

Aus dem Institut für Molekulare Medizin der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktorin: Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Hatzfeld)

Sektion Pathobiochemie

(Leiterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Hatzfeld)

**Die Phosphorylierung von Plakophilin3 durch die p70-S6-Kinase
und ihr Einfluss auf Funktion und Lokalisation**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Marius-Claudius Möllmer,

geboren am 01. Oktober 1989 in Torgau

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Mechthild Hatzfeld
2. Prof. Dr. rer. nat. Guido Posern
3. Prof. Dr. med. Volker Spindler, München

08.11.2016

08.06.2017

Referat

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine Interaktion zwischen Plakophilin3 und der p70-S6-Kinase stattfindet und mögliche Auswirkungen auf die Funktion von Plakophilin3 zu untersuchen. Eine Interaktion wurde *in vitro* und in der Zelle nachgewiesen. Mittels Mutagenese bzw. Phosphomimic-Mutanten und unphosphorylierbaren Mutanten wurden drei putative Serin-Motive in der Plakophilin3 Sequenz untersucht. Diese Motive sind in Säugetieren konserviert. Die Phosphorylierung des 2. sowie 3. Motives führten zur zytoplasmatischen Lokalisation von PKP3 mit verminderter Desmosomenausbildung, was Zellzwischenräume hervorrief. Die Phosphorylierung dieser Motive führte auch zur Proliferationssteigerung, womöglich über zytoplasmatische Funktionen von Plakophilin3 z.B. bei der Translation. Die Phosphorylierung im 1. Motiv zeigte in den verwendeten Zelllinien HeLa und MCF-7 keinen Einfluss auf die Lokalisation oder Funktion von Plakophilin3. Ein Einfluss auf die Organisation der Aktinfilamente wurde bei keinem der untersuchten Motive beobachtet.

Die Bestätigung von Plakophilin3 als Zielprotein der p70-S6-Kinase zeigt, wie die vielfältigen Funktionen von Plakophilin3 bei der Zell-Zelladhäsion, Migration und Proliferation reguliert werden können. Die Plakophilin3/p70-S6K-Interaktion ist besonders im Kontext der Wundheilung relevant, bei der die p70-S6-Kinase durch Wachstumsfaktoren und den PI3K/mTOR-Signalweg aktiviert wird. Plakophilin3 wird in nahezu allen Epithelien exprimiert und zeigt widersprüchliche Assoziationen mit Karzinomerkrankungen. Eine mögliche Erklärung ist die Regulation der Funktion von Plakophilin3 durch die p70-S6-Kinase, die in Tumoren häufig hochreguliert ist.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Zell-Zelladhäsion	1
1.2 Armadillo-repeat-Proteinfamilie	2
1.2.1 p120-Subfamilie	3
1.2.2 Plakophilin-Subfamilie	4
1.3 Funktionen der Plakophiline bei der Zell-Zelladhäsion	5
1.3.1 Bildung und Abbau von Desmosomen	5
1.3.2 Plakophilin1	7
1.3.3 Plakophilin2	8
1.3.4 Plakophilin3	9
1.4 Zytoplasmatische Funktionen der Plakophiline	10
1.5 Proliferationsstimulation und nukleäre Funktionen der Plakophiline	11
1.6 Regulation der subzellulären Lokalisation der Plakophiline	12
2 Zielstellung	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Molekularbiologische Methoden	14
3.1.1 PCR-Mutagenese	14
3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	15
3.1.3 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen	15
3.1.4 Transformation von E. coli	15
3.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	15
3.1.6 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	16
3.1.7 Ligation	17
3.2 Zellbiologisches Arbeiten	17
3.2.1 Kultivierung von Zelllinien	17
3.2.2 Transfektion von Plasmid-DNA mittels Calciumphosphat-Methode	18
3.2.3 Immunfluoreszenz	19
3.2.4 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	20
3.2.5 Zellproliferationstest mittels BrdU-Einbau	20
3.3 Proteinbiologisches Arbeiten	21
3.3.1 Expression von GST- und His6 -Fusionsproteinen	21
3.3.2 GST-pull-down	21

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
3.3.4 Western-Blot.....	22
3.3.5 Immundetektion.....	23
3.3.6 Statistische Auswertung.....	23
3.4 Material.....	23
3.4.1 Fluoreszenzfarbstoffe.....	23
3.4.2 Bakterienstämme und Zelllinien.....	24
3.4.3 Enzyme.....	24
4 Ergebnisse.....	25
4.1 Interaktion von PKP3 mit der p70-S6-Kinase.....	25
4.1.1 In vitro-Interaktion von PKP3 mit der p70-S6-Kinase.....	25
4.1.2 Interaktion von PKP3 mit der p70-S6-Kinase im zellulären Kontext.....	28
4.2 Einfluss der Phosphorylierung auf die Lokalisation von PKP3.....	32
4.2.1 Aktinfilamente in HeLa-Zellen nach Transfektion der PKP3-Mutanten.....	36
4.2.2 Lokalisation von DSP und den PKP3-Mutanten in HeLa-Zellen.....	36
4.2.3 Lokalisation von DSP und den PKP3-Mutanten in MCF-7-Zellen.....	40
4.2.4 Aktinfilamente in MCF-7-Zellen nach Transfektion der PKP3-Mutanten.....	47
4.3 Einfluss der Phosphorylierung auf zytoplasmatische Funktionen von PKP3.....	47
5 Diskussion.....	49
5.1 Die Rolle von PKP3 bei der Zell-Zelladhäsion.....	49
5.1.1 Regulation der Lokalisation von PKP3.....	50
5.1.2 Regulation der Funktionen in Desmosomen.....	52
5.2 Zytoplasmatische Funktionen von PKP3.....	54
5.2.1 Regulation zytoplasmatischer Funktionen.....	54
5.3 Aktivierung der p70-S6-Kinase in vivo.....	57
5.4 Die PKP3/p70-S6-Kinase-Interaktion im physiologischen Kontext.....	59
5.5 Regulation von PKP3 durch die p70-S6-Kinase in Tumoren.....	60
6 Zusammenfassung.....	62
7 Literaturverzeichnis.....	64
8 Thesen.....	75
9 Anhang.....	76

Abkürzungsverzeichnis

5'UTR	5' untranslatierte Region
A	Alanin
ARM	<i>Armadillo</i>
ARVC	arrhythmogene rechtsventrikuläre Cardiomyopathie
ARVCF	<i>armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial-syndrome</i>
AS	Aminosäure
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
ca.	<i>circa</i>
C-TAK-1	Cdc25C-associated protein kinase 1
C/EBP-Familie	CCAAT/enhancer-binding-protein
Cdc25C	Cell division cycle 25C
CoREST	<i>Co-RE1-silencing transcription factor</i>
CrPV	Cricket paralysis-Virus
da	dominant aktiv
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dn	dominant negativ
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
DSP	Desmoplakin
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDSF-Syndrom	<i>ectodermal dysplasia/skin fragility-Syndrom</i>
EDTA	<i>ethylen-diamin-tetra-actetic acid</i>
eEF2	eukaryotischer Elongationsfaktor 2
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
eYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>

FXR-1	<i>fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</i>
G3BP	<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLIS2	<i>GLI (glioblastoma) - Similar 2</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HCV	Hepatitis C-Virus
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
KD	<i>knockdown</i>
KGF/FGF7	<i>keratinocyte growth factor / fibroblast growth factor 7</i>
KO	<i>knockout</i>
LEF/TCF	<i>lymphoid enhancer-binding factor / transcription factor</i>
μ-	<i>mikro-</i>
MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MT-Puffer	Mikrotubuli stabilisierender Puffer
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF-κB	<i>nuclear faktor κB</i>
NPRAP	<i>neural plakophilin related armadillo protein, Neurojungin, δ-catenin</i>
p70-S6K	p70-S6-Kinase
PABPC-1	<i>polyadenylate-binding protein 1</i>
PBSE	<i>phosphate buffered saline with EDTA</i>
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PG	Plakoglobin, γ-Catenin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKCα	Protein Kinase C Isoform α
PKP	Plakophilin
PRL3	<i>phosphatase of regeneratig liver 3</i>
rpS6	<i>ribosomal protein S6</i>
R	Arginin
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S	Serin
SDS-PAGE	<i>sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>

SG	<i>stress granules</i>
TBST	TRIS-buffered Saline and Tween-20
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	Tuberöse-Sklerose-Komplex
UPF-1	<i>regulator of nonsense transcripts</i>
wt	Wildtyp
ZEB1	<i>zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>
ZO-1	<i>zonula occludens 1</i>

1 Einleitung

1.1 Zell-Zelladhäsion

Die Zell-Zelladhäsion ist eine Grundlage für die Organisation von Gewebestrukturen in mehrzelligen Organismen. Zell-Zellkontakte verknüpfen die Zellen untereinander und vermitteln durch ihre Verknüpfung mit dem Zytoskelett die Form der einzelnen Zelle sowie die Widerstandsfähigkeit des gesamten Zellverbandes bzw. Gewebes. Trotz ihrer mechanischen Stabilität sind Zell-Zellkontakte dynamische und streng regulierte Strukturen. Die Notwendigkeit engmaschiger Kontrollmechanismen der Zell-Zelladhäsion wird zum einen angesichts der komplexen Differenzierungsprozesse mehrschichtiger Epithelien, die mit der Reifung von Zell-Zellkontakten einhergeht, deutlich. Zum anderen müssen Zell-Zellkontakte bei der embryonalen Entwicklung, im Kontext der Wundheilung und bei immunologischen Prozessen die Balance zwischen Flexibilität und Stabilität des Zellverbundes gewährleisten. Die Zell-Zelladhäsion ist von großer klinischer Relevanz, wie an hyperproliferativ-entzündlichen oder bullösen Hauterkrankungen deutlich wird. Das Herauslösen maligner Zellen aus dem Zellverbund des Primärtumors geschieht infolge einer beeinträchtigten Zell-Zelladhäsion und ist von wesentlichem Interesse bei der Metastasierung und dem infiltrativem Wachstum maligner Tumoren.

Adherens junctions und Desmosomen sind zwei Zell-Zellkontakttypen, die mechanische Stabilität vermitteln und sich in ihrem Aufbau aus Cadherinen und Cateninen ähneln. Cadherine sind Transmembranproteine, die den Extrazellularraum zwischen zwei Zellen durch die Bildung überwiegend homophiler, Ca^{2+} -abhängiger Verbindungen überbrücken. Sie bilden neben den Integrinen, Selektinen und Immunglobulinen eine Gruppe von Zell-Zelladhäsionsmolekülen. Die klassischen Cadherine kommen in *adherens junctions* vor und werden nach ihrem Vorkommen in verschiedenen Geweben eingeteilt. Wichtige Vertreter dieser Familie sind das epitheliale (E-), plazentale (P-) und neuronale (N-) Cadherin (Ringwald *et al.*, 1987; Nose *et al.*, 1987; Hatta *et al.*, 1988). Desmosomen verfügen über die desmosomalen Cadherine Desmoglein 1-4 und Desmocollin 1-3, die differenzierungs- und zelltypabhängig exprimiert werden. Eine Übersicht über ihre spezifische Expression bei der Differenzierung mehrschichtiger Epithelien gibt eine Arbeit von Garrod und Chidgey (Garrod und Chidgey, 2007). Catenine binden an die intrazelluläre Domäne der Cadherine und koordinieren so den Aufbau dieser Zell-Zellkontakte und regulieren ihre Dynamik. In *adherens junctions* vermitteln sie die Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett. In Desmosomen stellt Desmoplakin aus der Plakinfamilie die Verknüpfung zwischen dem Cadherin/Catenin-Komplex und den Intermediärfilamenten her (Schwarz *et al.*, 1990). Zu den Intermediärfilamenten zählen unter anderem die Keratine und Desmine.

Die Identifikation von Bestandteilen der Zell-Zellkontakte ist bislang wesentlich weiter fortgeschritten als das Verständnis ihrer Regulation bzw. eines detaillierten Mechanismus ihrer Bildung aus diesen Bestandteilen. Da die Catenine ein Bindeglied zwischen Cadherinen und dem Zytoskelett darstellen und darüber hinaus auch Funktionen im Zytoplasma ausüben, sind sie von großem Interesse für das

Verständnis der Zell-Zelladhäsionsregulation. Der Großteil der Catenine gehört der *Armadillo-repeat*-Proteinfamilie an, auf die deshalb im folgenden eingegangen wird.

1.2 *Armadillo-repeat*-Proteinfamilie

Die Mitglieder der *Armadillo-repeat*-Proteinfamilie verfügen über eine zentrale Domäne, die durch Wiederholungen des ca. 42 Aminosäuren langen *Armadillo*-Motives gekennzeichnet ist. Dieses Motiv wurde erstmals im namensgebenden Segmentpolaritätsgen *Armadillo* in *Drosophila melanogaster* gefunden. *Armadillo* ist homolog zu β -catenin in Säugetieren (Wieschaus und Riggelman, 1987; Riggelman *et al.*, 1989; Pfeifer *et al.*, 1994).

Die Strukturaufklärung zeigt, dass ein *Armadillo*-Motiv aus drei α -Helices besteht, in denen hydrophobe Aminosäurenreste Interaktionen zwischen den Helices zweier benachbarter *Armadillo-repeats* vermitteln. So entsteht eine rechtsdrehende Superhelix mit positiver Oberflächenladung, über die viele Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden (Huber *et al.*, 1997; Choi und Weis, 2005). Die Möglichkeit der *Armadillo-repeat*-Domäne zur spezifischen, modularisierten Peptid-Protein-Bindung wird bei der Generierung sogenannter *designed Armadillo-repeat-Proteine* als Alternative zur Immunglobulin-vermittelten Markierung von Zielproteinen diskutiert (Reichen *et al.*, 2013 und 2014; Hansen *et al.*, 2016). Nach den Strukturaufklärungen weiterer *Armadillo-repeat*-Proteine zeigte sich, dass diese oftmals eine vergleichbare Struktur aufweisen, die jedoch nicht zwingend mit einer hohen Sequenzhomologie einhergeht (Conti *et al.*, 1998; Otomo *et al.*, 2005; Kidd 3rd *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Striegl *et al.*, 2010). *Armadillo-repeat*-Proteine kommen in jedem eukaryotischen Reich vor und erfüllen verschiedenste Funktionen z.B. als photo- und thermosensible Proteine. Eine Übersicht findet sich bei Coates (Amador *et al.*, 2001; Coates, 2003; Bujalowski *et al.*, 2014).

Die Catenine aus der *Armadillo-repeat*-Proteinfamilie werden anhand von Sequenzhomologien, verschiedenen Funktionen und nach der Organisation ihrer *Armadillo-repeat*-Domäne unterteilt (Abbildung 1). Zwei bedeutende Untergruppen sind die klassischen Catenine und die p120^{cat}-verwandten Catenine. Zu den klassischen Cateninen zählen β -Catenin und Plakoglobin (γ -Catenin), die über 12 zentrale *Armadillo-repeats* verfügen. Die p120^{cat}-verwandten Catenine umfassen die p120-Subfamilie mit p120^{cat}, p0071 Neurojungin/ δ -catenin/NPRAP (*neural plakophilin related armadillo protein*), ARVCF (*armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial-syndrome*) (Reynolds *et al.*, 1996; Hatzfeld und Nachtsheim, 1996; Sirotkin *et al.*, 1997; Paffenholz und Franke, 1997) und die Plakophilin-Subfamilie mit Plakophilin1 bis 3 (PKP1-3, Hatzfeld *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Bonn e *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999).

Die p120^{cat}-verwandten Catenine verfügen über 9 zentrale *Armadillo-repeats*, die innerhalb dieser Untergruppe ähnlich organisiert sind. Für den Bereich zwischen dem fünften und sechsten *Armadillo-repeat* wurde zuerst ein weiterer *Armadillo-repeat* vorhergesagt. Die Strukturaufklärung zeigte jedoch sowohl für PKP1 als auch p120^{cat} ein Insert, das eine sichelförmige Gesamtstruktur verursacht (Choi und Weis, 2005; Ishiyama *et al.*, 2010). Aufgrund der starken Konservierung der interagierenden

Aminosäurenreste innerhalb der p120^{ctn}-verwandten Catenine wird nach strukturbasierten Vergleich eine ähnliche Gesamtstruktur der anderen Vertreter angenommen (Anastasiadis und Reynolds, 2000; Choi und Weis, 2005; Hatzfeld, 2006). Die klassischen Catenine zeigen demgegenüber eine lineare Gesamtstruktur (Stokes, 2007; Huber *et al.*, 1997). Eine Unterscheidung der p120-Subfamilie und der Plakophilin-Subfamilie wird anhand von Sequenzhomologien und ihren Funktionen in verschiedenen Typen von Zell-Zell-Kontakten getroffen, die mit unterschiedlichen bevorzugten Interaktionspartnern und subzellulären Lokalisationen einhergehen.

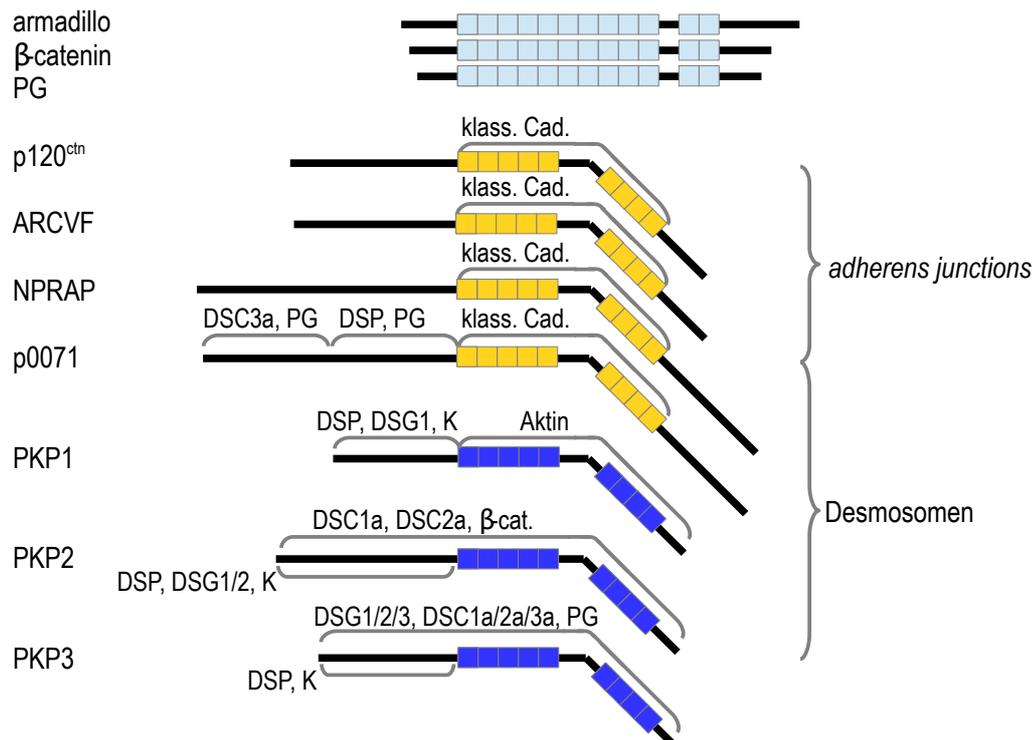


Abbildung 1: Organisation der Proteindomänen in klassischen und p120^{ctn}-verwandten Cateninen mit bekannten Interaktionspartnern. klass. Cad.: klassische Cadherine, K: Keratin, β -cat.: β -catenin (modifiziert nach Hatzfeld, 2005, 2006).

1.2.1 p120-Subfamilie

Die Vertreter der p120-Subfamilie interagieren bevorzugt mit klassischen Cadherinen in *adherens junctions*, wobei für eine Interaktion die *Armadillo-repeat*-Domäne essentiell ist (Lu *et al.*, 1999; Kaufmann *et al.*, 2000; Hatzfeld *et al.*, 2003). Neben der Funktion in der Zell-Zelladhäsion, die mit einer membranständigen Lokalisation einhergeht, zeigen die Vertreter der p120-Subfamilie auch eine zytoplasmatische bzw. nukleäre Lokalisation.

Ähnlich wie das klassische β -Catenin, welches im Wnt-Signalweg über die Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie die Expression von proliferations- und apoptose-assoziierten Proteinen reguliert, so beeinflusst die Lokalisation der p120-Subfamilie die Regulation verschiedener Signalwege.

p120^{ctn} und p0071 regulieren die Rekrutierung der klassischen Cadherine an die Zellmembran und stabilisieren diese an *adherens junctions* (Ireton *et al.*, 2002; Hatzfeld *et al.*, 2003). p120^{ctn}, der

Namensgeber der Subfamilie, wurde ursprünglich als Src-Substrat identifiziert (Reynolds *et al.*, 1994). Seitdem wurden zahlreiche Interaktionspartner identifiziert, die auf die komplexe Funktion von p120^{ctn} in verschiedenen subzellulären Kompartimenten hindeuten. Einen Überblick geben Arbeiten von Hatzfeld, Anastasiadis und Reynolds (Hatzfeld, 2005, 2006; Hatzfeld *et al.*, 2014; Anastasiadis und Reynolds, 2000). Zu diesen Interaktionspartnern zählen die Transkriptionsfaktoren Kaiso, CoREST und GLIS2 (Daniel und Reynolds, 1999; Hosking *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014). p0071 und p120^{ctn} nehmen innerhalb der p120-Subfamilie bezüglich der Interaktionspartner eine Sonderrolle ein, da sie sowohl mit desmosomalen als auch klassischen Cadherinen interagieren und somit die Dynamik von *adherens junctions* und auch von Desmosomen koordinieren können (Hatzfeld *et al.*, 2003; Calkins *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2004).

Für NPRAP und ARVCF werden teilweise redundante Funktion bei der Zell-Zelladhäsion angenommen, da sie nach Überexpression in p120^{ctn}-KD-Zellen den Verlust von E-Cadherin an der Zellmembran partiell ausgleichen können (Davis *et al.*, 2003). Durch die nukleäre Lokalisation von NPRAP beeinflusst es die Expression verschiedener Tumor-assoziiertes Proteine (Koutras *et al.*, 2011). ARVCF lokalisiert ebenfalls im Zellkern und reguliert das Splicen von mRNA (Mariner *et al.*, 2000; Rappe *et al.*, 2014).

Eine weitere Gemeinsamkeit innerhalb der p120-Subfamilie ist die Fähigkeit, die Aktivität der kleinen GTPasen RhoA und Rac1 zu regulieren und so die Organisation der Aktinfilamente zu steuern (Anastasiadis *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2006; Abu-Elneel *et al.*, 2008).

1.2.2 Plakophilin-Subfamilie

Die Plakophiline 1 bis 3 kommen in desmosomalen Zell-Zellkontakten vor und interagieren über ihre Kopf-Domäne mit Desmoplakin (DSP), Plakoglobin (PG), Desmocollinen (DSC) und Desmogleinen (DSG) (Hatzfeld *et al.*, 1994; Heid *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Bonn  *et al.*, 1999; Kowalczyk *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999; Hatzfeld *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Bonn  *et al.*, 2003). Die Plakophiline können *in vitro* an Intermediärfilamente binden (Kapprell *et al.*, 1988; Smith und Fuchs, 1998; Hatzfeld *et al.*, 2000; Bonn  *et al.*, 2003). Die physiologische Relevanz dieser Interaktion bleibt allerdings offen, denn die Plakophiline lokalisieren *in vivo* im äußeren desmosomalen Plaque, während die Intermediärfilamente im inneren desmosomalen Plaque verankert sind. Die Verknüpfung von innerem und äußerem desmosomalen Plaque wird durch Desmoplakin hergestellt. Die Plakophiline haben entsprechend ihrer positiven Oberflächenladung einen isoelektrischen Punkt im basischen Bereich (IEP: 9,3 – 10,1) (Schmidt und Jäger, 2005). Die Plakophilingene *PKP1-3* liegen auf unterschiedlichen Chromosomen (1q32; 12p11 bzw. 11p15) und lassen aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie sowie ähnlichen Intron/Exon-Grenzen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung vermuten (Schmidt und Jäger, 2005; Hatzfeld *et al.*, 2014). Die zentrale *Armadillo-repeat*-Domäne weist innerhalb der Plakophiline Sequenzhomologien bis zu 70% auf. Die weitestgehend unstrukturierten Kopf- und C-terminalen Domänen weisen kaum Ähnlichkeiten auf. Das bildet womöglich die Grundlage der teils redundanten, teils

exklusiven Funktion.

