

Regulation of intercellular junction formation and dynamics



Inaugural-Dissertation

Zur

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

vorgelegt von

Hanyin Zhang

aus Sichuan, China

angenommen im Jahr 2026

Abstract

Self-renewing epithelial tissues form essential physical and functional barriers that turnover while preserving barrier integrity. Cadherin-based AJ (adherens junction) and desmosomes couple intercellular adhesion to the actin and intermediate filament cytoskeletons, respectively, enabling epithelial tissues to withstand physical stress and drive cellular rearrangements. How these junctions coordinate their assembly and dynamic remodeling remains poorly understood. The overall aim of this thesis was to understand the biomechanical principles how cells coordinate intercellular junction formation and turnover, as well as responses to mechanical stress and address whether these principles differ in simple and stratifying epithelia, using MDCK cells and/or keratinocytes as models.

The first part of my thesis focused on understanding how AJ control the formation and disassembly of desmosomes, and whether and how differential junctional assembly and disassembly kinetics enable epithelial renewal while preserving tissue integrity. To this end, I combined knockout models, high end (live) imaging, ultrastructural analysis, optogenetics and force measurements, and found that AJ initiate cell-cell contact formation within minutes followed by desmosome assembly 5–10 minutes later. Loss of α -catenin linking AJ to the contractile actomyosin cytoskeleton prevented not only AJ but also desmosome assembly. Subsequent analysis found that keratinocytes are in a high tensile state inducing unfolding of α -catenin to recruit vinculin/ α -actinin necessary to resist the contractile actomyosin forces and enable desmosome assembly. In contrast, MDCK cells are in a low tension state requiring only α -catenin. Either increasing tension in MDCK cells or reducing tension in keratinocytes was sufficient to switch the molecular requirements for desmosome assembly, indicating that AJ need to sense and counteract the tensile actomyosin state of epithelia to permit desmosome formation. Consistently, lowering tension or artificial induction of cell-cell adhesion using optogenetics restored desmosome assembly in MDCK cells lacking α -catenin or classical cadherins. Thus, AJ adhesion sense and then counteract the contractile state of epithelia that enables prolonged membrane contacts necessary for the slower desmosome assembly kinetics. Acute optogenetic disassembly of AJ also revealed

that desmosomes persist to maintain intercellular cohesion in the absence of AJ, also suggesting differences in disassembly kinetics. Particle velocity analysis then revealed an increase in epithelial velocity and dynamics upon loss of desmosomes. Together, these findings support a mechanical–kinetic model in which rapid AJ assembly and disassembly enable epithelial rearrangements, while slower desmosome kinetics preserves tissue cohesion.

In the second part of this thesis, I investigated how supracellular junctional and cytoskeletal responses to mechanical stress are coordinated. I focused on atypical protein kinase C λ (aPKC λ) as a central regulator that through interaction with the autophagy receptor p62 (SQSTM1) links AJ mechanotransduction to Bag3-dependent selective autophagy (CASA). Mechanical stretching experiments revealed that loss of aPKC λ accelerates force-dependent actin reorientation, junctional re-organization, and promotes nuclear deformation. In addition, inhibition of autophagy reduced stress fiber reorganization, implicating autophagic turnover in mechanical stress responses. Proteomic analyses further identified interactions between aPKC λ , p62/SQSTM1, and Bag3 in junctional protein levels, supporting a role for CASA in maintaining junctional proteostasis to allow adaptive remodeling of mechanically stressed junctional networks.

Together, this thesis establishes a conceptual framework in which differential junctional assembly and disassembly kinetics coordinate epithelial remodeling and turnover while preserving tissue cohesion, and in which junctional mechanics and dynamics are tightly integrated with proteostasis pathways to maintain epithelial integrity under stress. These findings provide new insight into how epithelial barriers remain functional during morphogenesis, homeostasis, and repair, and offer a mechanistic basis for understanding how junctional dysfunction leads to barrier failure in disease.

Zusammenfassung

Selbsterneuernde epitheliale Gewebe bilden essenzielle physische und funktionelle Barrieren, die sich kontinuierlich erneuern und dabei ihre Barriereintegrität bewahren. Cadherin-basierte AJ und Desmosomen koppeln die Zell-Zell-Adhäsion an das Aktin- bzw. Intermediärfilament-Zytoskelett und ermöglichen es epithelialen Geweben, mechanischen Belastungen standzuhalten und zelluläre Umlagerungen zu steuern. Wie diese Junctions ihre Assemblierung und dynamische Remodellierung koordinieren, ist bislang unzureichend verstanden. Ziel dieser Arbeit war es, die biomechanischen Prinzipien zu untersuchen, durch die Zellen die Bildung, den Umsatz und die mechanische Anpassung interzellulärer Junctions koordinieren, und zu klären, ob sich diese Prinzipien zwischen einfachen und mehrschichtigen Epithelien unterscheiden. Hierfür wurden MDCK-Zellen und Keratinozyten als Modellsysteme verwendet.

