

Abstract

Epithelia form physical and functional barriers between compartments and/or with the outside world and are exposed to a range of forces, including e.g. stretch, compression, shear and impact. These forces are not only sensed but also transduced into the cell by specialized cell-matrix and intercellular adhesive junctions, such as adherens junctions and desmosomes. The adherens junction protein α -catenin plays a central role in linking adhesion to the force generating actomyosin cytoskeleton, and through force-dependent conformational changes controls actomyosin organisation and cortical tension. However, how much force is perceived by α -catenin and whether different domains within α -catenin bear similar or different force regimes is not known.

The central aim of this thesis was to generate different molecular Förster Resonance Energy Transfer (FRET) tension sensors for α -catenin and ultimately ask whether and how much mechanical force α -catenin is bearing and address whether different conformations and domains of α -catenin sense similar or different force regimes. To this end, different 4 tension sensors that together allow to detect forces between 1-11 pN were inserted at two different regions of α -catenin to potentially examine whether actin binding and/or force-dependent α -catenin unfolding and reorganisation of actomyosin would be differentially be sensed within α -catenin. Using these sensors, I then established Fluorescent life time imaging (FLIM) on MDCK- α -cat^{-/-} cells transfected with these sensors and their controls. Inhibition of actomyosin contractility or F-actin polymerization showed that these tension sensors sense force-dependent differences, albeit to a variable extent, and that α -catenin potentially can bear forces up till 8 pN. Unfortunately, the initial truncated FRET-non-tension control sensors showed higher FRET efficiencies than the α -catenin sensors, likely due to their different conformation and inability to properly initiate cell-cell contacts. This prompted the generation of other FRET tension sensor control mutants more similar to the α -catenin sensors, which behaved as proper controls. Using different other mutants, the role of intermolecular FRET is currently analysed.

The cadherin/catenin complex is also a key determinant of the formation of other junctions, such as desmosomes. Initial data from the Niessen laboratory suggested a key role for α -catenin in this process. A second aim was to address how α -catenin controls desmosome formation in simple (MDCK) versus stratified epithelial cells (keratinocytes), and whether this requires different tension states of α -catenin. Transfecting α -cat^{-/-} MDCKs or α -cat-knockdown keratinocytes with different α -catenin mutants showed that MDCK cells require only the F-actin binding domain (FABD) of α -catenin to initiate desmosome assembly, whereas in keratinocytes FABD is necessary but not sufficient and, in addition, requires the M domain, which upon force can unfold to interact with vinculin.

In conclusion, the results from this thesis suggest that we successfully established tension sensors for α -catenin and that α -catenin in MDCKs is under tension, albeit to variable extent. In addition, α -catenin is essential for desmosome formation, which depends on F-actin binding and, depending on the cell type, on the tension-sensitive M-domain, suggesting different force requirements in different tissues.

Zusammenfassung

Epithelien trennen durch physikalische und funktionale Barrieren Organen von der Außenwelt. Sie sind dabei einer Reihe mechanischer Einflüsse ausgesetzt wie z.B. Dehnungs-, Scher-, und Stoßkräften. Diese Kräfte werden von den einzelnen Zellen nicht nur wahrgenommen, sondern auch als Signal in die Zelle weitergegeben. Dies geschieht durch spezialisierte, adhäsive Zell-Matrix und Zell-Zell Kontakte wie Adherens-Verbindungen und Desmosomen. Als Bestandteil der Adherens-Verbindungen spielt α -catenin dabei eine zentrale Rolle, indem es externe, adhäsive Kräfte an das kontraktile Actomyosin-Skelett der Zelle koppelt. Über durch Zugkräfte induzierte Veränderung der α -catenin Proteinstruktur werden dabei das Actomyosin-Skelett und dessen Spannung im Zellkortex reguliert. Wieviel Kraft dabei auf α -catenin wirkt und welche Kräfte nötig sind um einzelne funktionale Domänen von α -catenin zu aktivieren ist nicht bekannt.

Das Ziel dieser Thesis ist es, verschiedene Förster Resonance Energy Transfer (FRET) basierte, molekulare Spannungssensoren zu entwickeln, um die genauen Kräfte zu bestimmen die auf α -catenin und dessen Domänen wirken. Hierfür wurden vier verschiedene Spannungssensor-Module in zwei verschiedenen Domänen von α -catenin platziert, welche einen Spannungsbereich von 1-11pN abdecken. Über diese zwei Positionen soll es möglich sein zu bestimmen ob durch Actomyosin generierte Kräfte domänenspezifisch Wirken um zu einer spezifischen Entfaltung und Aktivierung von α -catenin zu führen. Die generierten α -catenin-Sensoren, samt den entsprechenden Kontrollen, wurden von mir zunächst in α -catenin negative MDCK-Zellen transfiziert um fluorescent life time imaging (FLIM) zu etablieren. Über Inhibierung von Actomyosin generierter Spannung konnte ich zeigen, dass die Sensoren unterschiedliche Spannungen nachweisen können und das α -catenin wahrscheinlich Spannungen von bis zu 11pN ausgesetzt ist. Unerwartet zeigten gekürzte α -catenin Sensorkontrollen, die keine Spannung aufnehmen können, höhere FRET Effizienzen als die Spannungssensoren, was möglicherweise durch eine positionsabhängige Konformationsänderung des Sensormoduls oder die Unfähigkeit dieser Sensorkontrollen Zellverbindungen zu initiieren erklärt werden kann. Daraufhin haben wir neue, ungekürzte Sensorkontrollen generiert, in denen die α -catenin vermittelte Initiierung von Zell-Zellkontakten nicht eingeschränkt ist. Darüber hinaus wird mit Hilfe verschiedener weiterer Mutanten im Moment der Einfluss von Intermolekularem FRET untersucht.

Der Cadherin-Catenin Komplex ist über seine Funktion als Spannungssensor auch für die Bildung weiterer Zell-Zell Kontakte unerlässlich. Daten aus dem Niessen Labor deuten dabei auch eine Schlüsselrolle für α -catenin hin. Ein weiteres Ziel dieser Thesis war daher zu untersuchen wie α -catenin die Bildung von Desmosomen in simplen (MDCK) gegenüber stratifizierten Epithelien reguliert und ob hierfür verschiedene Spannungszustände von α -catenin eine Rolle spielen. Über eine Transfektion von α -catenin negativen MDCK Zellen oder α -catenin knock-down Keratinozyten mit α -catenin Mutanten konnten wir zeigen, dass die α -catenin F-actin Bindedomäne als Kopplung an das Actomyosin Skelett zwar in MDCK Zellen aber nicht in Keratinozyten ausreicht um Desmosomen zu bilden. In Keratinozyten wird zusätzlich die M-Domäne benötigt, die sich unter Spannung entfaltet um Vinculin zu rekrutieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Thesis, dass wir erfolgreich α -catenin Spannungssensoren generiert haben die zeigen, dass α -catenin in MDCK Zellen unter Spannung steht, wenn auch in variierendem Ausmaß. Darüber hinaus ist

α -catenin notwendig für die Bildung von Desmosomen. Dies wird abhängig vom Zelltyp im mindesten über die einfache Kopplung von α -catenin an Actin reguliert. In manchen Zellen kann eine zusätzliche Regulierung über die Spannungssensitive M-Domäne in α -catenin notwendig sein. Diese Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit verschiedener Spannungszustände in unterschiedlichen Geweben.