Eine weitere Gemeinsamkeit der Plakophiline ist ihre duale Lokalisation im Zytoplasma und an der Zellmembran, wobei PKP1 und 2 auch im Zellkern lokalisieren (Schmidt *et al.*, 1997, 1999; Mertens *et al.*, 1996; Bonn  *et al.*, 1999). Neben ihrer Rolle bei der Zell-Zelladhäsion verfügen die Plakophiline auch über Funktionen, die an ihre zytoplasmatische bzw. nukleäre Lokalisation geknüpft sind. Plakophiline haben Einfluss auf die Translation und Proliferation und sind mit Signalwegen assoziiert (Mertens *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2010; Hatzfeld *et al.*, 2014).

Wolf und Hatzfeld (2010) stellten ein Modell vor, bei dem die Lokalisation der Plakophiline eine Schlüsselrolle bei der Regulation ihrer Funktion einnimmt. In Übereinstimmung dazu wurden neben desmosomalen Interaktionspartnern auch direkte zytoplasmatische Interaktionspartner identifiziert, auf die in den folgenden Abschnitten eingegangen wird.

1.3 Funktionen der Plakophiline bei der Zell-Zelladhäsion

1.3.1 Bildung und Abbau von Desmosomen

Da Plakophiline hauptsächlich in Desmosomen vorkommen, wird dieser Zell-Zellkontakt im folgenden kurz charakterisiert. Einen Überblick über die molekulare Struktur von Desmosomen zeigt Abbildung 2. Für Schemata und elektronenmikroskopische Bilder sei auf Arbeiten von Garrod, Hatzfeld und Al-Amoudi verwiesen (Garrod *et al.*, 2005; Hatzfeld, 2006; Al-Amoudi und Frangakis, 2008; Al-Amoudi *et al.*, 2011).

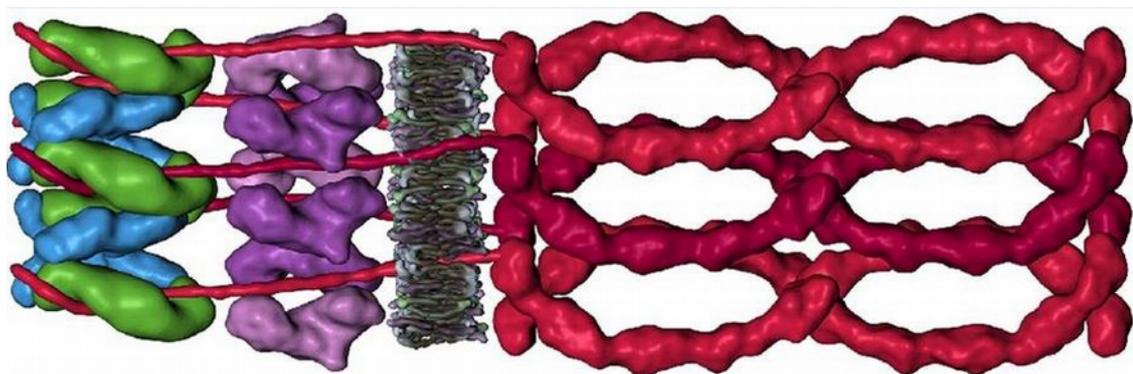


Abbildung 2: Molekulare Struktur von Desmosomen. Darstellung ist zusammengefügt aus elektronenmikroskopischen Bildern bzw. Strukturaufklärungen (PG grün, DSP blau, PKP violett, DSG und DSC in hellrot bzw. dunkelrot; Abbildung aus Al-Amoudi *et al.*, 2011).

Ein bedeutender Unterschied zwischen *adherens junctions* und Desmosomen ist die Fähigkeit letzterer zur Hyperadhäsion d.h. die Bildung Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zellkontakte (Garrod *et al.*, 1996). Hyperadhäsion ist eine wichtige Eigenschaft ausdifferenzierter Keratinozyten. Im Verlauf der Wundheilung können Desmosomen jedoch wieder Ca^{2+} -abhängig werden. Dieser Vorgang wird durch die Protein Kinase C Isoform α (PKC α) reguliert, die im Zuge der Aktivierung vermehrt membrangebundenen und weniger zytoplasmatischen lokalisiert (Wallis *et al.*, 2000). Als Ursache der Hyperadhäsion werden cis-

Interaktionen der desmosomalen Cadherine angenommen, die mit einer semi-kristallinen Struktur einhergehen (Garrod *et al.*, 2005; Tariq *et al.*, 2015). Es wird vermutet, dass die desmosomalen Adapterproteine diese strenge Organisation der Cadherine regulieren (Garrod *et al.*, 2005). Eine Desmoplakin-Mutante, die am Serin 2849 nicht durch PKC α phosphoryliert werden kann, begünstigt die Entstehung hyperadhäsiver Desmosomen. Das bekräftigt obige Annahme (Hobbs und Green, 2012; Hobbs *et al.*, 2013).

Die Aktivität der PKC α wird vielfältig moduliert. PKP2 begünstigt als Gerüstprotein die Phosphorylierung von DSP (Bass-Zubek *et al.*, 2008). Die Inhibierung erfolgt unter anderem durch Bindung an einen RACK1-Keratin 5/14-Komplex, woraus ein Zytoplasma-Arrest von PKC α resultiert, der die Phosphorylierung von DSP begrenzt (Kröger *et al.*, 2013). Die im Zuge der Wundheilung exprimierten Keratine 6 und 17 begünstigen die Aktivität der PKC α durch ihre Rekrutierung an die Zellmembran (Patel *et al.*, 2006; Loschke *et al.*, 2016).

Die AG Hatzfeld zeigte die Ko-lokalisierung von PKC α und PKP3. Der *knockdown* von PKP3 in Mauskeratinozyten begünstigte die Ausbildung hyperadhäsiver Desmosomen, wohingegen die PKP3-Überexpression die Hyperadhäsion beeinträchtigte. Nach Inhibition der PKC α konnte der hemmende Effekt von PKP3 auf die Hyperadhäsion nicht mehr beobachtet werden. PKP3 übt womöglich eine PKC α -rekrutierende Funktion aus (Keil *et al.*, 2016).

Laut PhosphoNet-Vorhersage kommt PKP3 auch als Substrat der PKC α in Frage (<http://www.phosphonet.ca/kinasepredictor.aspx?uni=Q9Y446&ps=S134/S280/S313/S314>). Bislang wurde kein Einfluss der aktivierten PKC α auf die Phosphorylierung von PKP3 S285 bzw. eine subzelluläre Translokation von PKP3 gefunden (Roberts *et al.*, 2013). Das schließt eine Kinase-Substrat-Beziehung zwischen PKC α und PKP3 an einer anderen Phosphorylierungsstelle aber nicht aus.

Zur korrekten Bildung von Desmosomen werden Bestandteile der *adherens junctions* wie α -Catenin, E-Cadherin und PG benötigt, weshalb eine Vorläuferfunktion für die *adherens junctions* bzw. ihre Komponenten angenommen wird (Lewis *et al.*, 1997; Green *et al.*, 2010). Lösliche zytoplasmatische Vorstufen von DSG2 und DSC2 werden in ihren jeweiligen Mikrotubuli-assoziierten Vesikeln an die Zellmembran transportiert und initiieren dort die Desmosomenbildung (Nekrasova *et al.*, 2011). Desmoplakin und Plakoglobin sind essentiell am Aufbau des desmosomalen Plaques beteiligt, der durch PKP1 weiter strukturiert wird. Dies geschieht womöglich durch laterale Verknüpfung und die Bindung von 2 DSP-Molekülen an ein PKP1-Molekül (Green und Simpson, 2007). Die Bildung von Zell-Zellkontakten kann *in vitro* durch erhöhte extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration (Ca²⁺-Switch) ausgelöst werden, wodurch zeitliche und räumliche Aspekte der Desmosomenbildung beobachtet werden konnten, die sich in drei Phasen einteilen lassen (Godsel *et al.*, 2005, 2010):

Phase I: ca. 5 min nach dem Ca²⁺-Switch reichert sich DSP an der Zellmembran an, zeitgleich mit desmosomalen Cadherinen und E-Cadherin.

Phase II: Nach 15-20 min bilden sich zytoplasmatische DSP/PKP2-Komplexe in Zellmembrannähe (Bass-Zubek *et al.*, 2008). Diese Komplexe werden als Desmosomenvorläufer interpretiert und sind mit Intermediärfilamenten assoziiert.

Phase III: Nach ca. 1 h werden diese Komplexe an die Zellmembran transportiert. Für die DSP-Rekrutierung in Phase III ist die Expression von PKP3 sowie intakte Aktinfilamente, nicht jedoch Mikrotubuli notwendig (Todorovic *et al.*, 2014).

Für den Abbau von Desmosomen wurden zwei unterschiedliche Mechanismen beobachtet. Nach dem Entfernen von extrazellulärem Ca^{2+} durch den Chelator EGTA oder EDTA werden *in vitro* die Verbindungen der desmosomalen Cadherine gelöst und die entstehenden Desmosomenhälften in das Zytoplasma transportiert (Mattey und Garrod, 1986). Dieser Abbaumechanismus wurde auch *in vivo* bei *Pemphigus vulgaris* beobachtet (Wang *et al.*, 2009). Demgegenüber wurde bei der Wundheilung von Epithelien die Aufnahme des kompletten Desmosoms in das Zytoplasma von Zellen des Wundrandes beobachtet (Garrod *et al.*, 2005).

Im Zuge des Desmosomenabbaus ist der Rücktransport von PKP3 im Unterschied zu PG auf intakte Mikrotubuli angewiesen, was als Hinweis auf eine separate Regulation gedeutet wurde (Raychaudhuri *et al.*, 2015). Während der Apoptose kommt es ebenfalls zum Desmosomenabbau, wobei die desmosomalen Bestandteile proteolytisch gespalten werden. DSP, DSG1, DSG3 und PKP1 werden durch Caspasen abgebaut (Weiske *et al.*, 2001; Dusek *et al.*, 2006). Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) kann durch TGF- β stimuliert werden und ist ein wichtiger Prozess bei der embryonalen Entwicklung, kommt aber auch bei der Kanzerogenese vor. Im mesenchymalen Gewebe werden *adherens junctions* und Desmosomen herunterreguliert. Während der EMT wird die Kopfdomäne von PKP3 an den Cysteinresten C18 und C129 gespalten, was durch Cysteinproteasen aus der Gruppe der Calpaine katalysiert wird (Keim-Janssen, 2008). Die Calpaine spalten während der EMT auch β -catenin, E- und N-Cadherin (Covault *et al.*, 1991; Rios-Doria *et al.*, 2004).

Das Modell der Desmosomenbildung und die gemeinsamen Interaktionspartner der Plakophiline sprechen für einen kooperativen Mechanismus bei der Rekrutierung desmosomaler Bestandteile. Da die Plakophiline aber auch exklusive Funktionen und Interaktionspartner in verschiedenen Geweben aufweisen, wird im Folgenden auf sie eingegangen.

1.3.2 Plakophilin1

Plakophilin1 kommt in mehrschichtigen Epithelien überwiegend suprabasal vor, wurde aber nicht in einschichtigen Epithelien gefunden (Kapprell *et al.*, 1988; Heid *et al.*, 1994; Smith und Fuchs 1998; Hatzfeld, 1999). Es sind zwei PKP1-Isoformen bekannt. PKP1a lokalisiert membranständig, zytoplasmatisch und nukleär, wobei die PKP1b-Isoform, welche im 4. *Armaddillo-repeat* über 21 zusätzliche Aminosäuren verfügt, vorwiegend im Zellkern lokalisiert (Schmidt *et al.*, 1997).

Die apikalen Epithelschichten der Haut entsprechen ausdifferenzierten Keratinozyten, die über prominente

Desmosomen verfügen, wobei die Hyperadhäsion als physiologische Eigenschaft reifer, ausdifferenzierter Desmosomen diskutiert wird (Garrod *et al.*, 2005). Die für PKP1 gefundenen Funktionen können die *in vivo* beobachteten Epitheleigenschaften gut erklären. Das Expressionsmuster von PKP1 in den verschiedenen Epithelschichten ähnelt dem seiner Interaktionspartner DSP, DSG1 und DSC1a (Garrod und Chidgey, 2007). PKP1 stimuliert die Rekrutierung desmosomaler Proteine an die Zellmembran und stabilisiert diese, wodurch größere und zahlreichere Desmosomen entstehen (Hatzfeld, 1999; Bornslaeger *et al.*, 2001; South *et al.*, 2003). Ebenso begünstigt die Überexpression von PKP1 die Entstehung hyperadhäsiver Desmosomen (Tucker *et al.*, 2014; Keil *et al.*, 2016). In der AG Hatzfeld wurde eine PKP1-*knockout*-Maus generiert. Da der PKP1-*knockout* zum Tod in der Neonatalperiode führte, wird für PKP1 eine essentielle Rolle bei der desmosomalen Zell-Zelladhäsion angenommen.

Die PKP1-*knockout*-Epidermis zeigt eine gestörte Barrierefunktion und weist suprabasal verbreiterte Interzellularräume auf, die mit einer signifikanten Verringerung der Desmosomengröße und -anzahl einhergeht (Rietscher *et al.*, 2016).

In vitro wurde eine direkte Interaktion mit Keratinen (K5/14) gefunden, die Stabilisierung von Keratinen an der Zellmembran *in vivo* ist aber vermutlich auf einen indirekten Effekt durch die DSP-Rekrutierung zurückzuführen (Smith und Fuchs, 1998). Die Keratine K5/14 sind zusammen mit RACK1 über die Hemmung der PKC α an der Bildung stabiler bzw. hyperadhäsiver Desmosomen beteiligt (Kröger *et al.*, 2013; Loschke *et al.*, 2015).

In Keratinozyten wurde beobachtet, dass PKP1 auch mit Aktinfilamenten assoziiert ist, wobei die Überexpression insbesondere der PKP1-*Armaddillo-repeat*-Domäne die Bildung von Filopodien induziert, was für eine Beeinflussung der Rho-GTPasen durch PKP1 spricht (Hatzfeld *et al.*, 2014). Für die DSP-Interaktion wird der N-Terminus von PKP1 benötigt, während der C-Terminus die Assoziation mit der Zellmembran vermittelt (Sobolik-Delmaire *et al.*, 2006).

Die klinische Relevanz von PKP1 zeigt sich beim autosomal rezessiv vererbten ectodermal dysplasia/skin fragility- (EDSF)-Syndrom, das auch PKP1-deficiency-Syndrom genannt wird. Die Haut von EDSF-Patienten ist mechanisch weniger widerstandsfähig, entzündungsanfälliger und zeigt eine Reduktion von Hautanhangsgebilden wie Schweißdrüsen und intakten Haarfollikeln (McGrath *et al.*, 1997; Ersoy-Evans *et al.*, 2006; Bazzi, 2007). Das PKP1-deficiency-Syndrom wird in neueren Klassifikationen als Form der Epidermiolysis bullosa eingeteilt (Intong und Murrell, 2012).

1.3.3 Plakophilin2

Plakophilin2 kommt in ein- und mehrschichtigen Epithelien sowie nichtepithelialen Geweben z.B. in Lymphfollikeln und im Herz vor (Mertens *et al.*, 1996).

Es sind zwei PKP2-Isoformen bekannt, die sich durch 44 zusätzliche Aminosäuren im 3. *Armaddillo-repeat* unterscheiden. Es wurden keine isoform-spezifischen Lokalisationen beobachtet (Mertens *et al.*, 1996).

Als Interaktionspartner wurden DSP, DSG1 und DSG2 sowie DSC1a und DSC2a identifiziert (Chen *et al.*,

2002). PKP2 ist auch an der Regulation der Aktinfilamente beteiligt, vermutlich indem es die Rekrutierung von RhoA an die Zellmembran steuert (Godsel *et al.*, 2010). Die Überexpression von PKP2 kann *in vitro* die Ausbildung von Filopodien bzw. des *branching phenotype* verursachen (Reynolds *et al.*, 1996; Simmermacher, 2012).

Mutationen im PKP2-Gen führen zur arrhythmogenen rechtsventrikulären Cardiomyopathie (ARVC), während der PKP2-*knockout* in Mäusen letale Herzfehler verursacht (Gerull *et al.*, 2004; Grossmann *et al.*, 2004).

1.3.4 Plakophilin3

Plakophilin3 kommt außer in Hepatozyten in allen ein- und mehrschichtigen Epithelien sowie in Lymphfollikeln vor und wird in allen Schichten der Epidermis ähnlich stark exprimiert (Bonné *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). PKP3 verfügt mit DSP, PG, DSG1-3 und den DSCa-Isoformen 1 bis 3 sowie 3b und Keratin 18 über die größte Anzahl identifizierter desmosomaler Interaktionspartner (Schmidt *et al.*, 1999; Bonné *et al.*, 1999, 2003). Die Expression von PKP3 wird durch den Transkriptionsfaktor ZEB1 negativ kontrolliert. ZEB1 unterdrückt bei der EMT auch die Expression von E-Cadherin und dem tight junction-marker ZO-1 (Aigner *et al.*, 2007).

Neben dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten PKP3a existiert eine PKP3b-Isoform, die durch einen alternativen Promotor der C/EBP-Familie kontrolliert wird und 15 zusätzliche N-terminale Aminosäuren aufweist. Die PKP3b-Isoform kommt eher in mehrschichtigen und kaum in einschichtigen Epithelien vor (Mühmer *et al.*, 2014). DSC1 und DSC3 werden bei der Differenzierung von Keratinozyten ebenfalls durch Promotoren der C/EBP-Familie reguliert (Smith *et al.*, 2004). Die PKP3-Isoformen zeigen keine Unterschiede in der subzellulären Lokalisation und kommen zytoplasmatisch sowie membranständig vor. Die Expression von Plakoglobin und E-Cadherin ist notwendig, damit PKP3 an die Desmosomen rekrutiert wird (Gosavi *et al.*, 2011). Nach PKP3-KD in HCT- und HaCat-Zellen wurden kleinere Desmosomen beobachtet. Besonders die Dynamik der Desmosomenbildung in Phase III ist nach PKP3-KD beeinflusst, im Ca²⁺-Switch wurde eine verringerte membranständige Lokalisation der desmosomalen Cadherine DSG2, DSC2/3 sowie PG, PKP2 und DSP beobachtet (Todorovic *et al.*, 2014). Der Verlust dieser desmosomalen Proteine von der Zellmembran wird nicht durch eine verringerte Expression verursacht, da die Expressionslevel durch den PKP3-KD nicht beeinträchtigt wurden (Kundu *et al.*, 2008; Todorovic *et al.*, 2014). Es gibt jedoch Hinweise, dass PKP2 und DSP auch auf translationaler Ebene von PKP3 positiv reguliert werden (Fischer-Kešo *et al.*, 2014).

Eine größere Variabilität der Desmosomengröße nach PKP3-KD, wird durch eine Desorganisation des desmosomalen Plaques erklärt (Todorovic *et al.*, 2014). Daher wird für PKP3 eine Rolle bei der Rekrutierung desmosomaler Proteine, insbesondere DSP, zur Zellmembran angenommen (Kundu *et al.*, 2008; Gosavi *et al.*, 2011).

Der PKP3-*knockout* im Mausmodell zeigt eine gesteigerte Entzündungsneigung der Epidermis und

Haarverlust infolge abnormaler Haarfollikel. Insgesamt fällt der Phänotyp im Vergleich zum PKP1-*knockout* aber relativ mild aus. In der Epidermis der PKP3-*knockout*-Maus wird Desmoplakin im Vergleich zum Wildtyp in den basalen Zellschichten schwächer und in den suprabasalen Schichten vermehrt exprimiert. Womöglich kompensieren die hochregulierten Plakophilin1 und 2 durch redundante Funktionen den PKP3-*knockout* (Sklyarova *et al.*, 2008). In der Epidermis von PKP3-*knockout*-Mäusen kommen zwar häufiger als in Wildtyp-Epidermis Zellzwischenräume vor, in Hinblick auf den insgesamt milden Phänotyp ergibt sich für PKP3 jedoch keine essentielle, sondern eher eine begünstigende Rolle bei der Desmosomenbildung.

Die Fähigkeit von Zellen zur Migration ist eine bedeutende Eigenschaft bei der Wundheilung, immunologischen und embryologischen Prozessen sowie bei der EMT und Transformation von benignen zu malignen Tumorzellen. Die Studienlage zur Korrelation der Migrationsfähigkeit mit der PKP3-Expression ist widersprüchlich (Tabelle 1). Die Assoziation von PKP3 mit Metastasen, gesteigerter Invasivität und positivem N-Stadium (als Maß der lymphogenen Metastasierung) kann als Ausdruck der verbesserten Migrationsfähigkeit von Zellen aufgefasst werden.

Korrelation	Gewebetyp	Studie
PKP3-KD ist mit Invasivität assoziiert	Dickdarmepithelkarzinome	Aigner <i>et al.</i> , 2007
PKP3-KD begünstigt Metastasen	Dickdarmepithelkarzinome	Kundu <i>et al.</i> , 2008
PKP3-KD ist mit Invasivität assoziiert	Urothelkarzinome	Takahashi <i>et al.</i> , 2012
PKP3-KD ist mit Metastasen assoziiert	Plattenepithelkarzinome	Papagerakis <i>et al.</i> , 2003
PKP3-Expression korreliert mit N-Stadium	Brustdrüsenkarzinome	Demirag <i>et al.</i> , 2012
PKP3-Expression begünstigt Migration	COS-7-Zellen	Furukawa <i>et al.</i> , 2005
PKP3-Expression korreliert mit N-Stadium	NSCLC-Zellen	Furukawa <i>et al.</i> , 2005

Tabelle 1: grün unterlegte Studien legen für PKP3 eine Rolle als Tumorsuppressor nahe, rot unterlegte Studien gehen von einer Rolle als Onkogen aus.

1.4 Zytoplasmatische Funktionen der Plakophiline

Die Plakophiline weisen neben der desmosomalen Lokalisation auch eine zytoplasmatische bzw. nukleäre Lokalisation auf und kommen deshalb als Vermittler in der Signaltransduktion in Frage, die z.B. Translation, Proliferation und Zell-Zelladhäsion koordinieren (Hatzfeld *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Bonné *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). Ausgehend von der Identifikation zytoplasmatischer und nukleärer Interaktionspartner und der Beeinflussung verschiedener Signalwege werden zytoplasmatische und nukleäre Funktionen der Plakophiline vermutet, deren Mechanismen bislang jedoch nicht abschließend geklärt sind.

PKP1 und PKP 3 wurden als Bestandteile von „stress granules“ (SG) identifiziert. SG bilden sich nach zellulärem Stress und stabilisieren mRNA in Verbindung mit inaktiven Translationsinitiationskomplexen. Als Interaktionspartner in SG wurden die mRNA-bindenden Proteine FXR-1, G3BP, PABPC-1 und UPF-1 identifiziert (Hofmann *et al.*, 2006; Fischer-Kešo *et al.*, 2014).

PKP3 interagiert auch außerhalb von SG in ungestressten DU-145 Zellen mit den genannten mRNA-

bindenen Proteinen (Fischer-Kešo *et al.*, 2014). Dies wurde als Hinweis auf eine Funktion von PKP3 bei der Translation in physiologischem Kontext gewertet. Eine wichtige Eigenschaft in diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit, direkt oder indirekt an mRNA zu binden. Obwohl viele Assoziationen von PKP3 z.B. mit rpS6, eIF-4E, PABPC1, UPF-1 und G3BP RNAse-sensibel und damit RNA-abhängig sind, konnte bislang keine direkte Interaktion von PKP3 mit mRNA nachgewiesen werden (Hofmann *et al.*, 2006; Fischer-Kešo *et al.*, 2014).

Allerdings ist PKP3 in der Lage, die mRNA desmosomaler Proteine (PKP2, DSP) zu stabilisieren, was auch zu einem erhöhten Proteinlevel führt. Hierbei interagiert PKP3 über FXR-1 indirekt mit PKP2-mRNA. FXR-1 kann sowohl an die PKP3-Kopf- als auch ARM-repeat-Domäne binden. Diese Interaktion ist RNAse-unabhängig. Für die Interaktion des PKP3/FXR-1-Komplexes mit PKP2-mRNA sind die Aminosäuren 516 bis 797 in der ARM-repeat-Domäne nötig (entspricht Insert bis C-Terminus, Abbildung 22; Fischer-Kešo *et al.*, 2014). Es ist plausibel, dass PKP3 posttranskriptionell die Expression jener desmosomalen Interaktionspartner steuert, die es an die Zellmembran rekrutiert (Todorovic *et al.*, 2014). Neben der Translationsregulation spezifischer mRNAs wurde in der AG Hatzfeld bereits 2010 ein stimulierender Einfluss von PKP1 und PKP3 auf die globale Translation entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von PKP3 die globale Translation anregt, bzw. ein *knockdown* die globale Translation hemmt (Wolf *et al.*, 2010). PKP1- bzw. PKP3 *knockout*-Mäuse haben ein niedrigeres Gewicht, was mit einem Einfluss auf die Proteinsynthese vereinbar ist. Patienten mit *PKP1-deficiency-Syndrom* zeigen Gedeihstörungen (Ersoy-Evans *et al.*, 2006; Sklyarova *et al.*, 2008; Rietscher *et al.*, 2016).

