

The role of cadherins in regulation of tension, signaling and barrier formation

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Matthias Rübsam

aus Kürten

Köln 2016

Berichterstatter: Prof.Dr.rer.nat. Carien M. Niessen
Prof.Dr.rer.nat. Mirka Uhlířova

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2017

Abstract

Epithelia form physical and functional boundaries between different compartments or with the external environment. Tight junctions (TJs) form paracellular ion and size dependent apical intercellular barriers crucial for epithelial boundaries. In simple epithelia, classical cadherins, Ca²⁺-dependent adhesion receptors that cluster into intercellular adherens junctions (AJ) control apico-basolateral polarity essential for TJ formation. The epidermis is a multilayered epithelium that protects terrestrial animals from dehydration and from external pathogenic, chemical or mechanical insults. Epidermal TJs are located in the most suprabasal viable layer, the stratum granulosum, where they actively contribute to epidermal barrier function. The mechanisms that restrict TJs to this layer are unknown. Previously, we have shown that the classic cadherin E-cadherin is required for TJ function in the epidermis. Recently, E-cadherin was found to form mechanosensitive junctions that respond to external force by recruitment of the mechanotransducer vinculin to strengthen its link to the actomyosin cytoskeleton. The overall aim of this thesis was to address how epidermal junctions and the cytoskeleton are organized at the tissue level and how E-cadherin restricts the formation of functional TJs to the granular layer. Using high-resolution whole-mount microscopy, it was shown that vinculin positive tension high AJs are only found in the granular layer where they are linked to a highly organized cortical F-actin to form an apico-lateral support network for the apical TJs. This polarized organization of junctions and F-actin across layers depends on E-cadherin. Loss of E-cadherin results in the absence of AJs, an increased cortical f-actin organization in lower layers and the premature formation of TJ-like spot structures at intercellular contacts in lower layers. In addition, the linear TJs in the barrier became discontinuous explaining how TJs become dysfunctional upon E-cadherin loss. Further analysis revealed that E-cadherin coordinates the recruitment and activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) to suprabasal junctions and its enrichment at TJs. Loss of E-cadherin induced premature reorganization of the EGFR that precedes depolarization of F-actin and the TJ protein ZO-1. Inhibition of EGFR activity rescued TER barrier function in E-cadherin^{-/-} keratinocytes, likely by reversing the decreased stability of TJ proteins at the cell surface. Further analysis in vitro using a combination of immunofluorescence analysis, traction and atomic force microscopy showed that E-cadherin regulates tension across cell-cell contact and the spatial distribution of adherens junctions whereas vinculin control actomyosin organization at AJs but not their distribution. In vivo loss of vinculin resulted in no obvious changes in either tissue or cell polarization of junctions and F-actin across the tissue or within the granular layer, respectively, and only a very mild epidermal barrier defect. In contrast, although MyosinIIa does not control junctional and cytoskeletal tissue polarization, it determines the linear morphology

of TJ in the granular layer. In conclusion, the data from this thesis show that E-cadherin-dependent control of suprabasal EGFR activity orchestrates the polarized, tissue-level organization of junctions, tension, and the cytoskeleton to promote *in vivo* epidermal barrier formation. The data suggest a model in which an AJ free contractile apical actin network is only formed in the barrier forming granular layer that is required to regulate TJ formation and local EGFR activity, perhaps explaining why EGFR inhibitors compromise skin barrier function in human cancer patients.

