellen sind also permanent Migrationsprozessen unterworfen, wobei aber die Barrierefunktion des Darmes aufrechterhalten werden muß. Es gibt zwei sehr interessante Arbeiten, welche die Funktion von klassischen Cadherinen im Darmepithel *in vivo* untersucht haben. Die Expression einer dominant-negativen N-Cadherin-Mutante, welcher der extrazelluläre Anteil fehlt und die ohne Zelladhäsion zu vermitteln mit E-Cadherin um eine zytoplasmatische Verankerung konkurriert, führte in Enterozyten zu einer Schwächung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, zu einer Steigerung der Migrationsrate und zu einem verfrühten Apoptose-Eintritt der Enterozyten (Hermiston and Gordon, 1995). Im Gegensatz hierzu hatte die Überexpression von E-Cadherin in den Enterozyten des Maudarmes eine verlangsamte Migrationsrate, eine geringere Proliferationsrate und die verfrühte Apoptose einiger Zellen bereits in den Krypten zur Folge (Hermiston et al., 1996). Ansonsten zeigten diese transgenen Mäuse keine Auffälligkeiten, so daß der Einfluß von E-Cadherin in ausdifferenzierten Enterozyten auf die Proliferation, Migration und auf die Lebensdauer der Enterozyten begrenzt scheint.

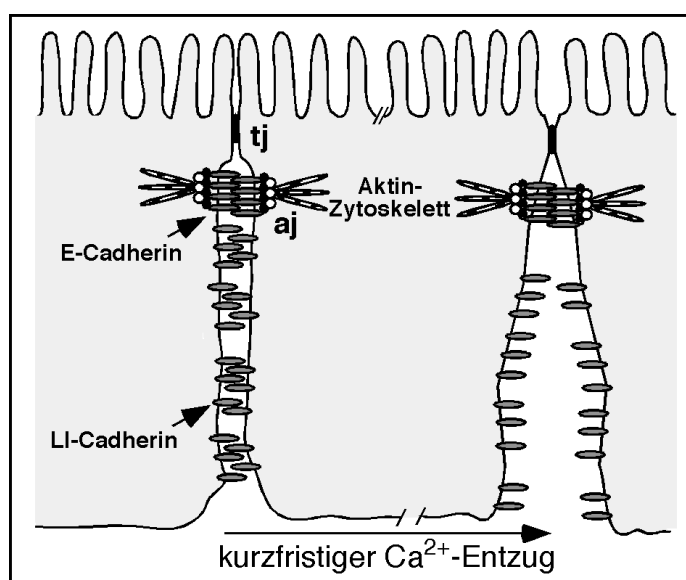
Für LI-Cadherin gibt es elektronenmikroskopische Beobachtungen des Darmepithels der Ratte, die einen Verlust des LI-Cadherins in den Bereichen der lateralen Spaltbildung, die durch hohe transepitheliale Flüssigkeitstransporte induziert wird, zeigen. Zusätzlich läßt sich LI-Cadherin auf der Zelloberfläche der Enterozyten bei der Einwanderung von intraepithelialen Lymphozyten nicht mehr nachweisen. Ob es sich in beiden Fällen um eine aktive oder lediglich passive Beteiligung von LI-Cadherin handelt, konnte bislang nicht geklärt werden.

Hinsichtlich der Koexpression von LI- und E-Cadherin in Enterozyten ist der in dieser Arbeit beschriebene unterschiedliche Einfluß von  $Ca^{2+}$  auf LI- gegenüber E-Cadherin interessant. Die



niedrigere Affinität aber extrem hohe Kooperativität für  $\text{Ca}^{2+}$  von LI- gegenüber E-Cadherin könnte eine physiologische Relevanz bezüglich einer oben beschriebenen Regulation der lateralen Spaltbildung, bei der Wasserrückresorption oder bei der basolateralen Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, wie z.B. Chylomikronen (Hussain, 2000), besitzen. Ein kurzes Absinken der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration könnte zum Lösen der LI-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion führen ohne die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion in den *Zonulae adhaerentes* zu beeinflussen (Abb. 36).

Sowohl über das Darmepithel als auch über das Epithel von Nierentubuli werden große Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  resorbiert (Locker, 1996; McCarron, 1989). Zusätzlich wurden für die Zellzwischenräume in beiden Epithelien große Schwankungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nachgewiesen (Mupanomunda et al., 1999; Mupanomunda et al., 2000), so daß eine extrazelluläre Regulation der Zelladhäsion über  $\text{Ca}^{2+}$  möglich scheint.



**Abb. 36: Mögliche physiologische Bedeutung der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation von LI- und E-Cadherin.** Ein kurzfristiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug könnte zum Lösen der LI-Cadherin-Interaktion führen ohne die E-Cadherin-Interaktion zu beeinflussen. So wäre eine dynamische Regulation des lateralen Zellzwischenraumes bei gleichzeitiger Integrität des Zellverbandes gewährleistet.