1.5 Proliferationsstimulation und nukleäre Funktionen der Plakophiline

PKP1 und PKP2 binden *in vitro* an Einzelstrang-DNA und es wurde nach DNA-Schädigung eine Akkumulation von PKP1 im Zellkern beobachtet, die womöglich eine Rolle bei der Apoptoseinduktion nach DNA-Schädigung spielt (Hatzfeld, 2010; Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010). PKP2 bindet an Komponenten der RNA-Polymerase 3 und den Transkriptionsfaktor TFIIIB, der für die korrekte Funktion der RNA-Polymerase 3 benötigt wird (Mertens *et al.*, 2001). Eine Beeinflussung der Translation durch PKP2 wurde allerdings nicht beobachtet (Wolf *et al.*, 2010). Aufgrund der Interaktion von PKP2 mit β -Catenin und der Stimulation von Transkriptionsfaktoren aus der LEF/TCF-Familie wird eine Funktion im Wnt-Signalweg vermutet (Chen *et al.*, 2002).

Obwohl ein nukleäres Immunfluoreszenzsignal für PKP3 nur einmalig in humanen epithelialen Zelllinien beschrieben wurde, kann es den Transkriptionsfaktor ETV1 in *Xenopus laevis* positiv regulieren (Bonné *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2014). Ebenso wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch PKP3 beobachtet, wobei der zugrundeliegende Mechanismus sowie der physiologische Zusammenhang dieser Ergebnisse noch gezeigt werden muss (Arimoto *et al.*, 2014).

Es ist bekannt, dass die Überexpression von PKP3 die Proliferation von DU-145-Zellen, sowie COS-7-

Zellen stimuliert (Furukawa *et al.*, 2005; Breuninger *et al.*, 2010). Demgegenüber führt der PKP3-KD in mehreren NSCLC-Zelllinien (non-small-cell-lung-cancer) zu einer signifikant verminderten Zellzahl. Dass eine verminderte Zellzahl nach PKP3-KD vorrangig durch eine verringerte Proliferationsrate und nicht durch eine erhöhte Apoptoserate zustande kommt, wurde von Kießling nachgewiesen (Kießling, 2014). Für PKP3 ist weiterhin eine Interaktion mit der GTPase DNM-1L (dynamin1-like) gezeigt (Furukawa *et al.*, 2005). Da diese GTPase die Mitochondrienteilung reguliert, besteht womöglich ein Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Lokalisation von PKP3 und der Nachproduktion dieser Zellorganellen nach der Zellteilung (Santel und Frank, 2008).

Die erhöhte Anzahl proliferierender Zellen in der Epidermis von juvenilen PKP3-*knockout*-Mäusen spricht demgegenüber eher für einen proliferationshemmenden Einfluss von PKP3 in der Epidermis (Sklyarova *et al.*, 2008). Um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären, ist eine alleinige Betrachtung des Expressionslevels von PKP3 nicht ausreichend. Welchen Regulationsmechanismen unterliegt PKP3 im Kontext der verschiedenen Epithelien bzw. Tumorzellen und der jeweiligen aktiven Signalwege?

1.6 Regulation der subzellulären Lokalisation der Plakophiline

Die Expression der Plakophiline wurde in vielen Tumoren untersucht und ist im Vergleich zum entsprechenden gesunden Gewebe teils überexprimiert, teils herunterreguliert. (Hatzfeld *et al.*, 2014). Die Assoziation der PKP1- bzw. PKP3-Unterexpression mit malignen Tumoren könnte auf der verminderten Rekrutierung desmosomaler Proteine und der dadurch verminderten Zell-Zelladhäsion bzw. gesteigerten Migrationsfähigkeit beruhen. In diesem Zusammenhang käme PKP3 eine Rolle als Tumorsuppressor zu. Die gefundene Überexpression in metastasierenden Tumoren steht aber im Widerspruch dazu (siehe Tabelle 1).

Gegen eine Rolle als Tumorsuppressor spricht auch der stimulierende Effekt, den die PKP3-Überexpression auf die Proliferationsrate hat. Eine unkontrollierte Proliferation ist eine wesentliche Eigenschaft maligner Tumoren. Dass eine gesteigerte Proliferationsrate mit einer PKP3-Überexpression assoziiert ist bzw. dadurch hervorgerufen werden kann, wurde in mehreren Studien gezeigt (Furukawa *et al.*, 2005; Breuninger *et al.*, 2010; Demirag *et al.*, 2012). In Lungenkarzinomzellen wurde nach PKP3-*knockdown* eine verringerte Proliferationsrate beobachtet (Furukawa *et al.*, 2005). In diesem Kontext wird PKP3 eine Rolle als Onkogen zugeschrieben. Diese Widersprüche legen nahe, dass die Funktion der Plakophiline vom zellulären Kontext abhängt. Wolf und Hatzfeld stellen ein Modell vor, das diese scheinbaren Widersprüche mit der dualen subzellulären Lokalisation der Plakophiline erklärt (Wolf und Hatzfeld, 2010). Die membranständige Lokalisation der Plakophiline begünstigt die Zell-Zelladhäsion, während die zytoplasmatische bzw. nukleare Lokalisation die Translation und Proliferation stimuliert. Demnach beeinflusst vorrangig die subzelluläre Lokalisation und weniger das Expressionslevel die Funktion der Plakophiline.

Die subzelluläre Lokalisation von PKP1 wird durch die AKT2 im Insulin/IGF-1/PI3K-Signalweg reguliert,

wobei die Phosphorylierung den zytoplasmatischen Pool stabilisiert und zu einer gesteigerten Translation, Proliferation und Migrationsfähigkeit bzw. verminderter Zell-Zelladhäsion führt (Wolf *et al.*, 2013). Die Stimulation mit EGF führte im Vergleich zu Insulin und IGF-1 zu einer weniger stark ausgeprägten PKP1-Phosphorylierung.

Die nukleäre bzw. zytoplasmatische Lokalisation von PKP2 wird durch die C-TAK1 (Cdc25C-associated kinase 1) reguliert. Die Phosphorylierung von Serin S82 erzeugt ein 14-3-3-Bindemotiv, welches die Zellkerntanslokation verhindert (Müller *et al.*, 2003).

Die Phosphorylierung ist eine häufig beobachtete, schnelle und reversible posttranslationale Modifikation, die insbesondere in Analogie zu den anderen Plakophilinen als Regulationsmöglichkeit der PKP3-Lokalisation infrage kommt. PKP3 transloziert in HaCat-Zellen nach Hitzeschock oder oxidativen Stress (Natriumarsenit) innerhalb von 10 bis 30 min von der Zellmembran in das Zytoplasma. Diese relativ schnelle Lokalisationsänderung könnte durch eine Phosphorylierung realisiert werden. Mittels Massenspektrometrie wurden zahlreiche phosphorylierte Serin/Threonin- und Tyrosin-Reste sowie methylierte und acetylierte Aminosäurenreste nachgewiesen (Kim *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2012; Hatzfeld *et al.*, 2014). Vor Beginn der experimentellen Arbeiten war jedoch keine Kinase bekannt, welche die Lokalisation von PKP3 reguliert. Da PKP1 und PKP2 Substrate in den bekannten EGF und IGF-Signalwegen sind, welche die Differenzierung, Proliferation und Zell-Zell-Adhäsion steuern, wurde nach einer Kinase gesucht, die Teil dieser Signalwege ist und womöglich die Funktion bzw. Lokalisation von PKP3 steuert.

2 Zielstellung

Da die Funktion der Plakophiline maßgeblich von ihrer Lokalisation abhängt und auch für PKP3 unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen in Epithelschichten mit unterschiedlichen Funktionen gezeigt wurden, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Regulation der Lokalisation von PKP3 zu untersuchen.

Im ersten Schritt wurde die Interaktion der p70-S6-Kinase *in vitro* und im zellulären Kontext untersucht. Da eine Lokalisationsänderung von PKP3 in Abhängigkeit von der Aktivität der S6-Kinase beobachtet wurde, folgte die Identifizierung physiologisch relevanter Phosphorylierungsstellen durch Mutagenese. Mit Hilfe der generierten PKP3-Klone wurde der Einfluss der Phosphorylierung auf die subzelluläre Lokalisation mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Um mögliche Funktionen von PKP3 zu erfassen, die mit einer zytoplasmatischen Lokalisation zusammenhängen, wurde im BrdU-assay die Proliferationsrate in Abhängigkeit von der PKP3-Phosphorylierung untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 PCR-Mutagenese

Um gezielt Mutationen in die PKP3-Sequenz einzubringen, wurde eine PCR-Mutagenese durchgeführt. Dabei wurden Primer verwendet, welche die gewünschten Mutationen enthielten. In der PCR bindet je ein modifizierter Primer an den flankierenden Bereich einzelsträngiger denaturierter DNA. Die Verlängerung des Primers erfolgt durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Jeder PCR-Ansatz beinhaltet die template-DNA, die beiden Primer, die vier dNTPs (dATP, dCTP, dTTP und dGTP) und die *Pfu*-Polymerase in entsprechender Pufferlösung. Um eine Interaktion zwischen forward- und reverse-Primer zu verhindern, erfolgte erst eine Vor-PCR mit 4 Zyklen in getrennten Ansätzen A und B (siehe Tabelle 2). Nach Vereinigung der Ansätze A und B erfolgten 20 Zyklen wie in Tabelle 3 dargestellt.

Ansatz A:

25 ng template-DNA
10 µM *forward* Primer
1x PCR-Puffer
10 mM dNTP
1,25 U *Pfu*-Polymerase
in 25 µl ddH₂O

Ansatz B:

25 ng template-DNA
10 µM *reverse* Primer
1x PCR-Puffer
10 mM dNTP
1,25 U *Pfu*-Polymerase
in 25 µl ddH₂O

Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturieren	95 °C	2 min	4 Zyklen
Denaturieren	95 °C	30 sec	
annealing	45 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	18 min	

Tabelle 2: PCR-Programm für Ansatz A und B. Nach Vereinigen der Ansätze A und B wurden 2,5U *Pfu*-Polymerase und 10mM dNTP zugeben.

Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturieren	95 °C	2 min	20 Zyklen
Denaturieren	95 °C	30 sec	
annealing	45 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	18 min	
Reaktionsende	4 °C		

Tabelle 3: PCR-Programm nach Vereinigung der Ansätze A und B.

Die Generierung der Mutanten für das 2. Motiv erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Mutagenesen, bei denen die 3 Triplets nacheinander mutiert wurden, um den Anteil unspezifischer Primerbindungen zu minimieren. Um die nichtmutierte, methylierte template-DNA aus dem PCR-Produkt zu entfernen, wurde

ein *DpnI*-Verdau für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Das Restriktionsenzym *DpnI* spaltet ausschließlich methylierte DNA, während das nichtmethylierte PCR-Produkt erhalten bleibt. Dieses wurde anschließend transformiert (siehe 3.1.4) und nach Präparation der Plasmid-DNA (siehe 3.1.5) durch analytischen Restriktionsverdau (siehe 3.1.6) auf korrekte Mutation überprüft und durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert.

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um Nukleinsäuren bezüglich ihrer Größe zu untersuchen und aufzutrennen wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Dabei macht man sich zunutze, dass Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Geschwindigkeit wird hauptsächlich vom Molekulargewicht und der Konformation der Nukleinsäuren bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden 1%ige Agarose-Gele verwendet und mit 0,3 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren und ermöglicht deren Fluoreszenz im UV-Licht. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TBE gepuffert für 30-60 min bei 100 V. Die Molekulargewichte der DNA-Banden wurden im Vergleich zu mitlaufenden DNA-Molekulargewichtsmarkern (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Marker, Thermo Scientific) bestimmt.

3.1.3 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen

Die DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen erfolgte nach dem Prinzip der Anionen-Austausch-Chromatographie mithilfe des ‚NucleoSpin Gel System‘ (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben.

3.1.4 Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation wird exogene DNA in chemokompetente Bakterienzellen eingebracht. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die Calciumchlorid-Methode verwendet. Der Transformations-Ansatz (5 bis 25 µl DNA und entsprechend 5x KCM) wurde zu 100 µl aufgetauten und auf Eis gekühlten *E. coli* JM109 gegeben. Es folgte eine Inkubation für zunächst 20 min auf Eis und anschließend für 10 min bei RT. Danach wurde 1 ml lysogeny broth-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C mit 600 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (1 min mit 6000 rpm) und das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf LB-Agar-Platten, mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/µl Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für weitere Analysen der Kolonien erfolgte eine Plasmidpräparation (siehe 3.1.5).

3.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zunächst wurden die ausplattierten Bakterienkolonien über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (100 µg/µl Ampicillin bzw. 50 µg/µl Kanamycin)

vermehrt. Die Mini-Plasmidpräparation erfolgte im 3 ml-Ansatz, die Midi-Plasmidpräparation im 200 ml-Ansatz. Angeimpft wurde jeweils mit einer einzelnen Bakterienkolonie.

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für eine Mini-Plasmidpräparation wurden je 1,5 ml der Kulturen für 1 min bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet in 100 µl eiskalter Lösung A resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte nach Zugabe von 200 µl Lösung B und Inkubation des Lysats für 5 min bei RT. Das enthaltene SDS löst dabei Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände, NaOH denaturiert die genomische DNA. Diese Zellbestandteile wurden anschließend durch 150 µl Lösung C präzipitiert und abzentrifugiert (10 min mit 13000 rpm bei RT). Der Überstand wurde für 15 min mit 800 µl Isopropanol bei Raumtemperatur inkubiert, um so die gelöste Plasmid-DNA auszufällen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA pelletiert (3 min mit 13000 rpm bei RT), mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und bei 60 °C getrocknet. Die DNA wurde unter Schütteln bei 37 °C in 30 µl ddH₂O gelöst. Die zugesetzte RNase A (10 µg/ml) verdaute enthaltene RNA und wurde abschließend inaktiviert (15 min bei 65 °C). Plasmid-DNA, die bezüglich Menge, Konzentration und Reinheit den Ansprüchen der Transfektion humaner Zelllinien genügen sollte, wurde mithilfe des NucleoBond® Xtra EF Midi-Präparationskits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA-Konzentration und Reinheit wurde photospektrometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers Genequant 1300 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Plasmidlösungen wurden bei -20°C gelagert.

3.1.6 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Für die Analyse von DNA-Plasmiden (analytischer Restriktionsverdau) bzw. die Klonierung von DNA-Fragmenten (präparativer Restriktionsverdau) wurden diese mittels Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch geschnitten. Die Ansätze sind in Tabelle 4 dargestellt.

	analytischer Restriktionsverdau	präparativer Restriktionsverdau
DNA	1 µl	20 µl (1 µg/µl)
10x Enzympuffer	1 µl	10 µl
Restriktionsenzyme	0,5 µl (10 U/µl)	3 µl (10 U/µl)
mit ddH ₂ O auffüllen auf:	10 µl	100 µl

Tabelle 4: Ansätze für analytischen und präparativen Restriktionsverdau.

Die Ansätze des analytischen Restriktionsverdaus wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert, bei präparativen Restriktionsverdaus für 4 h oder über Nacht.

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten PKP3-Mutanten wurden zur Kontrolle der Mutagenese durch mutationsspezifische Restriktionsschnittstellen identifiziert. Die eingefügten Mutationen ermöglichten bzw. verhinderten den Restriktionsverdau mit den in Tabelle 5 aufgeführten Restriktionsendonukleasen. Die

anschließend durchgeführte Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.2) zeigte jeweils ein mutationsspezifisches Bandenmuster. Die Restriktionsschnittstellen und Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 18 im Anhang aufgeführt.

Mutante	für analytischen Verdau	für Umklonierung in DsRed N1
S 134/135 →A	-	EcoR I / Sal I
S 134/135 →E	BseR I	EcoR I / Sal I
S 280/283/285 →A	Fsp I	EcoR I / Bsp 1407 I
S 280/283/285 →E	Fsp I	EcoR I / Bsp 1407 I
S 313/314 →A	Eco52 I	BsiW I / Xmn I
S 313/314 →E	BseR I	EcoR I / Sal I

Tabelle 5: Restriktionsendonukleasen für analytischen Verdau.

Zur Umklonierung von DNA-Fragmenten wurde der entsprechende Ursprungsvektor pCR 2.1.TOPO-TA PKP3-Mutanten mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut wie der Zielvektor pDsRed1-N1 PKP3-wt (siehe Tabelle 5). Die Isolierung der gewünschten Fragmente erfolgte durch Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.2) und Gelextraktion (siehe 3.1.3.).

3.1.7 Ligation

Mithilfe der T4-Ligase wurden die DNA-Fragmente mit den jeweiligen Zielvektoren zwischen 3'-Hydroxyl-Ende und 5'-Phosphat-Ende kovalent verknüpft. Das stöchiometrische Verhältnis zwischen DNA-Fragment und Zielvektor betrug 4:1. Um diese Relation einstellen zu können, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.2) durchgeführt und die entsprechenden Bandenintensitäten ausgewertet. Nach der Inkubation des Ligationsansatzes für 2 h bei Raumtemperatur wurde dieser in chemokompetente *E. coli* JM109 transformiert (siehe 3.1.4).

10 µl-Ligationsansatz:

x µl DNA-Fragment
y µl linearisiertes Plasmid
1 µl T4-Ligase (1 U/µl)
1 µl 10x T4 Ligasepuffer
mit ddH₂O auf 10 µl auffüllen

3.2 Zellbiologisches Arbeiten

3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zelllinien HeLa und MCF-7 wurden unter sterilen Bedingungen in 10 cm-Kulturschalen bei 37 °C, 90 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ in Kultivierungsmedium im Brutschrank kultiviert. Entsprechend der gewünschten zelllinienspezifischen Konfluenz wurden die Zellkulturen nach 2 bis 3 Tagen passagiert. Dazu wurde der

Zellmonolayer mit PBSE gewaschen, um das für die Cadherin-Verbindungen benötigte Calcium zu chelatieren und anschließend mit 0,5 % Trypsin/PBSE für 1 bis 3 min inkubiert und so von der Kulturschale abgelöst. Der Trypsinverdau wurde durch Aufnahme der Zellen in Kulturmedium, Pelletieren (3 min bei 1500 rpm) und Verwerfen des Überstandes abgestoppt. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Zum erneuten Ausplattieren wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und in gewünschter Verdünnung weiter kultiviert.

Kulturmedium:

Dulbecco's modified Eagle's medium
 10 %(v/v) FCS
 1 %(v/v) 1mM Natriumpyruvat

3.2.2 Transfektion von Plasmid-DNA mittels Calciumphosphat-Methode

Bei der Transfektion mithilfe der Calciumphosphat-Methode werden exogene Nukleinsäuren transient in eukaryotische Zellen eingebracht. Dabei wird die zu transfizierende Plasmid-DNA mit Calciumchlorid und einem phosphathaltigen Präzipitationspuffer inkubiert, wodurch sich DNA-Calciumphosphat-Präzipitate bilden, die sich an der Zellmembran niederschlagen und durch Endozytose aufgenommen werden. Ein Glycerolschock verbessert die Transfektionseffizienz. Die entsprechenden Gene werden nur wenige Tage exprimiert und durch Zellteilung kommt es zu einem Verdünnungseffekt der transfizierten Plasmide.

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in 6-well-Platten mit 12 mm Deckgläschen in definierter Zelldichte ausgesät (siehe Tabelle 6). 30 min vor der Transfektion wurde das Kultivierungsmedium erneuert und die Zellen mit dem nachfolgend beschriebene Transfektionsansatz versetzt.

Zelllinie	Zelldichte pro 35-mm-Kulturschale
HeLa	2 x 10 ⁵ Zellen
MCF-7	2,3 x 10 ⁵ Zellen

Tabelle 6: Zelldichte der verwendeten Zelllinien.

Transfektions-Ansatz für 35-mm-Kulturschale:

7,5 µg Plasmid-DNA
 12,5 µl CaCl₂ (2M)
 100 µ 2x Präzipitationspuffer
 mit ddH₂O auf 200 µl auffüllen

Die DNA wurde unter sterilen Bedingungen mit ddH₂O entsprechend verdünnt und mit CaCl₂ versetzt. Tropfenweise wurden 100 µl DNA-Präzipitationspuffer hinzugefügt und der Ansatz nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf die Zellkultur getropft. Es wurde dann für 6 h im Brutschrank weiter kultiviert und anschließend mit FCS-freiem Kultivierungsmedium gewaschen. Der Glycerolschock erfolgte durch 1-minütige Inkubation mit 500 µl Glycerol-Puffer pro Kulturschale bei RT. Es folgte ein Waschschrift, dann wurde Kultivierungsmedium zugegeben und im Brutschrank weiter kultiviert.

Die so transfizierten HeLa und MCF-7 Zellen wurden bei der Immunfluoreszenz (siehe 3.2.3), Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (siehe 3.2.4) und dem Zellproliferationstest (siehe 3.2.5) weiter untersucht.

2x Präzitationspuffer (steril filtriert):

280 mM NaCl
10 mM KCl
1,5 mM Na₂HPO₄
12 mM Glucose
50 mM HEPES
pH 7,05

Glycerol-Puffer:

50% 2x Präzitationspuffer
35% ddH₂O
15% Glycerol

3.2.3 Immunfluoreszenz

Mithilfe der Immunfluoreszenz kann die Lokalisation von Proteinen in der Zelle untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Dabei wird das betreffende Protein in fixierten Zellen von einem spezifischen Primärantikörper gebunden. Durch einen zweiten, farbstoffmarkierten Sekundärantikörper, der speziesspezifisch gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist, wird der Komplex markiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindendem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und die Aktinfilamente mit F-Aktin-bindendem Fluorochrom-gekoppeltem Phalloidin gefärbt. Die transfizierten Zellen auf den Deckgläschen (siehe 3.2.2) wurden nach 24- bzw. 48-stündigem Wachstum dreimalig mit PBS gewaschen. Die Fixierung für die Desmoplakinfärbung erfolgte mit Methanol für 15 min bei -20°C, bei der Aktinfärbung wurde mit 3,7 % Formaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min bei Raumtemperatur mit Mikrotubuli-stabilisierendem Puffer (MT-Puffer) inkubiert, um die Plasmamembran zu permeabilisieren. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers abzusättigen, wurde Milchblockpuffer für 30 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zwei Waschrufen mit PBS und erneutem 10-minütigen Absättigen mit Milchblockpuffer folgte eine Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Zellkernfärbung mit DAPI wurde für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt, die Aktinfärbung mit Phalloidin erfolgte für 10 min bei RT, jeweils in Milchblockpuffer verdünnt. Während der Inkubation mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern und Phalloidin wurde Lichtexposition vermieden, um die Fluoreszenzfarbstoffe nicht auszubleichen. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit ddH₂O gewaschen, in 96%igem Ethanol entwässert, getrocknet und in Mowiol eingedeckelt. Die Objektträger wurden abgedunkelt bei 4 °C gelagert. Die Präparate wurden an einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop mit 20x, 60x, und 100x Objektiv mit Ölimmersion ausgewertet. Zur Dokumentation verfügte das Mikroskop über eine Vosskühler CCD-1300-QLN-Kamera und verwendete die Software NIS-Elements AR 2.30 MuTech MV1500 (beide Nikon, Düsseldorf). Die Bearbeitung von Helligkeit und Kontrast erfolgte mit der Software ImageJ Version 1.42 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

3.2.4 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Die bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation ermöglicht es, Protein-Protein-Interaktionen und deren Lokalisation *in vivo* zu detektieren. Bei der Methode wird aus zwei nichtfluoreszierenden komplementären Fragmenten ein fluoreszierender Proteinkomplex gebildet, wenn beide Fragmente in der Zelle assoziieren. Die Proteine, deren Interaktion untersucht werden soll, werden dabei an je ein Fragment fusioniert. Interagieren die zu untersuchenden Proteine, so assoziieren auch die Fragmente, was fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden kann. Über zusätzlich enthaltene FLAG- bzw. HA-tags kann die Ko-Expression beider Fusionsproteine via Immunfluoreszenz überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff das Venus-Protein, eine verbesserte YFP-Mutation (Yellow Fluorescent Protein) verwendet. HeLa- und MCF-7-Zellen wurden mit den im Anhang angeführten pVen1-FLAG- und pVen2-HA-Fusionsplasmiden ko-transfiziert (siehe 3.2.2), nach 24-stündigem Wachstum mit Formaldehyd fixiert und gefärbt (siehe 3.2.3). Die BiFC-Signale wurden am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

3.2.5 Zellproliferationstest mittels BrdU-Einbau

Zur Untersuchung der Zellproliferationsrate wurde das Thymidinanalogon BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin) benutzt, das während der S-Phase kompetitiv in die DNA eingebaut wird. Zellen, die während der BrdU-Exposition diese Zellzyklusphase durchlaufen und BrdU einbauen, können durch Immunfluoreszenz detektiert werden. Die Zellen wurden bei der Transfektion (siehe 3.2.2) nach dem Glycerolschock einem 24-stündigen Serumentzug mit 0,1%(v/v) FCS im Kulturmedium ausgesetzt, um die Zellen in der G0/G1-Phase zu arretieren und so in einen annähernd gleichen Zellzyklus zu bringen. Durch die Zugabe von vollwertigem Kultivierungsmedium für 16 h proliferierten die Zellen wieder. Die BrdU-Exposition erfolgte mit 10 μ M BrdU im Kulturmedium für 60 min im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die DNA für 10 Minuten in 4 M HCl denaturiert, um das in die DNA eingebaute BrdU für den Primärantikörper zugänglich zu machen. Die Neutralisation erfolgte durch drei 10-minütige Waschschrte mit BSA-Puffer, der auch unspezifische Proteinbindungen absättigte und die Zellmembranen permeabilisierte. Die Zellen wurden mit den Primärantikörpern α -DsRed und α -BrdU über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach drei Waschschrten mit PBS und 5-minütigem Absättigen mit BSA-Puffer bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit den Sekundärantikörpern für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkernfärbung erfolgte in 1 %(m/v) BSA/PBS. Abschließend wurde gewaschen, entwässert, getrocknet und eingedeckelt wie unter 3.2.3 beschrieben. Das Nachfärben der transfizierten Zellen mit dem Antikörper gegen DsRed war notwendig, weil durch die Behandlung mit 4 M HCl der chromophore Bereich des DsRed denaturiert wurde. Am Fluoreszenzmikroskop wurden pro Ansatz mindestens 200 transfezierte MCF-7-Zellen ausgezählt.