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Frage, wie AJ die Bildung und Disassemblierung von Desmosomen kontrollieren und inwiefern unterschiedliche Assemblierungs- und Disassemblierungskinetiken epitheliale Erneuerung bei gleichzeitiger Gewebekohäsion ermöglichen. Durch die Kombination von Knockout-Modellen, hochauflösender (Live-)Mikroskopie, ultrastruktureller Analyse, Optogenetik und Kraftmessungen konnte gezeigt werden, dass AJ innerhalb weniger Minuten die Zell-Zell-Kontaktbildung initiieren, gefolgt von einer verzögerten Desmosomenassemblierung nach etwa 5–10 Minuten. Der Verlust von α -Catenin, das AJ mit dem kontraktilen Aktomyosin-Zytoskelett verbindet, verhinderte sowohl die AJ- als auch die Desmosomenbildung. Weitere Analysen zeigten, dass Keratinozyten einem hohen Tensilzustand unterliegen, der eine mechanosensitive Entfaltung von α -Catenin erfordert, um Vinculin und α -Aktinin zu rekrutieren und so der Aktomyosin-Kontraktilität entgegenzuwirken. Im Gegensatz dazu befinden sich MDCK-Zellen in einem Niedrigspannungszustand, in dem α -Catenin allein ausreichend ist. Eine Erhöhung der Spannung in MDCK-Zellen oder eine Reduktion der Spannung in Keratinozyten genügte, um die molekularen Anforderungen an die Desmosomenassemblierung umzuschalten. Entsprechend konnten eine Spannungsreduktion

oder die optogenetische Induktion von Zell-Zell-Adhäsion die Desmosomenbildung auch in MDCK-Zellen ohne α -Catenin oder klassische Cadherine wiederherstellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass AJ den kontraktile Zustand des Epithels erfassen und aktiv ausgleichen müssen, um ausreichend stabile Membrankontakte für die langsamere Desmosomenassemblierung zu ermöglichen. Die akute optogenetische Disassemblierung von AJ zeigte zudem, dass Desmosomen auch in Abwesenheit von AJ vorübergehend bestehen bleiben und die interzelluläre Kohäsion aufrechterhalten. Partikelgeschwindigkeitsanalysen ergaben schließlich eine erhöhte epitheliale Dynamik nach Verlust von Desmosomen. Zusammen stützen diese Befunde ein mechanisch-kinetisches Modell, in dem schnelle AJ-Dynamiken epitheliale Umlagerungen ermöglichen, während langsamere Desmosomenkinetiken die Gewebekohäsion sichern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, wie supraselluläre junctionale und zytoskelettale Antworten auf mechanischen Stress koordiniert werden. Dabei wurde die atypische Protein-Kinase $C\lambda$ (aPKC λ) als zentraler Regulator identifiziert, der über den Autophagie-Rezeptor p62/SQSTM1 die AJ-abhängige Mechanotransduktion mit Bag3-abhängiger selektiver Autophagie (CASA) verknüpft. Mechanische Dehnungsexperimente zeigten, dass der Verlust von aPKC λ die kraftabhängige Aktinreorientierung, junctionale Umorganisation und Kernverformung beschleunigt. Zudem führte die Hemmung der Autophagie zu einer reduzierten Reorganisation von Stressfasern, was auf eine wichtige Rolle des autophagischen Umsatzes bei mechanischen Stressantworten hinweist. Proteomische Analysen identifizierten darüber hinaus Interaktionen zwischen aPKC λ , p62/SQSTM1 und Bag3 in junctionalen Proteinfractionen und unterstützen eine Rolle von CASA bei der Aufrechterhaltung der junctionalen Proteostase unter mechanischer Belastung. Zusammenfassend etabliert diese Arbeit ein konzeptionelles Modell, in dem unterschiedliche Kinetiken der Junction-Assemblierung und -Disassemblierung epitheliales Remodeling und Erneuerung bei gleichzeitiger Gewebekohäsion koordinieren und junctionale Mechanik eng mit proteostatischen Signalwegen verknüpft ist, um die Integrität epithelialer Barrieren unter Stress zu erhalten. Diese Ergebnisse liefern neue Einblicke in die

Funktionsweise epithelialer Barrieren während Morphogenese, Homöostase und Reparatur und bieten eine mechanistische Grundlage zum Verständnis junctionaler Dysfunktionen bei Erkrankungen.