Klassische Cadherine können durch eine reversible Tyrosin-Phosphorylierung ihrer zytosomatischen Domäne hinsichtlich ihrer Verankerung mit dem Aktin-Zytoskelett reguliert werden (Sefton et al., 1992; Stappert and Kemler, 1994). Darüber hinaus wurde eine Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin mit der Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion in Verbindung gebracht (Behrens et al., 1993; Matsuyoshi et al., 1992). Für LI- und Ksp-Cadherin ist diese Art der Regulation unwahrscheinlich, da beiden die konservierten Tyrosin-Phosphorylierungsmotive fehlen und sie auch nicht direkt mit  $\beta$ -Catenin interagieren, wie es für klassische Cadherine beschrieben ist (Kemler, 1993). Somit wäre ein Erhalt der durch LI-Cadherin-vermittelten Zellkontakte bei physiologischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration möglich, auch wenn die E-Cadherin-Aktivität negativ reguliert

wird. Einen Hinweis hierfür liefert der oben beschriebene Befund, daß eine Inhibition der E-Cadherin-Funktion zwar zu einer Schwächung der Zell-Zell-Adhäsion und einer gesteigerten Migrationsrate führt, jedoch die Gewebeintegrität erhalten bleibt (Hermiston and Gordon, 1995).

LI-Cadherin stellt also neben klassischen und desmosomalen Cadherinen ein drittes  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Zelladhäsionssystem in Enterozyten dar, welches wohl flexiblere Zellkontakte ermöglicht als die Zytoskelett-verankerten Cadherine und auch anderen Regulationsmechanismen unterworfen zu sein scheint.

#### **4.5 Ausblick**

In dieser Arbeit konnte die Funktion von Ksp-Cadherin als Zell-Zelladhäsionsmolekül nachgewiesen und eine direkte Interaktion mit  $\beta$ -Catenin nahezu ausgeschlossen werden. Somit läßt sich Ksp-Cadherin nicht nur strukturell sondern auch funktionell den 7D-Cadherinen zuordnen. Für LI-Cadherin, den ersten Vertreter der 7D-Cadherine, wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der homotypischen Interaktion detailliert analysiert und die Bindungsstärke, Lebensdauer sowie Dissoziationskonstante der Interaktion von LI-Cadherin-Ektodomänen bestimmt. Weiterhin wurde in Zellkulturexperimenten eine heterotypische Interaktion von LI- mit E-Cadherin nachgewiesen.

In Zukunft gilt es, die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser Befunde durch weitere Zellkultur- und *in vivo*-Experimente zu beantworten. Ein ideales Testsystem wären "Transwell"-Kulturen von Caco-2-Zellen, an denen der Einfluß der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die Barrierefunktion des Epithelverbandes analysiert werden könnte, da diese epithelialen Zellen sowohl LI- als auch E-Cadherin endogen exprimieren. Zusätzlich wird die Untersuchung von LI-Cadherin-defizienten Mäusen, die bereits hergestellt wurden (laufende Promotionsarbeit von Frau Corinna Dietel), hinsichtlich der Morphologie und Physiologie des Darmepithels bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel bzw. erhöhter Wasseraufnahme weitere Hinweise liefern. Darüber hinaus könnten LI-Cadherin-defiziente Mäuse die Beteiligung des LI-Cadherins bei der Embryonalentwicklung aufklären helfen.

Hinsichtlich der heterotypischen Interaktion von LI- mit E-Cadherin ist ein Vergleich der Bindungsparameter der homotypischen (LI/LI und E/E) mit denen der heterotypischen Interaktion (LI/E) interessant und könnte Rückschlüsse auf die Struktur/Funktions-Beziehung von Cadherinen zulassen. Durch die Herstellung eines E-Cadherin-Fc-Konstruktes und dessen Analyse in Kombination mit dem LI-Fc-Konstrukt im AFM und mittels optischer Pinzette wäre dies möglich.

Die Bedeutung einer unterschiedlichen Anzahl von Cadherin-Domänen und die Rolle der fehlenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen zwischen EC2 und EC3 des LI-Cadherins bezüglich der Adhäsionsstärke und Spezifität kann durch vergleichende Analysen der in dieser Arbeit schon beschriebenen Deletionsmutante  $\Delta 23\text{LI-Fc}$  und LI-Fc mittels AFM und mit Hilfe der Laserpinzette auf CHOmLI- und CHOmE-Zellen aufgeklärt werden. In diese Untersuchungen können auch LI-Fc-Konstrukte, bei denen die innerhalb der 7D-Cadherine hochkonservierten Cysteine in der Cadherin-Domäne 4 (EC4) jeweils einzeln oder beide gegen Alanin-Reste ausgetauscht wurden, einbezogen werden, um deren potentiellen Anteil an der Adhäsionvermittlung zu untersuchen.

Die Charakterisierung von CHO-Zellen, welche die chimären Proteine EELI bzw. LILIE exprimieren, sollte Aufschluß über die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne für die Zell-Zelladhäsion geben. In engem Zusammenhang hiermit steht die Suche nach zytoplasmatischen Interaktionspartnern für LI- und Ksp-Cadherin. Dies erfolgt zum einen über das Hefe-2-Hybrid-System, zum anderen sollen die vorhandenen synthetischen Peptide der zytoplasmatischen Domänen von LI- und Ksp-Cadherin zur Affinitätschromatographie eingesetzt werden, um mögliche Bindungspartner von LI- und Ksp-Cadherin in Darm- bzw. Nierengewebe zu identifizieren.

Da alle in dieser Arbeit erstellten Cadherin-Expressionsvektoren auch zur Herstellung rekombinanter Adenoviren geeignet sind, werden zukünftig Adenoviren produziert, die LI-, Ksp- und E-Cadherin sowie die chimären LILIE und EELI überexprimieren. Hiermit kann ein möglicher Einfluß einer kombinatorischen Cadherin-Expression in verschiedenen Zellen und Geweben auf den Differenzierungsgrad ermittelt und der Beitrag von LI-Cadherin bei der gastrointestinalen Metaplasie charakterisiert werden.