3.3 Proteinbiologisches Arbeiten

3.3.1 Expression von GST- und His₆-Fusionsproteinen

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die in Tabelle 16 im Anhang aufgeführten pGEX-Vektoren in *E. coli* vom Stamm ArcticExpress™ (DE3) RIL transformiert (siehe 3.1.4). Die aufgeführten pRSET-Vektoren, die für die entsprechenden His₆-Fusionsproteine kodieren, wurden in *E. coli* vom Stamm BL21 (DE3) pLysS transformiert. Die Kolonien wurden auf ampicillinhaltigen Agarplatten selektioniert, in 2xYT-Medium resuspendiert und folgende Ansätze damit angeimpft: 200 ml-Ansätze mit transformierten *E. coli* vom Stamm ArcticExpress™ wurden mit 2xYT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 verdünnt und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 0,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Es wurde über Nacht bei 13 °C weiter schüttelnd inkubiert. Die transformierten *E. coli* vom Stamm BL21 pLysS wurden in 500 ml-Ansätzen auf eine OD₆₀₀ von 0,03 eingestellt und ohne Induktion über Nacht bei 20°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (5 min mit 5000 rpm bei 4 °C) und in 1 ml-Aliquots bei -80 °C gelagert. Für weitere Analysen wurden die Bakterienpellets in Lysepuffer aufgenommen und mit dem Ultraschallhomogenisator UP200S (50% Geräteleistung; 3x 30 s) aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 30 min bei 4°C mit 1 %(v/v) Triton® X-100 rotierend inkubiert. Zelltrümmer und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugieren (15 min mit 14000 rpm bei 4 °C) entfernt. Der Überstand mit den gelösten Fusionsproteinen wurde umgehend für den GST-pull-down (3.3.2) eingesetzt.

Lysepuffer:

50 mM TRIS/HCl pH 7,5

150 mM NaCl

2 mM EDTA

kurz vor Verwendung zugegeben: 1 mM DTT; Proteaseinhibitoren: 1 mM Pefabloc; 10 µg/ml Aprotinin;

10 µg/ml Leupeptin

3.3.2 GST-pull-down

Der GST-pull-down ist eine *in vitro*-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei wird ein bait-Protein mit GST-tag an Glutathion-Sepharose-beads gebunden und die Affinität der Glutathion-S-Transferase (GST) zu ihrem Substrat genutzt. Diese mit bait-Protein beladenen Glutathion-Sepharose-beads werden mit *E. coli*-Zelllysaten inkubiert, die das prey-Protein enthalten. Wenn das prey-Protein mit dem bait-Protein interagiert, kann der Komplex aus Glutathion-Sepharose-beads, bait- und prey-Protein durch Zentrifugieren isoliert werden und anschließend durch SDS-PAGE (siehe 3.3.3) aufgetrennt und mittels Western Blot (siehe 3.3.4) nachgewiesen werden. Das prey-Protein ist in der vorliegenden Arbeit zusätzlich mit einem His₆-tag versehen. Die bait- und prey-Fusionsproteine wurden wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben gewonnen. 20 µl Glutathion-Sepharose-beads wurden zweimal mit Lysepuffer gewaschen und für 1 h bei 4 °C mit 1 ml bait-Protein-haltigem Lysat rotierend inkubiert. Durch dreimaliges

Waschen mit Lysepuffer, Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurden ungebundene Proteine entfernt. Die so beladenen Glutathion-Sepharose-beads wurden anschließend mit Lysaten, die das prey-Protein enthielten, für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit Lysepuffer entfernt. Die trockenen beads in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Dieses Eluat wurde 5 min bei 95 °C denaturiert, um die Protein-Protein-Bindungen zu lösen. Mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.3) und Western Blot (siehe 3.3.4) erfolgten weitere Analysen.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine im elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten zur Anode aufgetrennt. Dazu werden die Proteine denaturiert und ihre Ladung durch einen basischen pH-Wert und Anlagerung von SDS ins Negative verschoben. Dadurch hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Polyacrylamid-Gel hauptsächlich von deren Molekulargewicht ab. In der vorliegenden Arbeit wurden 10%ige Gele zur Auftrennung verwendet (Tabelle 7). Die Auftrennung erfolgte in der Elektrophoresekammer Mini PROTEAN Tetra (Bio-Rad, München) mit Elektrophoresepuffer. Die Proteine durchliefen das Sammelgel für ca. 20 min bei 80 V und wurden dann für 1 h bei 100 V im Trenngel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurden der Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham) und die Protein Ladder One, Triple color Broad Range (Nacalai Tesque, Kyoto) verwendet.

	Sammelgel	Trenngel
(Bis-)Acrylamid (1 : 37,5)	3,9 %	10 %
SDS	0,1 %	
TRIS/HCl	0,125 M; pH 6,8	0,375 M; pH 8,8
Tetramethylethyldiamin	0,025 % - 0,1 %	
Ammoniumperoxidsulfat	0,025 % - 0,2 %	

Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele. SDS: Sodiumdodecylsulfat, TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan.

3.3.4 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden im semi-dry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman, Dassel) überführt, um sie für Antikörper zugänglich zu machen. Die Proteine bewegen sich dabei im elektrischen Feld unter Erhalt des Bandenmusters aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel und bleiben auf der Nitrocellulosemembran haften. An die Blotkammer (Abbildung 3) wurden für 30 min 100 mA und anschließend für 15 min 150mA eingestellt. Zur Kontrolle der Übertragung wurden die Proteine reversibel mit Ponceau-Rot gefärbt. Vor der Entfärbung durch mehrmaliges Waschen mit TBST wurden die Markerbanden gekennzeichnet.

Kathode (-)
3 Lagen FP mit BP III
SDS-Polyacrylamid-Gel (ca. 6x9 cm)
Nitrocellulosemembran in BP II
3 Lagen FP mit BP II
3 Lagen FP mit BP I
Anode (+)

Abbildung 3: Schema der Blotkammer. FP: Filterpapier; BP: Blotpuffer.

3.3.5 Immundetektion

Die Detektion von Proteinen auf der Nitrocellulosemembran erfolgte mittels Primär- und enzymgekoppeltem Sekundärantikörper. Zunächst wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 5 % (m/v) Milchpulver/TBST bei Raumtemperatur geblockt. Über Nacht wurde mit 2 ml verdünntem Primärantikörper bei 4 °C rotierend inkubiert. Ungebundene Primärantikörper wurden danach durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt und anschließend wurde mit dem in 20 ml 5 % (m/v) Milchpulver/TBST verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysierte die Oxidation des Luminols, dessen Lumineszenz am Imager Fusion-SL (PEQLAB, Erlangen), und mit Röntgenfilm (FujiFilm X-ray, Düsseldorf) dokumentiert wurde. Als Substrat für diese Reaktion dienten CL-Lösung I und II, von denen je 1 ml pro Nitrocellulosemembran aufgetragen wurden.

3.3.6 Statistische Auswertung

Die Zellproliferationsrate (Abschnitt 3.2.5) und der GST-pull-down (Abschnitt 3.3.2) wurden je in drei unabhängigen Experimenten untersucht. Diese Datensätze wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test bei Varianzhomogenität auf Signifikanz überprüft. Die Varianzhomogenität wurde mit dem F-Test geprüft.

3.4 Material

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind im Anhang aufgelistet (Tabellen 14 und 15). Die verwendeten Puffer und Lösungen sowie Plasmide und Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet (Tabellen 16, 17, 19 im Anhang). Eine Auflistung der verwendeten Geräte, Kits und Software zeigt Tabelle 8.

3.4.1 Fluoreszenzfarbstoffe

DAPI: 5 mg/ml Stammlösung, Verdünnung 1:1000 in Milchblockpuffer oder 1 % (m/v) BSA /PBS

Phalloidin 488 (Oregon) Verdünnung 1:250 in Milchblockpuffer

3.4.2 Bakterienstämme und Zelllinien

E. coli JM 109 (Sigma-Aldrich, St. Louis)

E. coli ArcticExpress™ (DE3) RIL

E. coli BL21 (DE3) pLysS

HeLa: humane Zelllinie aus epithelalem Cervix-Karzinom (Gey *et al.*, 1952)

MCF-7: humane Zelllinie aus epithelalem Mamma-Karzinom (Soule *et al.*, 1973)

3.4.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen (Tabelle 18 im Anhang) und deren Puffer wurden von der Firma Thermo Scientific (Waltham) und New England BioLabs (Frankfurt a.M.) bezogen. *Pfu*-Polymerase wurde von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen, RNase A und T4-Ligase von Thermo Fischer Scientific (Waltham).

Geräte	Firma / Hersteller
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer Genequant 1300	GE Healthcare, Uppsala
UV-Tisch	bts Biotech, Kraichtal
Kühlzentrifuge Sorvall RC5B	Thermo Fischer Scientific, Waltham
pH-meter MultiCal pH 526	WTW, Weilheim
Tischzentrifugen Heraeus Pico 17	Thermo Fischer Scientific, Waltham
Inkubator Incucell V55	MMM Medcenter München
Schüttelinkubator 3032	GFL, Burgwedel
Brutschrank Heraeus cytoperm 2	Thermo Fischer Scientific, Waltham
Sterilbank Heraeus HERAsafe	Thermo Fischer Scientific, Waltham
Ultraschallhomogenisator UP200S	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow
Mini PROTEAN Tetra	Bio-Rad, München
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Königshofen
Imager Fusion-SL	PEQLAB, Erlangen
Heizblock BlockThermostat TH 23	DirectIndustry, Marseille
Netzteil Consort EV265 power supply	Isogen; De Meern
Nikon Eclipse E600 Mikroskop mit Kamera Vosskühler CCD-1300-QLN-Kamera	Nikon, Düsseldorf
Kits	
Gelextraktionskit , NucleoSpin Gel System	Macherey-Nagel, Düren
Midi-Präparationskit NucleoBond® Xtra EF	Macherey-Nagel, Düren
Software	
NIS-Elements AR 2.30 MuTech MV1500	Nikon, Düsseldorf
ImageJ Version 1.42	National Institutes of Health, Bethesda USA
Apache OpenOffice 4.1.0	Apache Software Foundation
Sonstiges	
Sterile Materialien für Zellkultur	TPP, Trasadingen
Nitrocellulosemembran	Whatman, Dassel
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus	Thermo Scientific, Waltham
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	Thermo Scientific, Waltham
Unstained Protein Molecular Weight Marker Ladder 1	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Triple color Broad Range	Nacalai Tesque, Kyoto

Tabelle 8: verwendete Geräte, Kits und Software.

4 Ergebnisse

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in der AG Hatzfeld die Interaktionen zwischen p70-S6-Kinase und den Kopf- bzw. ARM-*repeat*-Domänen der Plakophilin 1 bis 3 im Hefe-2-Hybrid-assay untersucht. Es zeigte sich eine Interaktion zwischen PKP3 und p70-S6-Kinase, die vorrangig durch die PKP3-Kopf-Domäne (AS 1 bis 342) vermittelt wird. Mit der PKP3-ARM-*repeat*-Domäne zeigt sich eine schwächere Interaktion. Eine Interaktion von PKP3 mit AKT1/2 konnte im Hefe-2-Hybrid-System nicht beobachtet werden (Wolf *et al.*, 2013). Im Folgenden wurde die putative Interaktion von Plakophilin 3 mit der p70-S6-Kinase mithilfe von *in vitro*-Verfahren und im zellulären Kontext untersucht.

4.1 Interaktion von PKP3 mit der p70-S6-Kinase

4.1.1 *In vitro*-Interaktion von PKP3 mit der p70-S6-Kinase

Um die Interaktion von PKP3 mit der p70-S6-Kinase in einem unabhängigen System zu bestätigen, wurde ein GST-pulldown (siehe Abschnitt 3.3.2) durchgeführt. Dafür wurde zunächst ein PKP3-GST-Fusionsprotein als bait-Protein bakteriell exprimiert (siehe Abschnitt 3.3.1). Ebenso wurde der Wildtyp (S6K-wt) und die dominant aktive Mutante der p70-S6-Kinase (S6K-da) als prey-Protein exprimiert. Beide Proteine waren zusätzlich mit einem His₆-tag versehen. Die dominant aktive p70-S6-Kinase zeichnet sich durch eine Mutation (T389 --> E) aus, wodurch sie konstitutiv aktiviert ist (Rosner *et al.*, 2011).

Das PKP3-GST-Fusionsprotein wurde infolge der hochaffinen Substrat-Enzym-Bindung an Glutathion-Sepharose-beads immobilisiert und mit dem jeweiligen prey-Protein inkubiert. Das Prinzip des GST-pulldown ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Das im Eluat enthaltenen prey-Protein wurde nach SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.3.3) im Western-Blot (siehe Abschnitt 3.3.4) semi-quantitativ untersucht. Da die S6K-wt bakteriell exprimiert wurde (siehe Abschnitt 3.3.1) und entsprechende upstream-Kinase, wie z.B. mTOR, in *E. coli* nicht vorhanden sind, kann angenommen werden, dass sie hauptsächlich unphosphoryliert vorliegt und daher inaktiv ist.

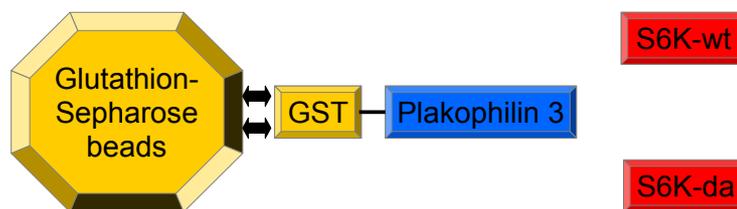


Abbildung 4: Schematische Darstellung des GST-pulldown-Prinzips.

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, präzipitiert der Wildtyp und die dominant aktive Mutante der p70-S6-Kinase mit dem PKP3-GST-Fusionsprotein, was auf eine Interaktion dieser Proteine *in vitro* schließen lässt. Die Tatsache, dass deutlich mehr p70-S6-Kinase an das PKP3-GST-Fusionsprotein bindet, als an

die Glutathion-Sepharose-beads, zeigt die Spezifität dieser Interaktion. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Interaktion durch die Glutathion-S-Transferase des PKP3-GST-Fusionsproteins vermittelt wird, wurde ein zusätzlicher Bindungstest mit GST durchgeführt. Dabei zeigte sich eine minimale Präzipitation von p70-S6-Kinase, die durch Proteinaggregation und unspezifische Proteinbindung an die Glutathion-Sepharose zu erklären ist. Um die Bandenintensität im Western-Blot genauer beurteilen zu können, wurden die Banden aus mehreren unabhängigen Experimenten digital erfasst.

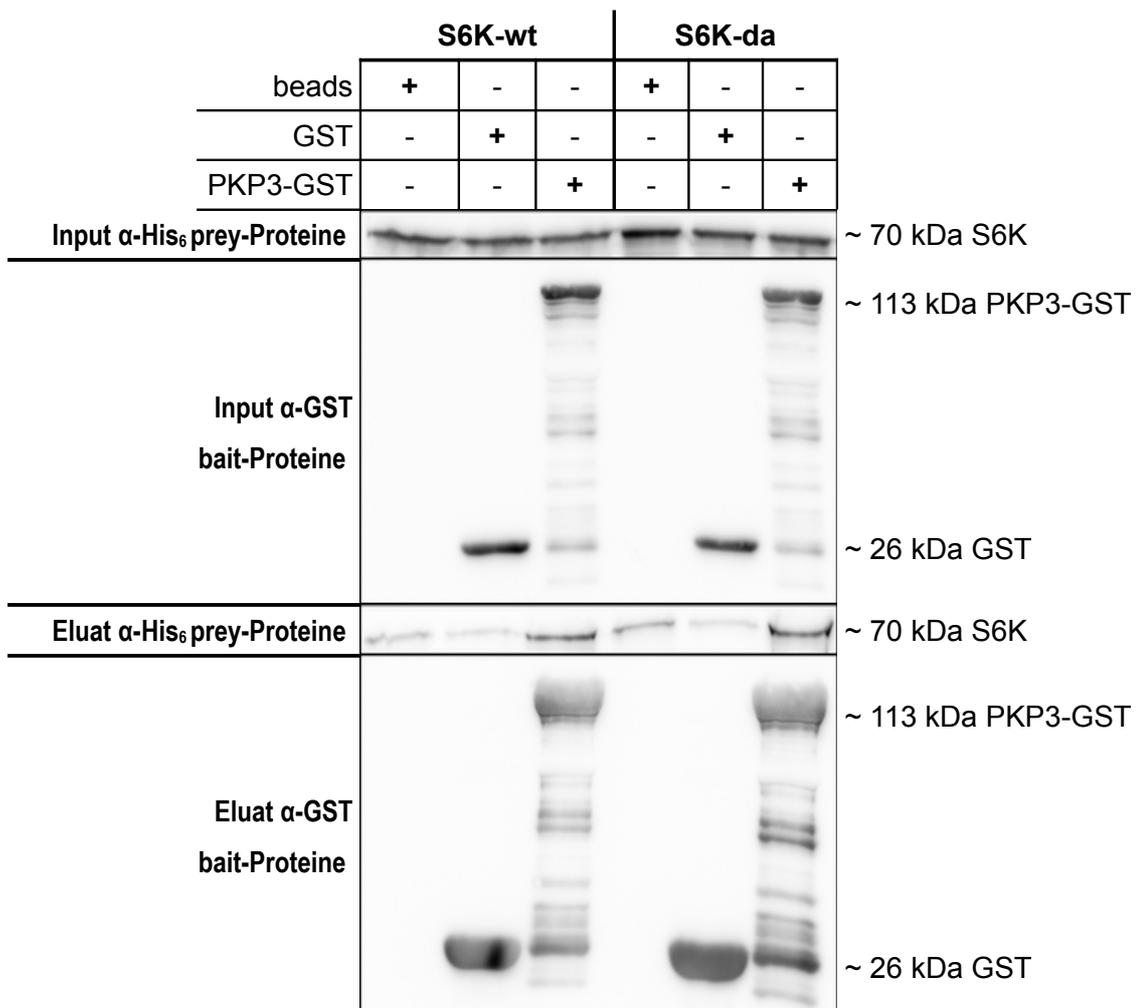


Abbildung 5: *In vitro*-Interaktion von PKP3 mit Wildtyp p70-S6-Kinase im Vergleich mit dominant aktiver p70-S6-Kinase. Nach Immobilisation von GST und PKP3-GST-Fusionsprotein an die Glutathion-Sepharose-beads erfolgte der Bindungstest durch 60-minütige Inkubation mit S6K-wt bzw. S6K-da-haltigem Zelllysate. Nach intensiven Waschschriffen wurden die präzipitierten Proteine mit 2x SDS-Probepuffer eluiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und via Western-Blot markiert. Die Markierung erfolgte über den eingbrachten His₆-tag bzw. einen α -GST-Antikörper. Zur Kontrolle der Expression von bait- und prey-Protein wurden 20 % des Gesamtzelllysates als Ladekontrolle (Input) aufgetragen. Zelllysate mit S6K-wt- und S6K-da wurden im Vorfeld mittels SDS-Page und Western-Blot auf ihre Konzentration an prey-Protein überprüft und angeglichen, um im GST-pulldown einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

Wie in Abbildung 6 gezeigt, assoziiert wesentlich mehr p70-S6-Kinase mit PKP3-GST als mit den Glutathion-Sepharose-beads oder mit GST. Um diesen Vergleich anzustellen, wurde im Vorfeld mittels Westernblot makroskopisch sichergestellt, dass beide Kinasen in gleicher Konzentration bzw. Menge eingesetzt wurden. Um dennoch minimale Unterschiede auszugleichen, wurden die S6K-Eluate digital erfasst, auf das jeweilige S6K-Input bezogen und mit dem bead-Kontrollansatz normiert. Bei der Auswertung dreier unabhängiger Experimente stellte sich die Anreicherung von S6K-wt sowie S6K-da im PKP3-pulldown als signifikant ($p < 0,05$) heraus. Aufgrund der durchgeführten Konzentrationsanpassung ist ein Vergleich der PKP3-Assoziation zwischen dem Wildtyp der p70-S6-Kinase und der dominant aktiven Kinase möglich. Dabei zeigt sich eine 1,4-fach stärkere, signifikante ($p < 0,05$) Interaktion mit der aktiven Kinase. Die geringen Mengen an S6-Kinase, die in den Ansätzen mit Glutathion-Sepharose-beads und GST nachgewiesen wurden, sind durch Proteinaggregation und ungesättigte, unspezifische Proteinbindungsstellen erklärbar. Bei den Glutathion-Sepharose-beads sind weniger Bindungsstellen abgesättigt als im GST-Ansatz.

Es konnte *in vitro* eine deutliche Interaktion zwischen den beiden aufgereinigten Proteinen PKP3 und p70-S6-Kinase bestätigt werden, insbesondere zeigt sich eine Präferenz für die dominant aktive Kinase gegenüber dem Wildtyp.

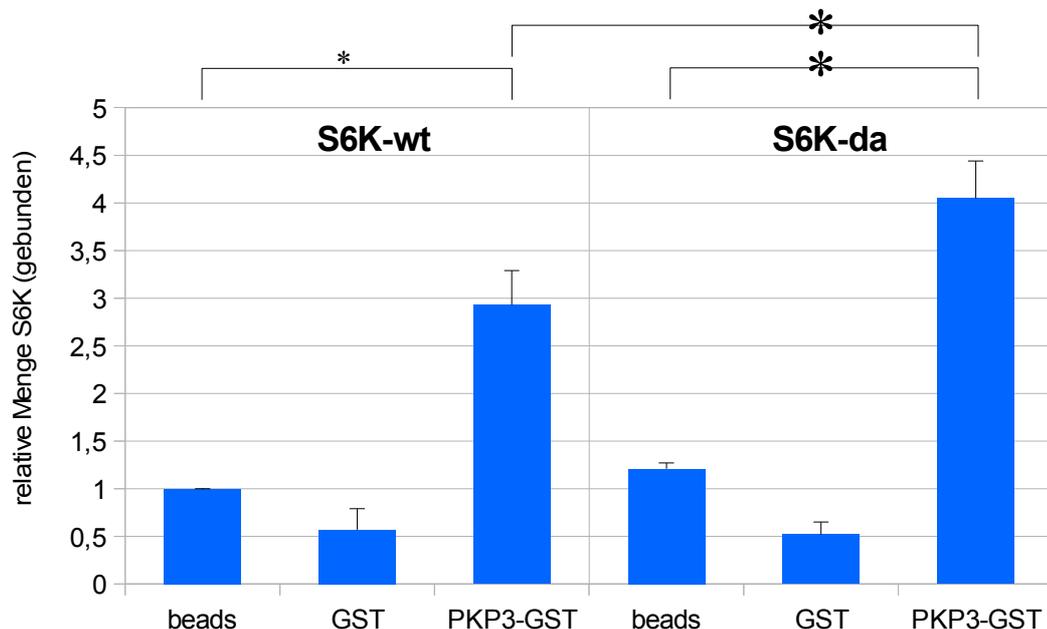


Abbildung 6: PKP3 interagiert mit der p70-S6-Kinase, insbesondere zeigt sich eine Präferenz für die dominant aktive p70-S6-Kinase gegenüber dem Wildtyp. Um S6K-wt und S6K-da vergleichen zu können, wurden die Grauwerte der S6K-Eluat-Banden digitalisiert, mit dem jeweiligen S6K-Input relativiert und am beads-Kontrollansatz normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Auf Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen t-Test geprüft * $p < 0,05$.