Zusammenfassung

Epithelien bilden physische und funktionelle Grenzen zwischen verschiedenen Organen, oder den Organen und der Außenwelt. Tight junctions (TJ) formen interzelluläre, apikale, ionen- und größenabhängige Barrieren, die essentiell für epitheliale Grenzen sind. In einschichtigen Epithelien, kontrollieren klassische Cadherine, Ca²⁺-abhängige Adhäsionsrezeptoren, die sich zu interzellulären Adherens Junctions (AJ) verbinden, die apiko-basolaterale Polarisierung der TJs, welches für deren Funktion unerlässlich ist. Die Epidermis hingegen ist ein vielschichtiges Epithel, das landlebende Tiere vor dem Austrocknen und vor äußerlichen, pathogenen, chemischen oder mechanischen Einflüssen schützt. Epidermale TJ werden in der obersten, lebenden Zellschicht, dem *Stratum Granulosum* (SG) gebildet, wo sie aktiv zu der epidermalen Barriere beitragen. Der Mechanismus, der die Ausbildung funktionaler TJ auf diese Schicht beschränkt, ist jedoch unbekannt. In vorangegangenen Studien haben wir gezeigt, dass das klassische Cadherin „E-cadherin“ für die Funktion von epidermalen TJ notwendig sind. Kürzlich stellte sich heraus, dass E-cadherin mechanosensitive Komplexe bildet, welche unter mechanischer Belastung den Mechanosensor „Vinculin“ rekrutieren und dadurch die Verbindung zum Zytoskelett verstärken. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, herauszufinden wie epidermale Zellverbindungen und deren Zytoskelett über die verschiedenen Schichten der Epidermis hinweg organisiert sind und wie E-cadherin die Ausbildung von funktionalen TJ auf das SG beschränkt. Unter Verwendung von hochauflösender 3D-Mikroskopie zeigte sich, dass Vinculin-positive, unter Spannung stehende AJ, speziell im SG gebildet werden, wo sie an ein hochorganisiertes Aktin-Zytoskelett gebunden sind und ein laterales Netzwerk ausbilden, welches die apikalen TJ unterstützt. Dieser polarisierte Aufbau der Zellverbindungen und dem Aktin-Zytoskelett über die verschiedenen Hautschichten hinweg, ist E-cadherin abhängig. Das Fehlen von E-cadherin führt zu einem Verlust der suprabasalen AJ und einer erhöhten Aktin Organisation, sowie einer verfrühten Ausbildung von TJ-artigen Strukturen in unteren Hautschichten. Zusätzlich zeigten die ansonsten linearen TJ im SG Unterbrechungen, was die gestörte Funktion der TJ nach dem Verlust von E-cadherin erklärt. Weitere Analysen zeigten, dass E-cadherin die Rekrutierung und Aktivierung des Epidermalen-

Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) in oberen Hautschichten, sowie an den TJ kontrolliert. Der Verlust von E-cadherin führte zu einer verfrühten Reorganisation des EGFR während der embryonalen Hautentwicklung, welches einer Depolarisierung von Aktin und dem TJ Protein „ZO-1“ vorausging. Die Inhibierung des EGFR *in vitro* rettete die defekte TJ Barriere in E-cadherin defizienten Keratinozyten. Durch die Verwendung einer Kombination aus Immunfluoreszenzanalysen, Traction- und Atomic-Force-Microscopy zeigte sich, dass E-cadherin interzelluläre Spannung sowie die räumliche Verteilung von AJ organisiert, während Vinculin zwar Aktin an den AJ reguliert, nicht aber deren Verteilung. *In vivo* hatte der Verlust von Vinculin keinen offensichtlichen Einfluss auf die Polarisierung von Zellverbindungen oder Aktin in der Epidermis oder des SG und nur einen kleinen auf die epidermale Barrierefunktion. Darüber hinaus zeigte sich, dass auch der Spannungsaufbau durch MyosinIIa nicht wie erwartet die Polarisierung von Zellverbindungen oder Aktin beeinflusst, jedoch die lineare Morphologie von TJ im SG reguliert. Zusammengefasst deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass die schichtübergreifende Polarisierung von Zellverbindungen, Spannung und dem Zytoskelett durch E-cadherin abhängige Regulierung von suprabasalen EGFR kontrolliert wird und dadurch die Barrierefunktion der Epidermis sichergestellt wird. Aus den Daten ergibt sich ein Modell in dem ein kontraktiles, kortikales, AJ freies Aktin-Netzwerk nur in Zellen des SG gebildet wird, welches notwendig ist für die Ausbildung von TJ und der Regulierung des EGFR. Dieser Mechanismus könnte erklären, warum EGFR Inhibitoren, welche in der Klinik für die Tumorbehandlung eingesetzt werden, die Hautfunktion der Patienten so stark beeinträchtigt.