4.1.2 Interaktion von PKP3 mit der p70-S6-Kinase im zellulären Kontext

Für die *in vitro* gefundene Interaktion von PKP3 mit der p70-S6-Kinase wurden bakteriell exprimierte Proteine verwendet. Bei bakterieller Expression kann eine Fehlfaltung der Proteine nicht ausgeschlossen werden. Ebenso fehlt eine posttranslationale Modifikation wie in eukaryotischen Zellen. Daher kann es zu einem unphysiologischen Interaktionsverhalten kommen. Um diese Möglichkeit zu eliminieren und die Interaktion in einem physiologischen Milieu zu untersuchen, wurde die Interaktion der p70-S6-Kinase mit PKP3 in einem eukaryotischen Zellsystem untersucht. Da das Vorkommen beider Proteine im selben subzellulären Kompartiment Voraussetzung für eine physiologische Interaktion ist, wurde die subzelluläre Lokalisation und Interaktion mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation untersucht (BiFC, siehe Abschnitt 3.2.4). Dazu wurden zwei Zelllinien verwendet, die sich in der Anzahl der ausgebildeten Desmosomen unterscheiden. HeLa-Zellen bilden vergleichsweise wenige Desmosomen aus, wogegen MCF-7-Zellen zahlreiche Desmosomen aufweisen. Eine Interaktion von PKP3 und S6-Kinase wurde somit in Zellsystemen mit unterschiedlichen Expressionsleveln an desmosomalen Proteinen untersucht. HeLa- und MCF-7-Zellen wurden mit Plasmiden ko-transfiziert, die für Fusionsproteine aus PKP3 bzw. p70-S6-Kinasen und je einem komplementären Fragment des EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) V1 bzw. V2 codieren. Um die *in vitro* beobachtete Präferenz von PKP3 für die aktive Form der Kinase zu untersuchen, wurden V2-Konstrukte mit dem Wildtyp, der dominant aktiven und dominant negativen Variante der p70-S6-Kinase gebildet. Es wurde die gleiche dominant aktive Mutante (S6K-da) wie im GST-pulldown verwendet. Im Gegensatz zum GST-pulldown (siehe Abschnitt 3.1.1) sind in eukaryotischen Zellen upstream-Kinasen der p70-S6-Kinasen vorhanden, weshalb angenommen werden kann, dass die überexprimierte Wildtyp-Kinase *in vivo* teils phosphoryliert und teils unphosphoryliert vorliegt. Um Interaktionen von PKP3 mit der unphosphorylierten Kinase zu untersuchen, wurde zusätzlich die dominant negative Variante (S6K-dn) verwendet, die infolge einer Mutation (T389 --> A) konstitutiv inaktiv ist (Magnuson *et al.*, 2012). Das V1-PKP3-Fusionsproteine trägt einen FLAG-tag und die verwendeten V2-S6K-Fusionsproteine enthalten einen HA-tag, um mittels Immunofluoreszenz (siehe Abschnitt 3.2.3) eine erfolgreiche Ko-Transfektion unabhängig vom BiFC-Signal erkennbar zu machen. Wenn die zu untersuchenden Proteine ko-lokalisieren und interagieren, komplementieren sich V1- und V2-Fragment und bilden einen fluoreszierenden Komplex, der detektiert werden kann (Abbildung 7). Bei der Dokumentation des YFP-Signals bzw. der Immunofluoreszenzsignale wurden jeweils identische Belichtungszeiten verwendet um die Intensitäten der YFP-Signal vergleichen zu können. Die Bildbearbeitung erfolgte ebenfalls identisch.

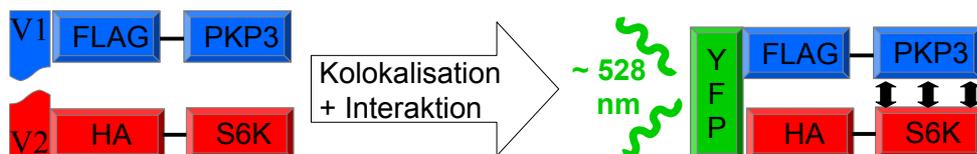


Abbildung 7: Schematische Darstellung des BiFC-Prinzips.

Aus Abbildung 8 ist ersichtlich, dass das V1-FLAG-PPK3-Fusionsprotein und die V2-HA-S6K-Fusionsproteine in den betrachteten Zellen in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden. In allen untersuchten Zellen zeigt PPK3 zusammen mit der dominant aktiven S6-Kinase das stärkste YFP-Signal und mit dem Wildtyp ein geringfügig schwächeres Signal. Mit der dominant negativen S6-Kinase wird kaum ein YFP-Signal detektiert.

Bei den deutlichen YFP-Signalen für die Wildtyp- und dominant aktive Kinase kann auf eine *in vivo*-Interaktion mit PPK3 geschlossen werden. Das schwache YFP-Signal mit der dominant negativen Kinase spricht nicht zwingend für eine physiologisch vorhandene Interaktion. Die Überexpression der untersuchten Proteine kann zu einer inadäquaten Proteinsortierung und einer unphysiologischen Kollokalisierung führen. Zudem verläuft die Komplementation des fluoreszierenden EYFP wesentlich schneller als dessen Zerfall (Kerppola, 2008), wodurch das einmal komplementierte EYFP den Fusionsproteinkomplex stabilisiert. Das zufällige Aufeinandertreffen von V1- und V2-Proteinen kann daher mit einer geringen Rate auch unabhängig von einer spezifischen Interaktion ein YFP-Signal verursachen. Insgesamt fällt auf, dass PPK3 präferentiell mit den aktiven Varianten der p70-S6-Kinase interagiert.

Das V1-FLAG-PPK3-Fusionsprotein zeigt die bekannte duale Lokalisation im Zytoplasma und an den Zellgrenzen (Bonné *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999), im Kernbereich ist das Signal prinzipiell ausgespart. Vergleicht man die Lokalisation von V1-FLAG-PPK3, fallen bei Betrachtung aller ausgewerteten Zellen Unterschiede in der PPK3-Verteilung auf den zytoplasmatischen Pool bzw. desmosomalen Pool auf. Diese Lokalisationsunterschiede sind von der Aktivität der ko-exprimierten Kinase abhängig. Bei Ko-Expression mit der dominant aktiven S6-Kinase ist V1-FLAG-PPK3 im Zytoplasma diffus verteilt und lokalisiert weniger an den Zellgrenzen. Dagegen ist V1-FLAG-PPK3 bei Ko-Expression mit der dominant negativen S6-Kinase im Zytoplasma nur punktuell verteilt und lokalisiert vermehrt entlang der Zellgrenzen. Bei Ko-Expression mit dem Wildtyp der S6-Kinase zeigt V1-FLAG-PPK3 ein Verteilungsmuster, das einem Mischbild aus beiden beschriebenen gegensätzlichen Verteilungsmustern entspricht. Umso höher der Anteil aktiver p70-S6-Kinase ist, desto größer ist der Anteil von V1-FLAG-PPK3 im Zytoplasma und desto geringer ist das Vorkommen entlang der Zellgrenzen. Das V2-HA-S6K-Fusionsprotein lokalisiert unabhängig von seiner Aktivität diffus zytoplasmatisch. Das Vorkommen im Kernbereich erscheint abhängig von der Aktivität der p70-S6-Kinase. Der Wildtyp und die dominant aktive S6-Kinase lokalisieren sowohl im Zytoplasma, als auch im Kernbereich ähnlich stark. Die dominant negative S6-Kinase lokalisiert schwach im Kernbereich. Das gefundene Lokalisationsverhalten der p70-S6-Kinase stimmt mit den von Rosner und Hengstschläger publizierten Daten überein. Aus diesen geht hervor, dass die T389-Phosphorylierung der p70-S6-Kinase eine nukleäre Lokalisation begünstigt, bzw. die T389-Dephosphorylierung zu einer zytosolischen Lokalisation führt (Rosner und Hengstschläger, 2011). Da sowohl V1-FLAG-PPK3 als auch die V2-HA-S6K-Fusionsproteine wie in der Literatur beschrieben lokalisieren, ist nicht davon auszugehen, dass die Lokalisation und Interaktion der Fusionsproteine durch Fehlfaltung, Protein-tags oder die EYFP-Fragmente unphysiologisch beeinflusst werden.

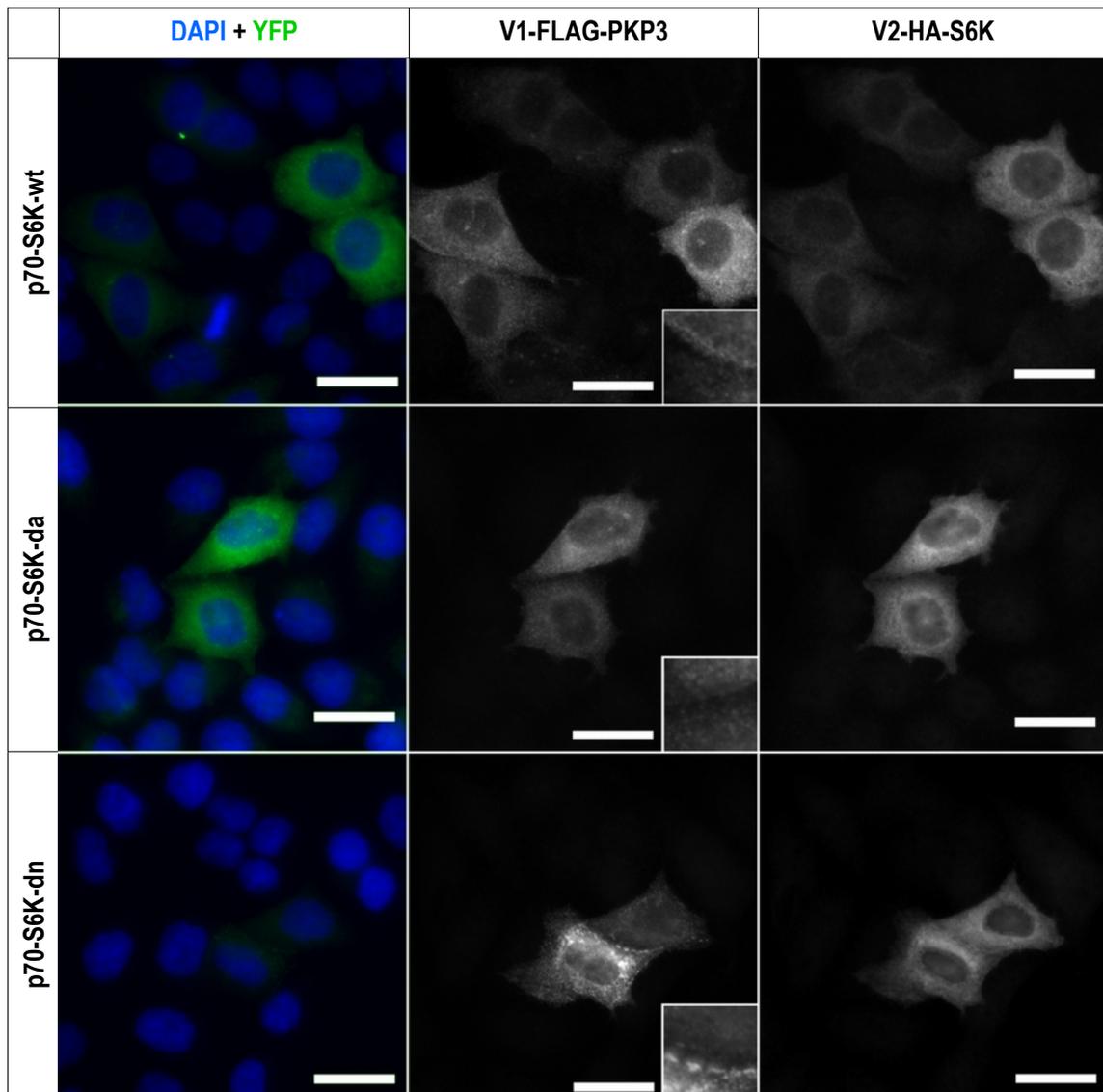


Abbildung 8: Hinweis auf Ko-lokalisierung und Interaktion von PKP3 mit p70-S6Kinase durch BiFC im HeLa-Zellsystem. Nach Ko-Transfektion von HeLa-Zellen wurden V1-FLAG-PPK3 und die V2-HA-S6K-Fusionsproteine exprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in Formaldehyd fixiert und mit α -FLAG- sowie α -HA-Antikörpern markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m, das Vergrößerungsfenster entspricht 8 μ m.

Um die vermutete Lokalisationsänderung genauer zu untersuchen, wurden im folgenden MCF-7-Zellen zur BiFC-Analysen benutzt (Abbildung 9). MCF-7-Zellen bilden prominentere Desmosomen als HeLa-Zellen aus und bilden kaum unphysiologische Proteinaggregate nach Überexpression von PKP3.

Da PKP3 und die jeweilige S6-Kinase in vergleichbaren Mengen exprimiert werden, ist ein Vergleich des BiFC-Signals möglich. Das deutliche YFP-Signal von S6-K-Wildtyp und dominant aktiver Kinase bestätigen die Beobachtung, dass PKP3 *in vivo* bevorzugt mit aktiver S6-Kinase interagiert. Eine Interaktion von PKP3 mit der dominant negativen Kinase konnte nicht nachgewiesen werden. Die aktiven S6-Kinasen lokalisieren auch schwach an der Zellmembran, was eine untypische Lokalisation der p70-S6-Kinase ist. Der PKP3-S6K-Komplex wurde womöglich infolge der EYFP-Komplementation stabilisiert und

nachfolgend beide Proteine gemeinsam an die Zellmembran transportiert. Da S6K-wt, -da und -dn nach alleiniger Expression der jeweiligen Konstrukte kaum in Zellmembrannähe lokalisieren, ist die bevorzugte Interaktion im Zytoplasma anzunehmen. Zu einer bevorzugten Interaktion mit der aktiven S6-Kinase passt, dass die S6K-dn auch bei V1-FLAG-PPK3-Ko-Expression weniger membranständig lokalisiert als die S6K-da.

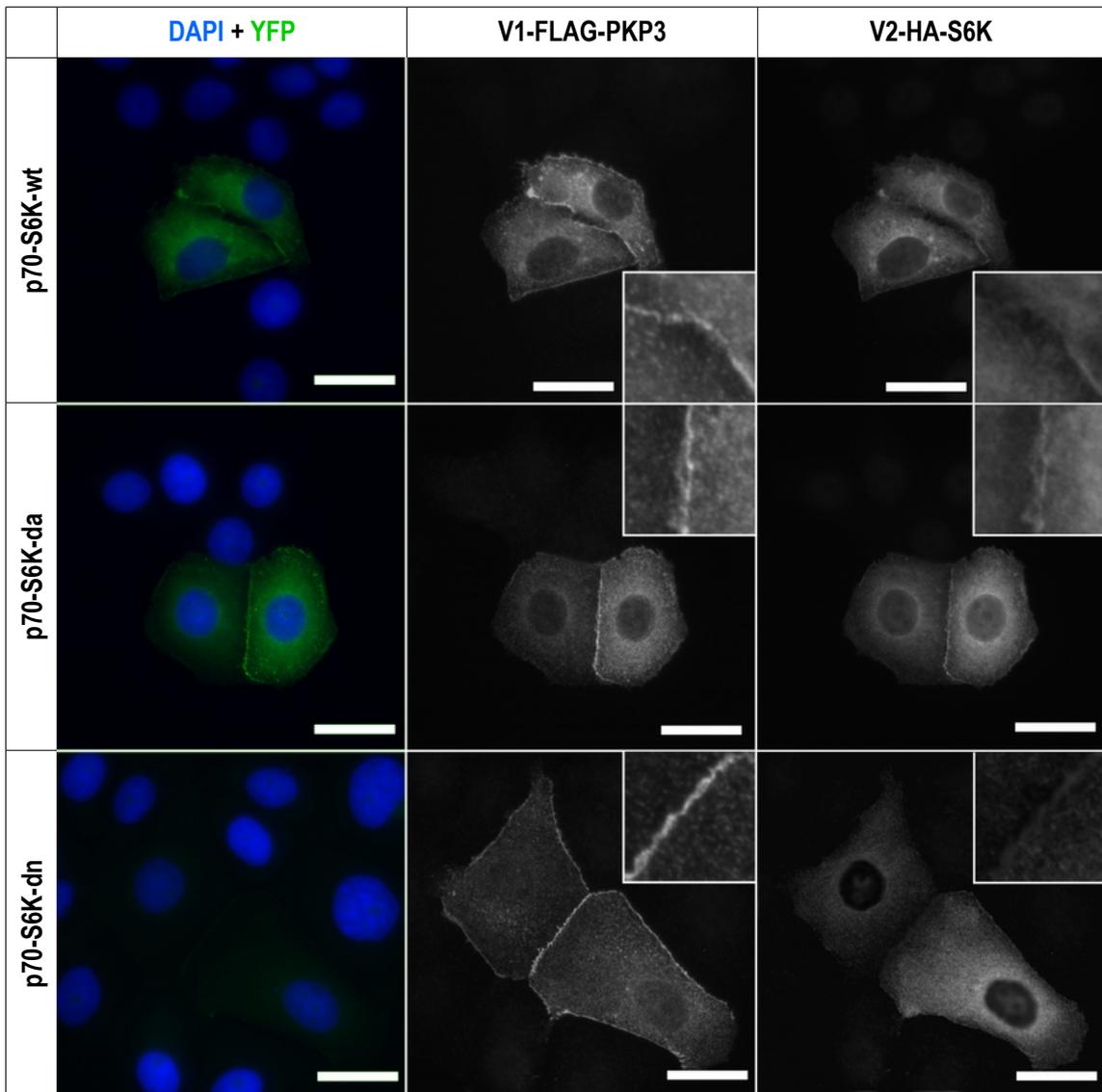


Abbildung 9: Hinweis auf Ko-lokalisierung und Interaktion von PKP3 mit p70-S6Kinase durch BiFC im MCF-7-Zellsystem. Nach Ko-Transfektion von MCF-7-Zellen wurden V1-FLAG-PPK3 und die V2-HA-S6K-Fusionsproteine exprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in Formaldehyd fixiert und mit α -FLAG- sowie α -HA-Antikörpern markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m, das Vergrößerungsfenster entspricht 8 μ m.

Der Wildtyp und die dominant aktive S6-Kinase kommen im Kernbereich und im Zytoplasma in ähnlichen Anteilen vor. Die dominant negative S6-Kinase lokalisiert im Zytoplasma, der Kernbereich ist weitestgehend ausgespart, was auch in der Literatur gezeigt wurde (Rosner und Hengstschläger, 2011).

Das PKP3-Fusionsprotein zeigt auch in MCF-7-Zellen die bekannte duale zytoplasmatische und desmosomale Lokalisation (Bonné *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). Eine nukleäre PKP3-Lokalisation wurde nicht beobachtet. V1-FLAG-PKP3 kommt bei Ko-Expression mit S6K-da im Vergleich zu S6K-dn deutlich stärker diffus zytoplasmatisch und weniger an der Zellmembran vor. Bei stärkerer Vergrößerung fällt auf, dass PKP3 in den mit S6K-da ko-transfizierten Zellen nur punktuell bzw. diskontinuierlich entlang der Zellgrenzen vorkommt.

Die duale Lokalisation von PKP3 ist dagegen bei Ko-Expression von S6K-dn wesentlich stärker desmosomal, die Vergrößerung zeigt ein verdichtetes, kontinuierlicheres Muster entlang der Zellgrenzen. Der zytoplasmatische PKP3-Anteil ist im Vergleich gering. Bei Ko-Expression der S6K-wt liegt der zytoplasmatische und desmosomale PKP3-Anteil jeweils zwischen den beschriebenen Extremen.

Die Tatsache, dass PKP3 und die p70-S6-Kinasen wie in der Literatur beschrieben lokalisieren, lässt ein physiologisches Interaktionsverhalten der exprimierten Fusionsproteine im MCF-7-Zellsystem vermuten. Die BiFC-Daten aus dem HeLa-Zellsystem konnten somit bestätigt werden.

4.2 Einfluss der Phosphorylierung auf die Lokalisation von PKP3

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Phosphorylierung auf die Lokalisation von PKP3 untersucht. Da für Plakophilin 1 eine Lokalisationsänderung nach Phosphorylierung bekannt ist (Wolf *et al.*, 2013) wurde ein ähnlicher Effekt für Plakophilin 3 vermutet. Da die PKP3-Lokalisation durch die Expression der p70-S6-Kinase im BiFC-Versuch (Abschnitt 3.1.2) beeinflusst wird und eine Interaktion *in vivo* und *in vitro* (Abschnitt 3.1.1) bestätigt wurde, kann eine direkte Interaktion im Sinne einer Enzym-Substrat-Beziehung angenommen werden. Insbesondere die präferentiellen Interaktionen von PKP3 mit der aktiven Form der Kinase stützten diese Vermutung. Mithilfe eines *in vitro*-Kinase-assay, der in der AG Hatzfeld durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass die p70-S6-Kinase PKP3 phosphoryliert (persönliche Korrespondenz Dr. Annika Wolf).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Phosphorylierung bzw. Hypophosphorylierung von PKP3 nachgeahmt, um eine phosphorylierungsabhängige Lokalisation zu untersuchen, wie sie aufgrund der BiFC-Daten vermutet wird. Um die physiologische Relevanz einer möglichen S6K-vermittelten Phosphorylierung von PKP3 untersuchen zu können, muss zunächst die Phosphorylierungsstelle gefunden werden. Um putative S6K-vermittelte Phosphorylierungsstellen zu identifizieren, wurden drei Datensätze ausgewertet und verglichen:

a) in Massenspektrometrie-Studien gefundene Phospho-Serin-Reste (Datenbankzugriff über: <http://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=3262&showAllSites=true>; Tabelle 9)

b) GPS 3.0-Algorithmus auf Grundlage des S6K-Konsensusmotives (Datenbankzugriff über: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y446> und <http://gps.biocuckoo.org/online.php>; Tabelle 10)

c) Peptid-Kinase-Assay (persönliche Korrespondenz Dr. Wolf, Kooperation mit Prof. Schutkowski, Tabelle 11)

Unter Berücksichtigung der Hefe-2-Hybrid-Daten, die auf eine präferentielle Interaktion der p70-S6-Kinase mit der PKP3-Kopf-Domäne hindeuten, wurden zwei Motive aus putativen Serin-Resten in der Kopf-Domäne und ein drittes Motiv im ersten ARM-repeats ausgewählt: 1. Motiv: S134/135; 2. Motiv S280/283/285; 3. Motiv S313/314. Die im Hefe-2-hybrid-assay verwendete Kopf-Domäne (AS 1 bis 342) schließt den ersten ARM-repeat mit ein und beinhaltet deshalb alle drei Motive. Es fällt auf, dass die ausgewählten Motive in Säugetieren phylogenetisch konserviert sind (Tabelle 12).

Serin	Literaturnachweise
S 134	Moritz <i>et al.</i> , 2010
S 183	Zanivan <i>et al.</i> , 2008
S 185	Zanivan <i>et al.</i> , 2008
S 196	Zanivan <i>et al.</i> , 2008
S 280	Klammer <i>et al.</i> , 2012
S 283	Nishioka <i>et al.</i> , 2012
S 285	Kettenbach <i>et al.</i> , 2011
S 313	Chen <i>et al.</i> , 2009
S 314	Beausoleil <i>et al.</i> , 2006

Tabelle 9: Mittels Massenspektrometrie ermittelte Serin-Phosphorylierungen.

Konsensusmotiv der p70-S6-K	R X X S
Sequenzen in Plakophilin 3	R R L S¹³⁴
	R L S S¹³⁵
	R Q A S²²⁰
	R A P S²⁸⁰
	R S L S²⁸⁵
	R L S S³¹⁴

Tabelle 10: Vorhersage putativer Phosphorylierungsstellen mit dem GPS 3.0-Algorithmus. Für die PKP3-Sequenz (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y446>) wurden Vorhersagen unter Berücksichtigung des Konsensus-Motives der p70-S6-Kinase getroffen. Die aufgeführten Serin-Reste haben bei allen Isoformen der p70-S6-Kinase einen Vorhersagewert, der mindestens dem doppelten cut-off-Wert entspricht.

121-135	S R S A V D L S C S <u>R R</u> L S¹³⁴ S¹³⁵
186-200	L G P G G L D D <u>R Y</u> S¹⁹⁶ L V S E
211-225	R A F A Y E <u>R Q A</u> S²²⁰ S S S S R
271-285	V L E P V A <u>R A P</u> S²⁸⁰ V <u>R</u> S²⁸³ L S²⁸⁵
306-320	H R T L Q <u>R L</u> S³¹³ S³¹⁴ G F D D I D
526-540	N A V C V L <u>R</u> N L S⁵³⁵ Y R L Y D

Tabelle 11: Screening auf putative Phosphorylierungsstellen mittels Kinase-Peptid-Assay. Plakophilin 3-Peptide wurden durch die p70-S6-Kinase phosphoryliert und mittels radioaktiv markierten Phosphatgruppen detektiert.

	AS	1. Motiv S134/135
<i>homo sapiens</i>	119	W S S R S A V D L S C S R R L S S A H N
<i>mus musculus</i>	119	W S S R S A V D L T C S R R L S S A H N
<i>rattus norvegicus</i>	119	W S S R S A V D L T C S R R L S S A H N
<i>xenopus laevis</i>	126	Y S S R S A V D I G G T Q R I S V A S Q
		2. Motiv S280/283/285
<i>homo sapiens</i>	261	G A V L E P V A R A P S V R S L S L S L
<i>mus musculus</i>	261	G A G L E P V A R A P S V R S L S L S L
<i>rattus norvegicus</i>	261	G A G L E P V A R A P S V R S L S L S L
<i>xenopus laevis</i>	291	T N M M G H N S R A P S V R S L A E S G
		3. Motiv S313/314
<i>homo sapiens</i>	302	S Y G S H R T L Q R L S S G F D D I D L
<i>mus musculus</i>	302	S Y T G H R T L Q R L S S G F D D I D L
<i>rattus norvegicus</i>	302	S Y T G H R T L Q R L S S G F D D I D L
<i>xenopus laevis</i>	320	G N K S L M S Q H S F T S G F D D M D M

Tabelle 12: Die ausgewählten Einzelmotive sind in Säugern speziesübergreifend konserviert (Bonné et al., 2003).

Um zu untersuchen, ob die PKP3-Phosphorylierung durch die p70-S6K direkt für die in der BiFC gefundene PKP3-Lokalisationsänderung verantwortlich ist, wurden durch Mutagenese (siehe Abschnitt 3.1.1) veränderte PKP3-Sequenzen erzeugt. Durch die Nachahmung einer konstitutiven Phosphorylierung konnte selbige unter stabilen Bedingungen untersucht werden. Die Serin-Reste der genannten Motive wurden in der PKP3-Sequenz gezielt mutiert, sodass eine Phosphorylierung nicht möglich ist (S --> A) oder durch eine Phosphomimic-Mutation konstitutiv imitiert wird (S-->E, sog. Phosphomimic, siehe Abbildung 10). Zusätzlich wurde ein PKP3-Klon generiert, in dem alle Motive mutiert waren (Komplettmotiv), um einen denkbaren kooperativen Effekt infolge der PKP3-Phosphorylierung zu erfassen (siehe Tabelle 13). Mit den so erzeugten PKP3-Klonen wurden HeLa- und MCF-7-Zellen transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.2). 24 h und 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Die transfizierten Plasmide enthielten neben der entsprechend mutierten PKP3-Sequenz noch eine für das fluoreszierende GFP bzw. DsRed kodierende Sequenz. Um die in der BiFC (Abschnitt 3.1.2) beobachtete PKP3-Lokalisation entlang der Zellgrenzen einer Art von Zellkontakten zuzuordnen, wurde Aktin als Marker für *adherens junctions* angefärbt bzw. Desmoplakin I und II als Desmosomenmarker (Schwarz et al., 1990) mittels Immunofluoreszenz (siehe Abschnitt 3.2.3) markiert.

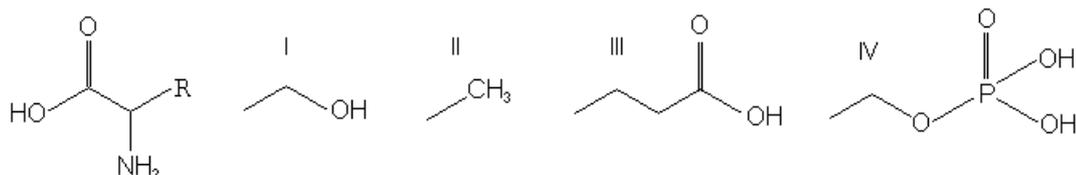


Abbildung 10: Strukturformeln ersetzter Aminosäuren. Gezeigt sind die variablen Reste (R) der Aminosäuren: I Serin; II Alanin als unphosphorylierbarer Rest; III Glutamat als negativ geladener Phosphomimic-Rest; IV negativ geladenes Phospho-Serin.

	PKP3-Klone	Sequenz
1. Motiv S134/135	PKP3-1A	C S R R L A A A H N G G
	PKP3-1E	C S R R L E E A H N G G
2. Motiv S280/283/285	PKP3-2A	V A R A P A V R A L A L
	PKP3-2E	V A R A P E V R E L E L
3. Motiv S313/314	PKP3-3A	L Q R L A A G F D D I D
	PKP3-3E	L Q R L E E G F D D I D
Komplettmotiv S134/135/280/283/285/313/ 314	PKP3-123A	C S R R L A A A H N G G ...
		V A R A P A V R A L A L ...
		L Q R L A A G F D D I D
	PKP3-123E	C S R R L E E A H N G G ...
		V A R A P E V R E L E L ...
		L Q R L E E G F D D I D

Tabelle 13: Übersicht über die generierten PKP3-Klone. Die mutierten Aminosäuren und die für das S6K-Konsensusmotiv relevanten Arginine sind hervorgehoben, unmutierte Sequenzabschnitte sind angedeutet.

Bezüglich des Kern/Zytoplasma-Verhältnisses, der Ausbildung von Desmosomen und den vorkommenden Proteinaggregaten zeigten sich die 48 h nach Transfektion fixierten Zellen gegenüber den 24-h-Bildern überlegen (Abbildung 11). Zur besseren Beurteilung der PKP3-Lokalisation wurden die Zellen im Folgenden nach 48 h fixiert.

Im exprimierten GFP-PKP3-Fusionsprotein befindet sich das fluoreszierende GFP am N-Terminus von Plakophilin 3. Da viele bekannte Interaktionen durch die Kopf-Domäne von PKP3 vermittelt werden (Bonne *et al.*, 2003) und auch die mutierten Motive eher N-terminal liegen, wurde für weitere Lokalisationsstudien das C-terminale DsRed-Fusionsprotein verwendet, um mögliche Interaktionen nicht zu beeinträchtigen.

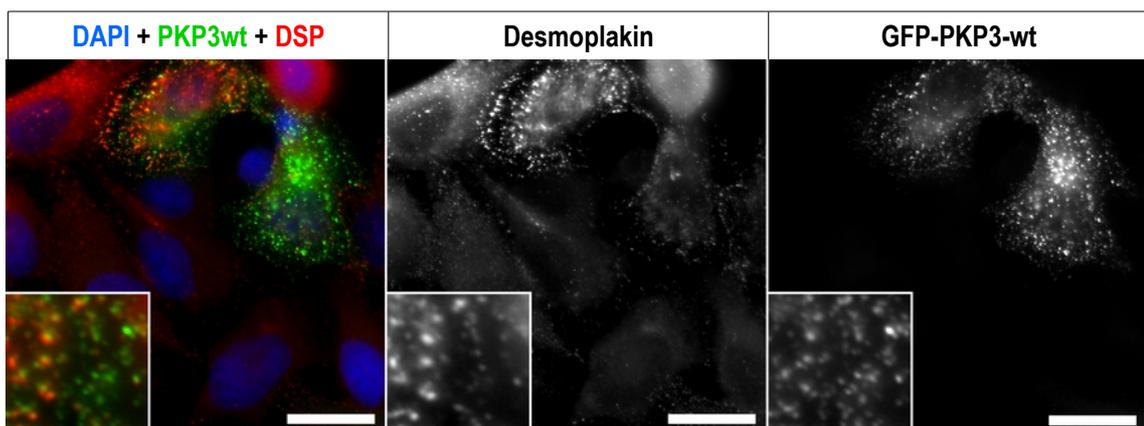


Abbildung 11: GFP-PKP3-wt mit Desmoplakin-Färbung. HeLa-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit Methanol fixiert und Desmoplakin I und II immunofluoreszent markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 8µm.

4.2.1 Aktinfilamente in HeLa-Zellen nach Transfektion der PKP3-Mutanten

Wie in Abbildung 12 dargestellt, lokalisiert PKP3 48 h nach Transfektion stärker entlang der Zellgrenzen und liegt im Zytoplasma punktuell verteilt vor. Die Organisation der Aktinfilamente wird durch die Überexpression von PKP3 oder die Phosphorylierung in den Einzelmotiven bzw. im Komplettmotiv nicht beeinflusst (aufgrund der schwachen Zell-Zellkontaktausbildung in HeLa-Zellen sind die Bilder nicht gezeigt, entsprechende Bilder mit MCF-7-Zellen werden in Abschnitt 3.2.4 behandelt)

Eine Ko-lokalisierung von Aktin und dem PKP3-Wildtyp konnte nicht beobachtet werden. Im Folgenden wurde deshalb der Einfluss der PKP3-Phosphorylierung auf die desmosomale Lokalisation bzw. die Ko-lokalisierung mit Desmoplakin I und II untersucht.

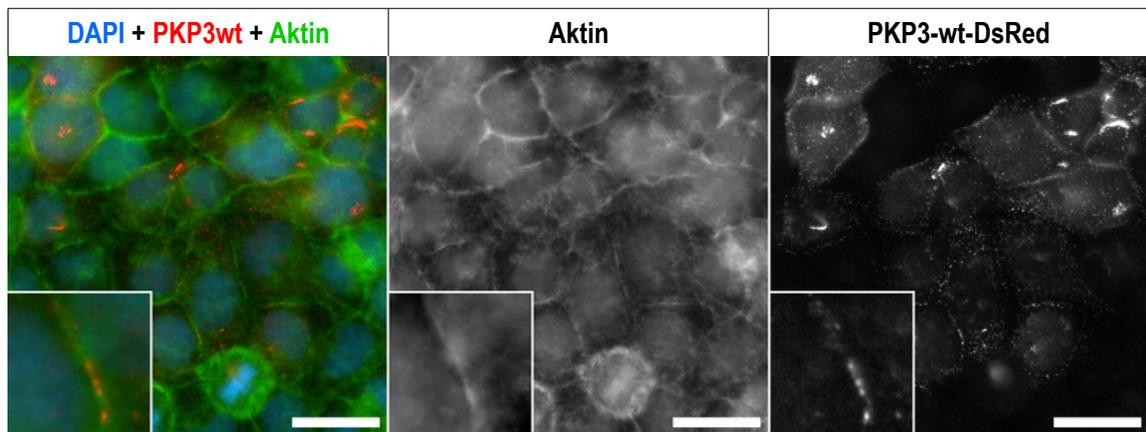


Abbildung 12: PKP3-wt-DsRed mit Aktin-Färbung. HeLa-Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit 3,7% Formaldehyd fixiert und mittels Phalloidin-gekoppelten Farbstoff markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 8µm.

4.2.2 Lokalisation von DSP und den PKP3-Mutanten in HeLa-Zellen

Ein möglicher Einfluss der Phosphorylierung auf die Lokalisation von PKP3 wurde zunächst im HeLa-Zellsystem untersucht. Die Zellen wurden dazu mit dem PKP3-Wildtyp transfiziert, um den Effekt der PKP3-Überexpression zu untersuchen und dann mit einem möglichen Effekt der PKP3-Mutanten vergleichen zu können. Um eine desmosomale Lokalisation von PKP3 zu erfassen, wurde Desmoplakin mittels Immunofluoreszenz analysiert.

Im HeLa-Zellsystem (Abbildung 13) lokalisiert PKP3 im Zytoplasma diffus sowie in vereinzelt Granula. Die desmosomale Lokalisation ist im Vergleich zum zytoplasmatischen PKP3-Pool gering. Das exogene PKP3 bildet im Vergleich zur Ko-Expression im BiFC-Versuch bei alleiniger Überexpression vermehrt Proteinaggregate in Zellkernnähe. Aufgrund dieser subzellulären Lokalisation ist es denkbar, dass diese Proteinaggregate dem rauen endoplasmatischen Retikulum bzw. Golgi-Apparat zuzuordnen sind, deren Sortierungs- und Transportfunktion infolge der Überexpression wahrscheinlich nicht mehr adäquat erfüllt wird.

Desmoplakin markiert in untransfizierten Zellen zarte, vereinzelte Desmosomen und kommt zytoplasmatisch eher diffus als in Granula vor. In transfizierten Zellen kommt weniger Desmoplakin an den

Zellgrenzen vor und es lokalisiert vermehrt in zytoplasmatischen Granula, besonders stark in kernnahen Proteinaggregaten. Eine Rekrutierung von Desmoplakin an die Zellgrenzen infolge PKP3-Überexpression, wie sie für MCF-7-, HCT-8- und COS-Zellen beschrieben wurde (Bonné *et al.*, 2003), konnte im HeLa-Zellsystem nicht gefunden werden. In transfizierten Zellen ko-lokalisiert DSP mit dem exogenen PKP3.

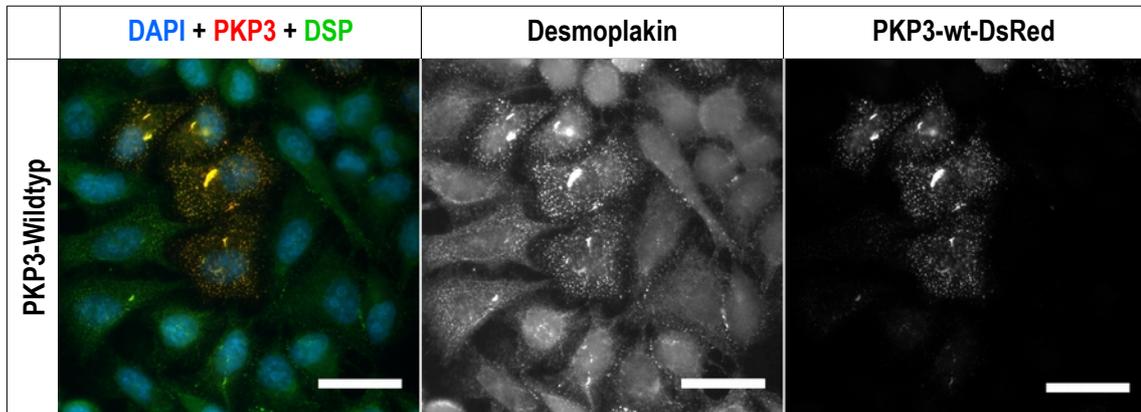


Abbildung 13: PKP3-Wildtyp mit Desmoplakin in HeLa-Zellen. 48 h nach Transfektion erfolgte die Fixierung mit Methanol, anschließend wurden Desmoplakin I und II immunofluoreszent markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

Bei PKP3-Überexpression werden gegenüber den untransfizierten Zellen kaum Desmosomen ausgebildet. In den Zellen mit exogenem PKP3-2A, PKP3-3A und PKP3-123A ist die Desmosomenausbildung tendenziell weniger beeinträchtigt (Abbildungen 14 und 15). Die vermehrt desmosomale Lokalisation findet sich bei den genannten PKP3-Mutanten auch in den Lokalisationsstudien mit Aktinfärbung, was für die Spezifität der PKP3-Lokalisation spricht.

Eine Desmoplakinrekrutierung an die Zellgrenzen nach PKP3-Überexpression, wie sie für MCF-7-, HCT-8- und COS-Zellen beschrieben wurden (Bonné *et al.*, 2003), trat in den verwendeten HeLa-Zellen nicht auf. Möglicherweise werden Desmoplakin und das exogene PKP3 in HeLa-Zellen, die nur wenige Desmosomen ausbilden, nicht adäquat sortiert bzw. transportiert und bilden die beschriebenen Proteinaggregate.

Um die inadäquate Proteinsortierung als mögliche Ursache für die zytoplasmatische Ko-lokalisation von Desmoplakin mit PKP3 auszuschließen und die vermutete Rekrutierung von Desmoplakin zu den Desmosomen durch unphosphoryliertes PKP3 genauer zu untersuchen, wurden MCF-7-Zellen mit den PKP3-Mutanten transfiziert. MCF-7-Zellen charakterisieren sich im Unterschied zu HeLa-Zellen durch zahlreichere Desmosomen und einen physiologisch höheren Expressionsgrad an endogenem Plakophilin3 bzw. seinen desmosomalen Interaktionspartnern (Bonné *et al.*, 1999).

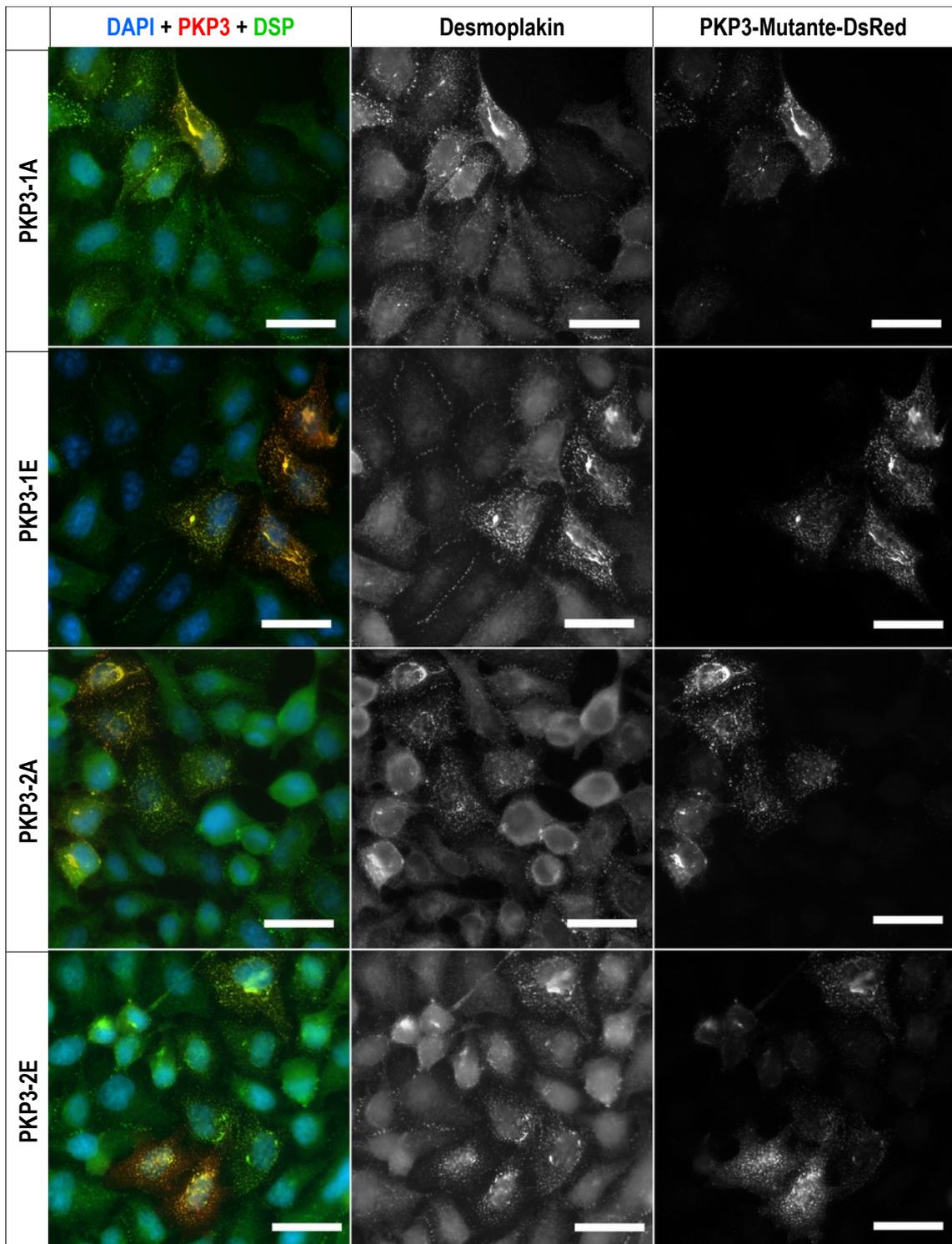


Abbildung 14: PKP3-1A/E und PKP3-2A/E mit Desmoplakin in HeLa-Zellen. 48 h nach Transfektion erfolgte die Fixierung mit Methanol, anschließend wurden Desmoplakin I und II immunofluoreszent markiert. Die mutierten PKP3-Sequenzen sind nach Motiv und mutierter Aminosäure benannt, z.B. PKP3-2E bezeichnet die Mutation der Serine des 2. Motives zu Glutamat (S280/283/285-->E). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

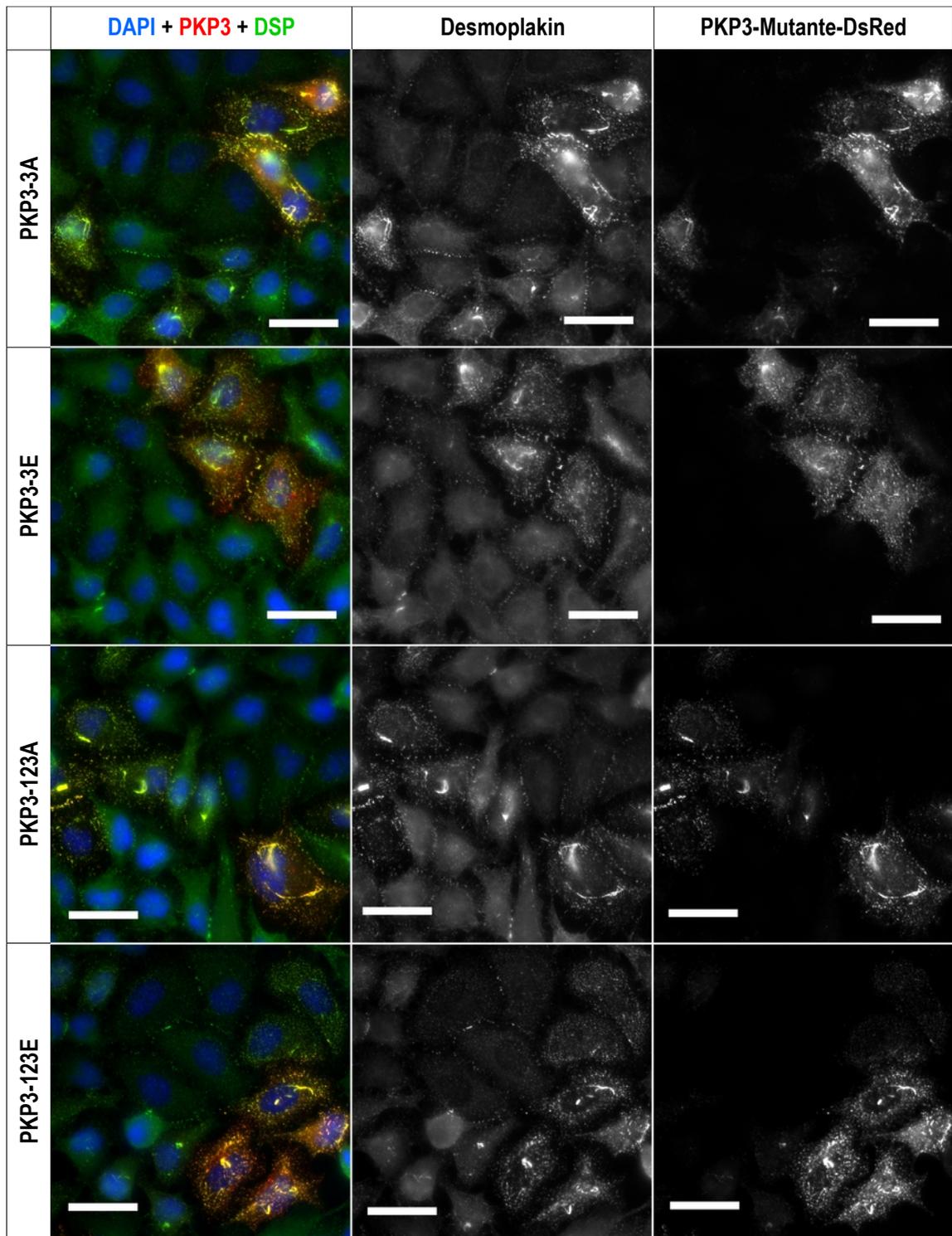


Abbildung 15: PKP3-3A/E und PKP3-123A/E mit Desmoplakin in HeLa-Zellen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in Methanol fixiert und anschließend Desmoplakin I und II immunfluoreszent markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

4.2.3 Lokalisation von DSP und den PKP3-Mutanten in MCF-7-Zellen

PKP3 lokalisiert stark desmosomal und geringfügig in zytoplasmatischen Granula (Abbildung 16). Desmoplakin kommt in untransfizierten Zellen diffus zytoplasmatisch und punktuell desmosomal vor, ist dagegen in Zellen mit exogenem PKP3-wt deutlich überwiegend desmosomal und in vereinzelt zytoplasmatischen Granula verteilt. In MCF-7-Zellen treten nach PKP3-Überexpression keine Proteinaggregate auf und DSP sowie PKP3 lokalisieren wie in der Literatur beschrieben (Bonné *et al.*, 1999, 2003). Die PKP3-wt-Expression stellt den isolierten Effekt der PKP3-Überexpression dar und dient somit als Vergleich für die PKP3-Mutanten.

Die Expression der PKP3-1A/E-Mutanten zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine wesentliche Lokalisationsänderung von PKP3 oder DSP (Abbildung 17). Die deutliche Ko-lokalisierung beider Proteine wird durch Mutation im 1. Motiv (PKP3-1A, PKP3-1E) nicht beeinflusst.

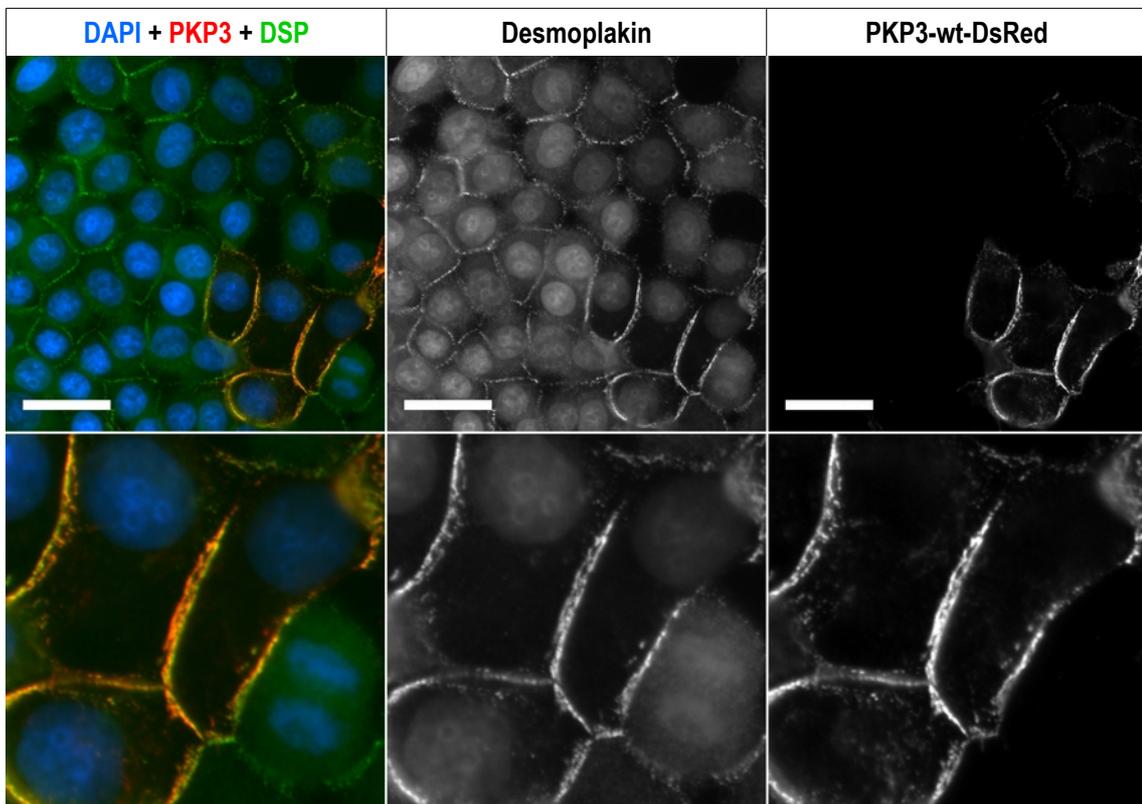


Abbildung 16: PKP3-Wildtyp mit Desmoplakin in MCF-7-Zellen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in Methanol fixiert und anschließend Desmoplakin I und II immunofluoreszent markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 32µm.

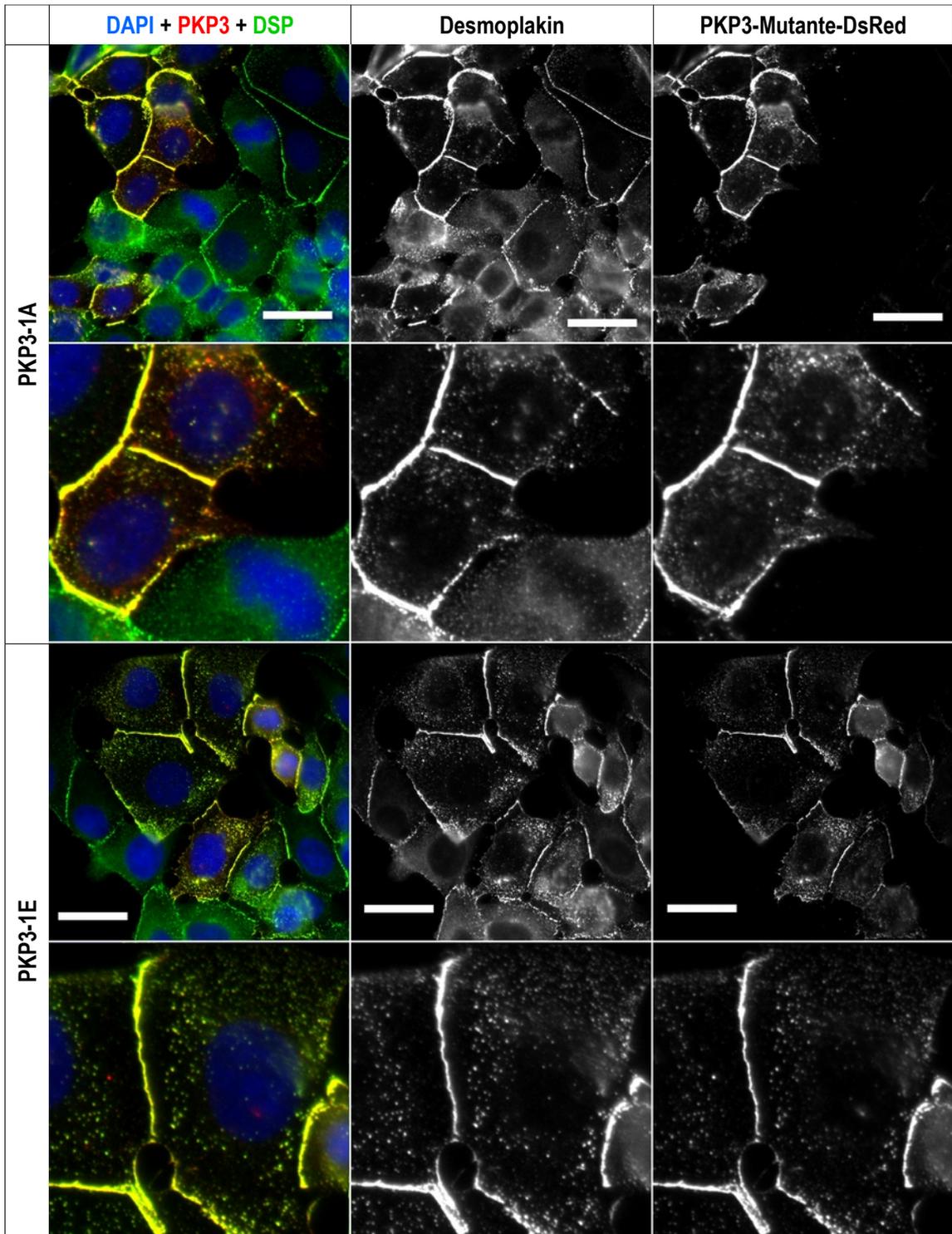


Abbildung 17: PKP3-1A/E mit Desmoplakin in MCF-7-Zellen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in Methanol fixiert und anschließend Desmoplakin I und II immunofluoreszent markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 32µm.

Die Phosphorylierung im zweiten PKP3-Motiv verursacht ein unterschiedliches Verteilungsmuster (Abbildung 18). Die bekannte duale PKP3-Lokalisation (Bonné *et al.*, 1999) ist bei imitierter Phosphorylierung deutlich zugunsten zytoplasmatischer Granula verändert. Diese Granula lokalisieren bandförmig um den Zellkern, jedoch weder in direkter Kernnähe noch zellmembrannah. Wie im HeLa-Zellsystem angedeutet, lokalisiert das im 2. Motiv unphosphorylierbare PKP3 in MCF-7-Zellen vermehrt desmosomal gegenüber der entsprechenden Phosphomimic-Mutante. PKP3-2A kommt entlang der Zellgrenzen deutlich kräftiger und in einem kontinuierlichen Muster vor, während PKP3-2E diskontinuierlich und dünn an den Zellgrenzen lokalisiert. Die Zellgrenzen der mit PKP3-2E transfizierten Zellen liegen einander nicht durchgehend an, sondern bilden größere Zellzwischenräume, was bei PKP3-2A nicht zu beobachten ist.

Dass die PKP3-Lokalisation auf inadäquater Proteinsortierung, bzw. -transport beruht, ist im Hinblick auf die unterschiedlichen Transfektions- bzw. PKP3-Expressionsgrade unwahrscheinlich, denn umso mehr exogenes PKP3-2A exprimiert wird, desto stärker erfolgt ein Proteintransport zu den Zellgrenzen.

Das endogene Desmoplakin lokalisiert desmosomal, diffus-zytoplasmatisch und in zytoplasmatischen Granula. Bei PKP3-2A-Expression lokalisiert Desmoplakin verstärkt an den Zellgrenzen, bei PKP3-2E-Expression zeigt sich eine schwache desmosomale Lokalisation, die mit untransfizierten Zellen vergleichbar ist. Eine PKP3-2E-Überexpression führt in den beobachteten Zellen also nicht zu einer vermehrten Desmoplakin-Rekrutierung bzw. Desmosomenausbildung, wie sie sonst bei PKP3-Überexpression beobachtet wurde (Bonné *et al.*, 2003). Der Anteil von Desmoplakin in Granula ist bei PKP3-2E-Expression erhöht, bei PKP3-2A mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Lokalisation von Desmoplakin folgt der desmosomalen bzw. zytoplasmatischen Lokalisation der Plakophilinmutante, wobei der diffus-zytoplasmatische Desmoplakinanteil bei Expression von PKP3-2A bzw. -E geringer als bei Überexpression des Wildtypes ist.

Desmoplakin ko-lokalisiert mit den PKP3-2-Mutanten, wohingegen PKP3-2A mit steigendem Expressionsgrad auch ohne Desmoplakin vorkommt.

Im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 16) fällt auf, dass PKP3 bei Phosphorylierung im 2. Motiv vermehrt zytoplasmatische Granula mit Desmoplakin bildet und kaum an den Zellgrenzen lokalisiert. Bei fehlender Phosphorylierung im 2. Motiv lokalisiert das überexprimierte PKP3 stärker in Desmosomen und weniger im Zytoplasma.

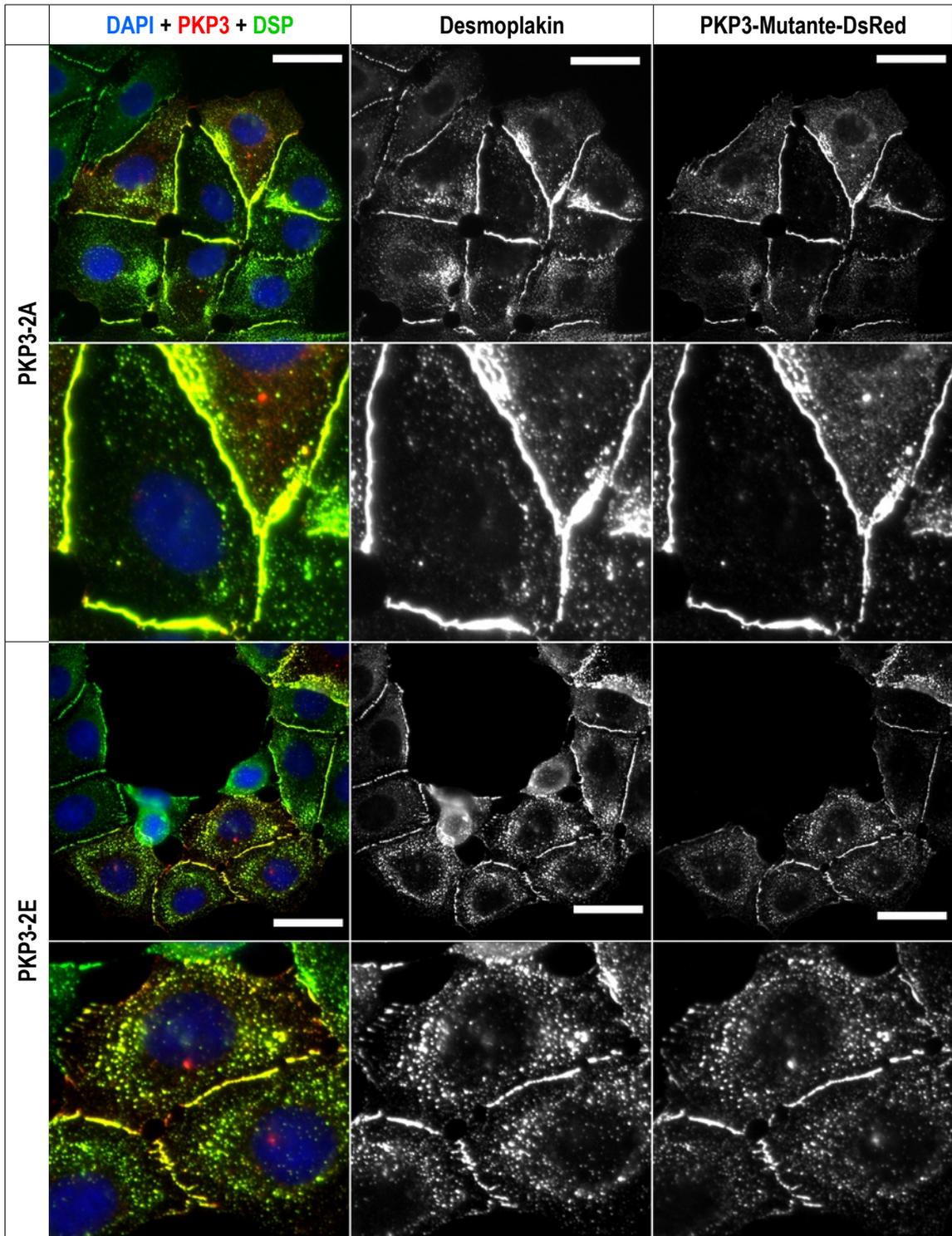


Abbildung 18: PKP3-2A/E mit Desmoplakin in MCF-7-Zellen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in Methanol fixiert und anschließend Desmoplakin I und II immunofluoreszent markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 32µm.

Aus Abbildung 19 ist ersichtlich, dass PKP3-3A stärker desmosomal lokalisiert als PKP3-3E, dessen Vorkommen größtenteils zytoplasmatisch ist. Der Effekt der imitierten Phosphorylierung im 3. Motiv ist tendenziell stärker ausgeprägt als der für das 2. Motiv beschriebene. Auch bei stärkerer Vergrößerung zeigt PKP3-3A eine kontinuierliche, kräftige Verteilung entlang der Zellgrenzen. Im Gegensatz dazu kommt PKP3-3E eher punktuell entlang der Zellmembran vor und zwischen den transfizierten Zellen entstehen größere Zellzwischenräume. Das überexprimierte PKP3-3E lokalisiert stärker in zytoplasmatischen Granula als die unphosphorylierbare Mutante. Die Granula kommen, wie bei PKP3-2E exprimierenden Zellen, im Zytoplasma weder in direkter Kernnähe noch zellmembrannah vor. PKP3-3A kommt bei starker Überexpression ringförmig perinukleär vor.

Umso mehr PKP3-3A die Zelle exprimiert, desto mehr verdichtet sich Desmoplakin an den Zellgrenzen, im Zytoplasma liegt Desmoplakin in wenigen Granula und ähnlich diffus wie in untransfizierten Zellen vor. Bei Expression von PKP3-3E ist der überwiegende Anteil an Desmoplakin in den Granula verteilt und es lokalisiert weniger desmosomal als in untransfizierten Zellen. Desmoplakin ko-lokalisiert mit beiden PKP3-3-Mutanten. PKP3-3A kommt jedoch bei starker Überexpression in ringförmig perinukleärem Muster ohne Desmoplakin vor.

Die PKP3-123A und -E-Mutanten (Abbildung 20) zeigen einen stärkeren Effekt als das 2. und 3. Motiv. Trotz des starken Effektes, scheint beim Komplettmotiv kein additiver Effekt des zweiten und dritten Einzelmotives vorzuliegen. PKP3-123A lokalisiert vorrangig desmosomal und kaum zytoplasmatisch, PKP3-123E genau entgegengesetzt. Die unphosphorylierte Mutante zeigt in der Vergrößerung eine kontinuierliche, starke Lokalisation entlang der Zellgrenzen und eine diffuse zytoplasmatische Verteilung, teilweise in vereinzelt Granula. Bei hohem Expressionsgrad liegt es weniger diffus und vermehrt in perinukleären Granula vor. PKP3-123E kommt überwiegend in zytoplasmatischen Granula vor, die aber kaum in Zellmembrannähe vorkommen. In der Vergrößerung ist das punktuelle Vorkommen an den Zellgrenzen erkennbar, das vereinzelt Desmosomen vermuten lässt. Desmoplakin kommt bei PKP3-123E-Expression kaum an den Zellgrenzen vor. Der weitaus überwiegende Anteil lokalisiert in den beschriebenen Granula. Auch bei geringem PKP3-123E-Expressionsgrad ist der desmosomale Anteil geringer als in untransfizierten Zellen. Bei PKP3-123A-Expression liegt Desmoplakin überwiegend desmosomal vor. Es werden nur wenige zytoplasmatische Granula ausgebildet. PKP3-123A/E und Desmoplakin ko-lokalisieren streng, keines der beiden Proteine kommt singulär vor. Auch die imitierte (Hypo-) Phosphorylierung aller drei Motive hat keinen Einfluss auf die DSP-PKP3-Interaktion.

Es fällt auf, dass PKP3-123A einzelne grobere Granula bildet, PKP3-123E dagegen zahlreiche feine Granula. Bei PKP3-123E-Expression entstehen wie beim 2. und 3. Einzelmotiv große Zellzwischenräume, die zwischen 2 und 14 µm groß sind. Bei PKP3-123A-Expression liegen zwei Nachbarzellen jeweils dicht an. Nach Überexpression des PKP3-Wildtyps und der PKP3-Mutanten werden weniger trizelluläre Kontakte beobachtet als zwischen untransfizierten Zellen.

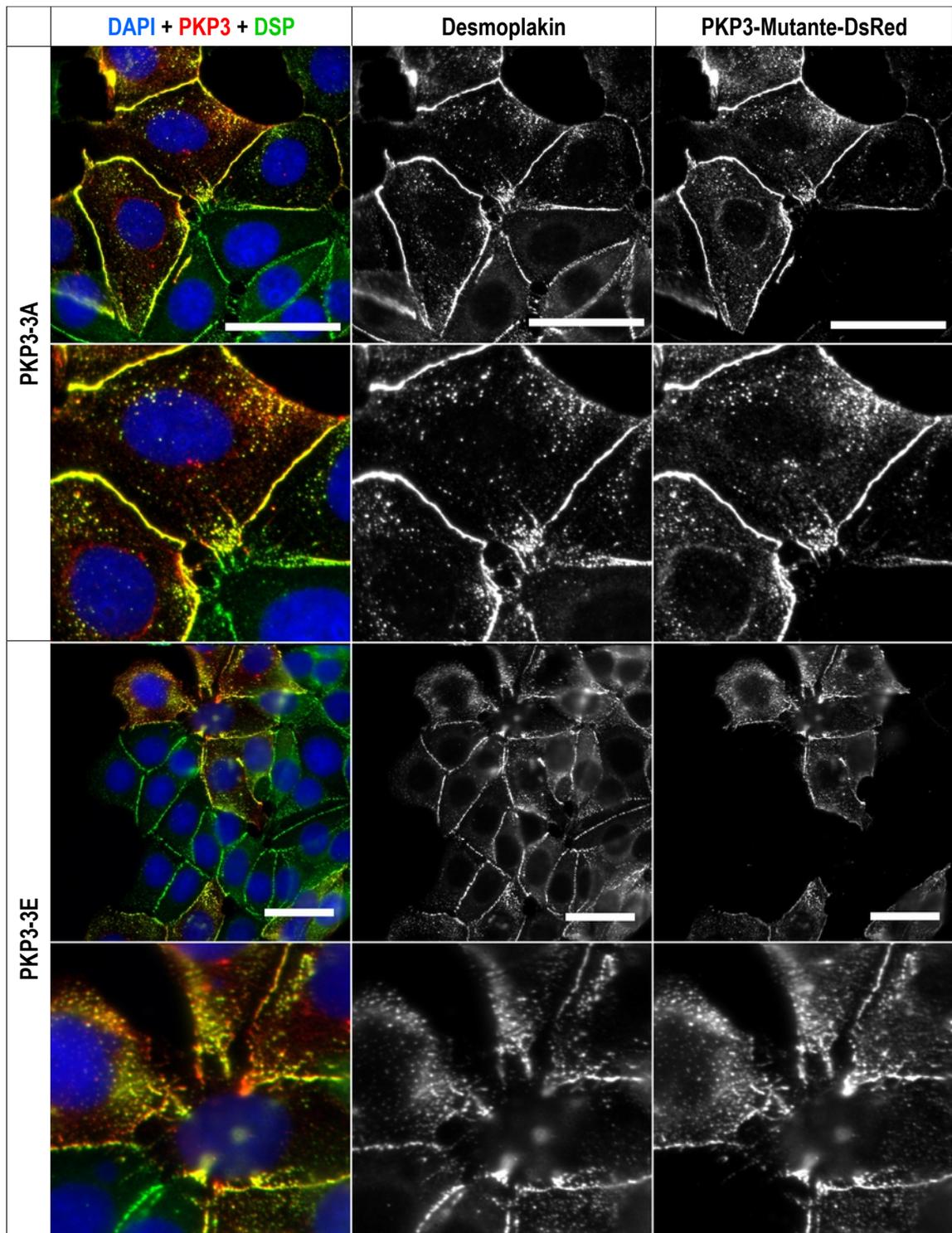


Abbildung 19: PKP3-3A/E mit Desmoplakin in MCF-7-Zellen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in Methanol fixiert und anschließend Desmoplakin I und II immunofluoreszent markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 32µm.

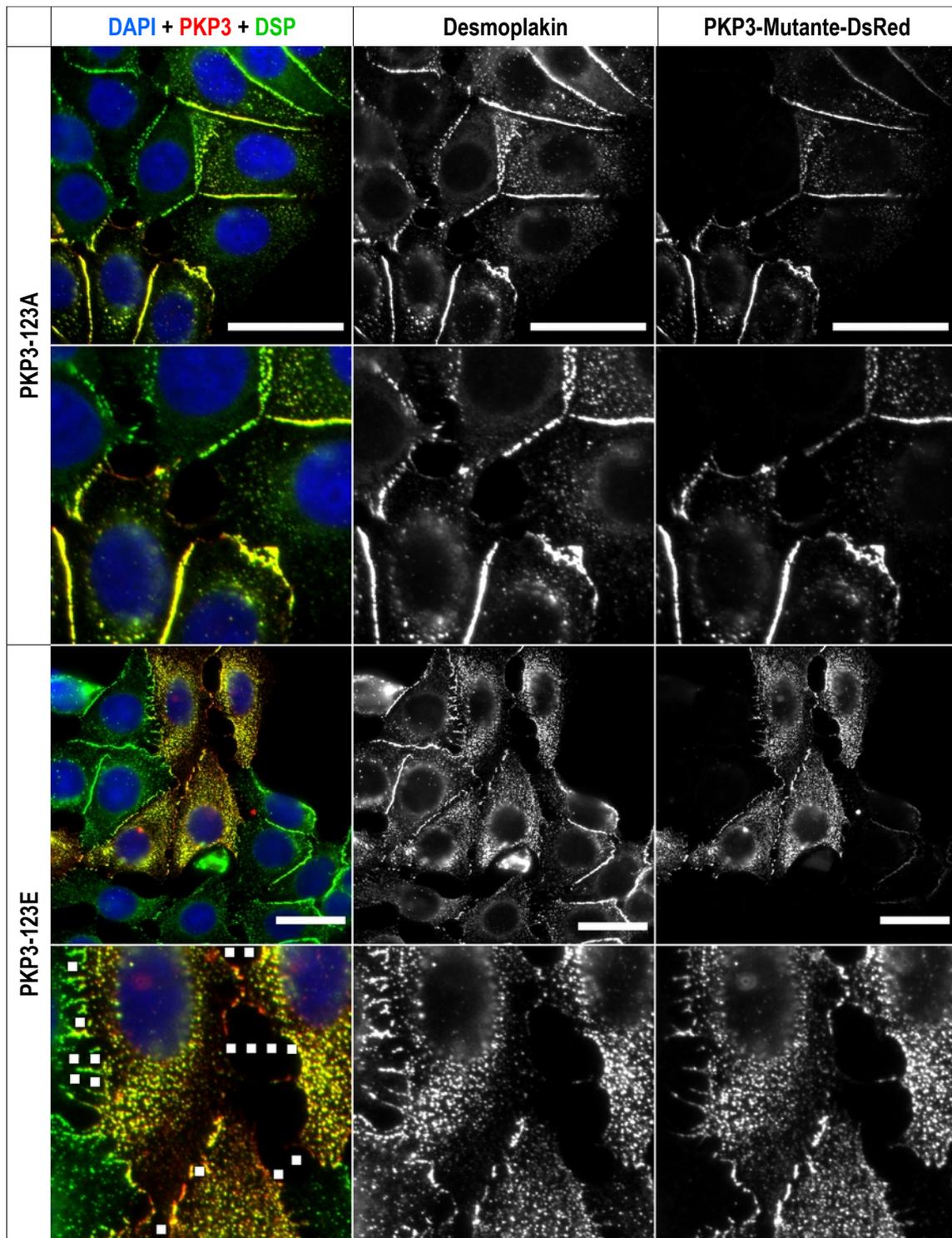


Abbildung 20: PKP3-123A/E mit Desmoplakin in MCF-7-Zellen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in Methanol fixiert und anschließend Desmoplakin I und II immunofluoreszent markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 32µm. Die gepunkteten Linien im PKP3-123E-Vergrößerungsfenster zeigen die Zellzwischenräume, ein Punkt entspricht 2µm.

4.2.4 Aktinfilamente in MCF-7-Zellen nach Transfektion der PKP3-Mutanten

Die die Vertreter der p120-Subfamilie können über die kleinen GTPasen RhoA und Rac1 die Organisation der Aktinfilamente beeinflussen (Anastasiadis *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2006; Abu-Elneel *et al.*, 2008). Für die PKP1 und PKP2 ist ebenfalls eine Assoziation mit Aktinfilamenten bekannt (Hatzfeld, 1999; Simmermacher, 2012). Nach Überexpression von PKP1, PKP2, p120^{ctn} und NPRAP/ δ -catenin wurde ein ähnlicher Phänotyp beobachtet. Der sogenannte *branching phenotype* zeigt mehrere lange Zellausläufer und Filopodien (Reynolds *et al.* 1996; Lu *et al.* 1999; Hatzfeld, 1999; Simmermacher, 2012). Während bei Überexpression des PKP3-Wildtyps bislang kein *branching phenotype* beobachtet wurde, wird im Folgenden überprüft, ob nach Überexpression der unphosphorylierten bzw. phosphomimetischen PKP3-Mutanten ein Einfluss auf das Aktinnetzwerk beobachtet werden kann. Von besonderem Interesse ist dabei die Organisation der Aktinfilamente im Zusammenhang mit den beobachteten Zellzwischenräumen. MCF-7-Zellen wurden mit den PKP3-Mutanten transfiziert, nach 48 h fixiert und die Aktinfilamente anschließend über fluoreszenzgekoppeltes Phalloidin markiert (Abbildungen 27-29 im Anhang). Bei keinem PKP3-Klon trat nach Überexpression der *branching phenotype* auf. Die PKP3-Mutanten lokalisieren in MCF-7-Zellen wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben. In der Organisation der Aktinfilamente ist nach Transfektion mit dem Wildtyp, PKP3-1E, unphosphorylierbaren PKP3-Mutanten und untransfizierten Zellen kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Aktin lokalisiert zu großen Anteilen ohne PKP3 und *vice versa*. Es ist keine Ko-lokalisierung von PKP3 und Aktinfilamenten erkennbar, eine Ausnahme bildet PKP3-123A, das aufgrund seiner starken desmosomalen Lokalisation zusammen mit Aktin an den Zellgrenzen vorkommt. Die Ko-lokalisierung ist allerdings nicht streng wie zwischen PKP3 und Desmoplakin. Die Zellzwischenräume, die bei Expression von PKP3-2E, -3E und -123E auftreten, werden von vereinzelt Zell-Zellkontakten überbrückt, die sich durch Aktinverdichtung auszeichnen. Insgesamt kommt bei Expression der genannten PKP3-Mutanten weniger Aktin entlang der Zellgrenzen vor und eine Ausdünnung des Aktinnetzwerkes in Zellmembrannähe wurde häufiger beobachtet als bei den unphosphorylierbaren Mutanten, dem PKP3-Wildtyp und untransfizierten Zellen. Bei den mit PKP3-2E, -3E und -123E transfizierten Zellen fällt im Vergleich zu den jeweiligen unphosphorylierbaren Mutanten auf, dass die Zellgrenzen weniger geradlinig verlaufen und die Zellen eher rundlich als polygonal sind.

4.3 Einfluss der Phosphorylierung auf zytoplasmatische Funktionen von PKP3

Im folgenden wurde der Einfluss der PKP3-Phosphorylierung auf die Proliferationsrate als mögliche zytoplasmatische Funktion der phosphomimetischen PKP3-Mutanten untersucht. Da die p70-S6-Kinase über den mTOR-Signalweg an der Regulation des Zellwachstums und der Zellgröße beteiligt ist (Fingar *et al.*, 2002; Ma und Blenis, 2009) und PKP3 als Substrat bestätigt werden konnte, soll im weiteren überprüft werden, ob neben der Überexpression auch die Phosphorylierung von PKP3 die Proliferation beeinflusst. Um die Proliferationsrate zu messen, wurde das Thymidinanalogon BrdU verwendet (Abschnitt 3.2.5), das während der S-Phase in die DNA eingebaut wird (Porstmann *et al.*, 1985). Die Anzahl der Zellen, die

während der Zeitspanne der BrdU-Exposition die S-Phase durchlaufen, können als Maß für die Proliferationsrate verwendet werden. MCF-7-Zellen wurden mit dem PKP3-Wildtyp, den drei Einzelmotiven und dem Komplettmotiv transfiziert. Um mit vergleichbaren Bedingungen zu arbeiten, wurde der Zellzyklus nach der Transfektion durch Mitogendeprivation synchronisiert. Zellen, die BrdU während der 60-minütigen Exposition aufgenommen haben, also die S-Phase durchliefen, wurden mittels α -BrdU-Antikörper immunofluoreszent markiert. Der Anteil transfizierter Zellen, die BrdU aufgenommen hatten, wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Transfektion und nachfolgende Proteinüberexpression können die Proliferationsrate verfälschen. Um diesen Effekt zu eliminieren wurde der DsRed-Leervektor als Kontrolle transfiziert und in der Auswertung auf diesen normiert.

Die Überexpression von PKP3-wt steigert die Proliferation signifikant auf das 2,2-fache bezogen auf den Leervektor ($p < 0,005$; Abbildung 21). Konstitutive Phosphorylierung bzw. Unphosphorylierbarkeit im ersten Motiv hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Der Effekt von PKP3-1A und -1E ist mit dem Wildtyp vergleichbar. Für PKP3-2E wurde ein stimulierender Einfluss auf die Proliferationsrate gefunden, der dem 1,5-fachen des Wildtyps ($p < 0,05$), bzw. 1,4-fachen von PKP3-2A entspricht ($p < 0,05$). Beim dritten Motiv findet sich zwischen den beiden Mutanten ein stärkerer Kontrast in den Proliferationsraten. PKP3-3E regt die Proliferation 1,4-fach stärker an, als der Wildtyp ($p < 0,05$), bzw. 1,7-fach stärker als PKP3-3A ($p < 0,005$). Die höchste Proliferationsrate findet sich bei imitierter Phosphorylierung im Komplettmotiv, sie beträgt das 1,6-fache des Wildtyps ($p < 0,05$). Der Kontrast zur Alanin-Mutante ist beim Komplettmotiv mit der 1,8-fachen Proliferationsrate am größten ($p < 0,0005$). Die für PKP3-123A und PKP3-123E gemessenen Proliferationsraten lassen nicht auf einen additiven Effekt des zweiten und dritten Motives schließen. Bei Unphosphorylierbarkeit aller Motive und insbesondere im dritten Motiv liegt die Proliferationsrate unter der des Wildtyps. Der proliferationsfördernde Effekt der PKP3-Überexpression (Furukawa *et al.*, 2005; Breuninger *et al.*, 2010) wird durch Hypophosphorylierung zum Teil aufgehoben.

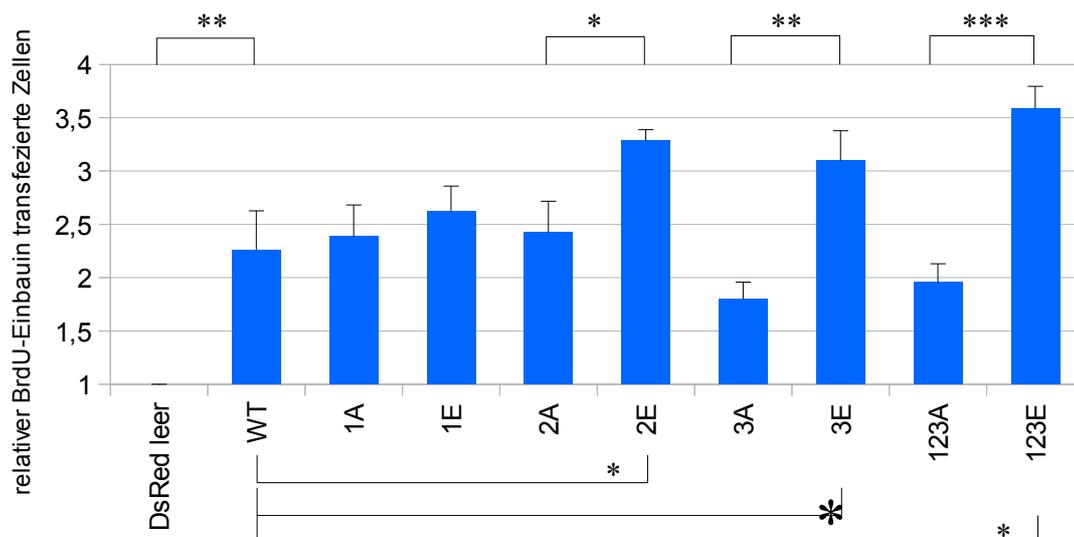


Abbildung 21: relativer BrdU-Einbau in Abhängigkeit vom transfizierten Konstrukt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

5 Diskussion

PKP3 ist ein multifunktionelles Protein

Aufgrund seiner dualen Lokalisation und Funktionen in Zell-Zellkontakten sowie im Zytoplasma kommt PKP3 als wichtiger Koordinator des Zusammenspiels von Zell-Zelladhäsion und Migration in Frage. Über seinen Effekt auf die Proliferation trägt es womöglich beim Phänomen der Kontaktinhibition zur Regulation der Gewebemöostase bzw. Dysregulation in Karzinomen bei.

Die vielfältigen Funktionen von PKP3 sind mit einer unterschiedlichen subzellulären Lokalisation von PKP3 verbunden und mit einer Reihe bereits identifizierter direkter Interaktionspartner im jeweiligen Zellkompartiment assoziiert. Die direkte Interaktion von PKP3 mit seinen zahlreichen zytoplasmatischen Interaktionspartnern geht vermutlich mit einer zytoplasmatischen Lokalisation einher. Eine membranständige Lokalisation ist weniger mit einem direkten Einfluss auf zytoplasmatische Funktionen vereinbar. Deshalb ist die Lokalisation von PKP3 ein wichtiger Einflussfaktor für seine Funktionen.

5.1 Die Rolle von PKP3 bei der Zell-Zelladhäsion

PKP3 verfügt mit DSP, PG, DSG1-3 und den DSC α -Isoformen 1 bis 3 sowie 3b und Keratin 18 über die meisten identifizierten desmosomalen Interaktionspartner unter den Plakophilinen und kommt in fast allen Epithelien vor (Schmidt *et al.*, 1999; Bonn  *et al.*, 1999, 2003). PKP3 rekrutiert desmosomale Proteine wie z.B. DSC2/3, DSG3, PKP2, DSP und PG an die Zellmembran und hat in der Zellkultur Einfluss auf die Desmosomengröße bzw. Organisation des desmosomalen Plaques (Gosavi *et al.*, 2011; Todorovic *et al.*, 2014). Der begünstigende Einfluss von PKP3 auf die Dynamik der Desmosomenentstehung zeigt sich bei der Rekrutierung des DSP/PKP2-Komplexes an die Zellmembran in Phase III (Godsel *et al.*, 2005; Todorovic *et al.*, 2014).

Es gibt Hinweise auf zwei DSP-Interaktionsstellen in der PKP3-Kopfdomäne, über die PKP3 durch laterale Verknüpfungen im desmosomalen Plaque die Desmosomengröße beeinflussen könnte (Bonn  *et al.*, 2003).

PKP3 interagiert mit der GTPase Rap1 und beeinflusst über die Modulation des β -Adrenozeptor/cAMP/EPAC/Rap1-Signalweges auch die Rekrutierung von E-Cadherin an die Zellmembran (Goitre *et al.*, 2014; Todorovic *et al.*, 2014). Für eine physiologische E-Cadherin-Lokalisation ist entweder eine erhöhte Rap1-GTPase-Aktivität oder die Expression von PKP3 notwendig. Daraus wurde geschlossen, dass PKP3 bei der Rap1/E-Cadherin-Interaktion als Gerüstprotein fungiert, um auch bei niedriger Rap1/EPAC-Aktivität eine Interaktion mit E-Cadherin zu ermöglichen (Todorovic *et al.*, 2014).

Da PKP3 die Ausbildung hyperadhäsiver Desmosomen hemmt und mit der PKC α ko-lokalisiert, wird für PKP3 eine Rolle als Gerüstprotein für PKC α und seine Substrate vermutet (Keil *et al.*, 2016). Da der Phänotyp der PKP3-*knockout*-Maus im Vergleich zum PKP1-*knockout* eher mild ausfällt, scheint PKP3 einen begünstigenden, wenn auch nicht essentiellen Einfluss auf die desmosomale Zell-Zelladhäsion zu haben (Sklyarova *et al.*, 2008; Rietscher *et al.*, 2016).

5.1.1 Regulation der Lokalisation von PKP3

Die Proliferation in Epithelien wird über Rezeptor-Tyrosinkinasen bzw. Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF, Insulin und IGF-1 reguliert. Die entsprechenden aktivierten Signalwege beeinflussen auch die Zell-Zelladhäsion und kommen somit auch für die Regulation von PKP3 in Frage. Für PKP1 wurde bereits gezeigt, dass es nach Insulin-Stimulation durch AKT2 phosphoryliert wird und dass darüber die PKP1-Lokalisation und der Einfluss von PKP1 auf die Zell-Zelladhäsion, Migration bzw. Translation und Proliferation reguliert wird (Wolf *et al.*, 2013).

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die Interaktion von PKP3 mit der p70-S6Kinase im Hefe-2-Hybrid-assay gefunden, die präferentiell über die PKP3-Kopfdomäne vermittelt wird (Prof. Hatzfeld, persönliche Korrespondenz). Eine Interaktion zwischen PKP3 und der AKT1 oder AKT2 wurde nicht gefunden (Wolf *et al.*, 2013). Die p70-S6-Kinase ist ein Effektor des PI3K/mTOR-Signalweges (Liu *et al.*, 2005; Klos *et al.*, 2006; Magnuson *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Interaktion mit der p70-S6Kinase mittels GST-pulldown und BiFC bestätigt werden. Es wurde signifikant mehr konstitutiv aktive p70-S6-Kinase als Wildtyp-Kinase an PKP3 gebunden, was auf eine bevorzugte Interaktion mit der aktiven Kinase schließen lässt. Die im GST-pulldown verwendete Wildtyp-Kinase liegt vermutlich in inaktiver Form vor, da die aktivierenden upstream-Kinasen im exprimierenden *E. coli*-Stamm nicht vorhanden sind. Ob PKP3 und p70-S6K auch im zellulären Kontext interagieren können, wurde mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) untersucht. In der BiFC mit HeLa- und MCF-7-Zellen wurde für den p70-S6K-Wildtyp und die konstitutiv aktive Form ein Signal detektiert, das aufgrund seiner Intensität auf eine spezifische Interaktion mit PKP3 schließen lässt. Mit der konstitutiv inaktiven p70-S6-Kinase wurde ein sehr schwaches BiFC-Signal detektiert, was eine tatsächlich vorhandene physiologische Interaktion mit PKP3 unwahrscheinlich macht. Prinzipiell ist es möglich, dass die Interaktion von S6K und PKP3 indirekt ist und über ein drittes Protein in HeLa bzw. MCF-7-Zellen vermittelt wird. Dagegen spricht, dass die Interaktion im GST-pulldown auch zwischen in *E. coli* exprimierter p70-S6-Kinase und aufgereinigtem PKP3 stattfand. Es kann also von einer direkten Interaktion ausgegangen werden. Die mit beiden Methoden gefundene präferentielle Interaktion von PKP3 mit aktiver p70-S6-Kinase ist typisch für eine Substrat-Kinase-Beziehung.

Besonders in MCF-7-Zellen wurde nach Überexpression aktiver p70-S6Kinase eine Lokalisationsänderung von PKP3 beobachtet, die womöglich eine physiologische Rolle hat.

Durch Mutagenese wurden acht PKP3-Mutanten (PKP3-1A/E, PKP3-2A/E, PKP3-3A/E, PKP3-123A/E) generiert, die eine Phosphorylierung bzw. Hypophosphorylierung von PKP3 nachahmen (siehe Tabelle 13, Abbildung 22). Die drei mutierten Serin-Motive wurden auf Grundlage von Massenspektrometriedaten, des S6-Kinase-Konsensusmotives und eines Peptid-Kinase-Assays ausgewählt. In HeLa- und besonders in MCF-7-Zellen zeigten die im 2. oder 3. Motiv mutierten PKP3-Klone eine unterschiedliche Lokalisation. Die Phosphomimic-Klone PKP3-2E, PKP3-3E und PKP3-123E lokalisierten deutlich stärker zytoplasmatisch und weniger desmosomal. Die (Hypo-) Phosphorylierung im 2. oder 3. Motive verursachte

die gleiche Lokalisationsänderung von PKP3, wie sie bei Transfektion mit aktiver bzw. inaktiver p-70-S6-Kinase im BiFC-Versuch auftrat. Unter Beachtung des im Vorfeld durchgeführten Kinase-Peptid-Assay kann davon ausgegangen werden, dass PKP3 ein weiteres Substrat der p70-S6-Kinase ist.

Alle PKP3-Klone zeigen eine strenge Ko-lokalisierung mit DSP I & II, welches ebenfalls mit den jeweiligen PKP3-Klonen ko-lokalisiert. Die desmosomale DSP-Lokalisation wird durch Expression der im 2. oder 3. Motiv mutierten Phosphomimic-PKP3-Klone vermindert und es wurden Zellzwischenräume beobachtet, die im einstelligen μm -Bereich lagen. Insbesondere bei der Fixierung der Zellen mit Methanol könnten diese Zellzwischenräume auch durch Wasserverlust bzw. Schrumpfen bedingt sein. Die Zellzwischenräume traten aber auch bei der Fixierung mit Formaldehyd gehäuft und nur bei den genannten PKP3-Mutanten auf. Das macht ein Fixierungsartefakt unwahrscheinlich.

Im Vergleich zum Einfluss auf die DSP-Lokalisation wird die Organisation der Aktinfilamente in MCF-7- oder HeLa-Zellen durch die Expression verschiedener PKP3-Mutanten nicht wesentlich beeinflusst. Die beschriebenen Zellzwischenräume werden vereinzelt durch Zell-Zellkontakte überbrückt, die mit dichten Aktinfilamentbündeln verbunden sind.

Das 14-3-3 σ -Protein (Stratifin) bindet spezifisch über das im 2. Motiv enthaltene phosphorylierte Serin S285 an PKP3 (Roberts *et al.*, 2013). Dies ist ein möglicher Mechanismus, wie die Phosphorylierung von PKP3 seine Lokalisation beeinflusst. Die Bindung an Stratifin begrenzt den Austausch zwischen zytoplasmatischen und desmosomalen PKP3-Pool. An Serin S285 phosphoryliertes PKP3 wurde mittels eines spezifischen Phosphoserin-Antikörpers nur im Zytoplasma nachgewiesen (Roberts *et al.*, 2013). Das spricht in Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Arbeit gezeigten desmosomalen Lokalisation der PKP3-Mutanten PKP3-2A und 123A dafür, dass desmosomal lokalisierendes PKP3 zumindest an Serin S285 unphosphoryliert ist, während die Phosphorylierung im 2. Motiv zu einem 14-3-3-Protein-vermittelten Zytoplasma-Arrest von PKP3 führt. Nach dem Stratifin-KD fällt eine Begünstigung des membrangebunden PKP3-Pools auf, was die Hypothese des Zytoplasma-Arrestes bekräftigt (Roberts *et al.*, 2013).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MCF-7-Zellen exprimieren kaum Stratifin (14-3-3 σ), während andere 14-3-3-Isoformen, insbesondere 14-3-3 ϵ , η , τ / θ und ζ hochreguliert sind (Bergamaschi und Katzenellenbogen, 2012; nextBio-Datenbank Zugriff: 7.8.2016). Da die 14-3-3-Proteine auch an gemeinsame Konsensusmotive binden, wird PKP3-pS285 in MCF-7 womöglich durch andere 14-3-3-Isoformen gebunden. Diese Hypothese kann die zytoplasmatische Lokalisation der PKP3-Mutanten PKP3-2E und 123E erklären. Ob die rigide Struktur der 14-3-3-Proteine auch nach Bindung an das 2. Serin-Motiv womöglich zu einer Konformationsänderung in der unstrukturierten Kopf-Domäne von PKP3 führt, bleibt offen.

Im Gegensatz zum 2. Motiv liegt das 3. Motiv am Übergang zwischen Kopf-Domäne und der hochstrukturierten ARM-repeat-Domäne von PKP3, eine Konformationsänderung als Ursache der Translokation bzw. Interaktion erscheint daher weniger wahrscheinlich als beim 2. Serin-Motiv (Abbildung

22). Obwohl das 3. Motiv nicht dem 14-3-3-Konsensusmotiv $R(X)[S/H/F/W/Y][K/R/H/F/W/Y]pS[L/E/A/M]P$ entspricht und bislang keine 14-3-3-Interaktion gezeigt wurde, ist eine Interaktion nicht ausgeschlossen, da 14-3-3-Proteine auch unabhängig vom beschriebenen Konsensusmotiv binden können (Yaffe *et al.*, 1997; Rittinger *et al.*, 1999). Laut der Vorhersage des NetPhorest-Algorithmus finden 14-3-3-Interaktionen mit dem 1., 2. und 3. Motiv mit hoher Wahrscheinlichkeit statt (Madeira *et al.*, 2015; <http://www.compbio.dundee.ac.uk/1433pred/run/job=sQ9Y446>). Es ist also denkbar, dass auch die Lokalisationsänderung infolge der Phosphorylierung des 3. Motives durch eine Interaktion mit 14-3-3-Proteinen vermittelt wird.

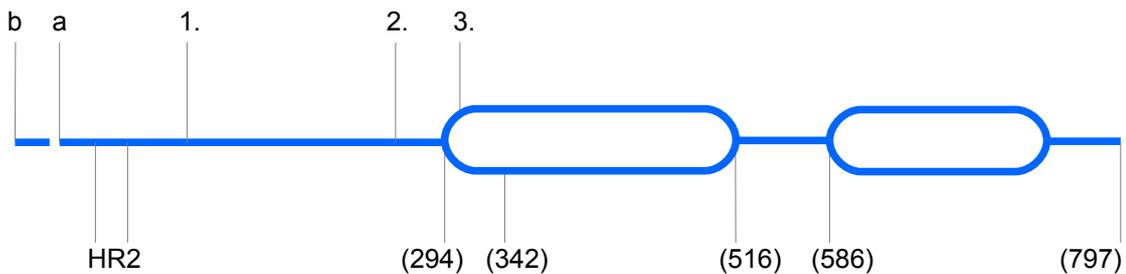


Abbildung 22: PKP3-Schema mit relevanten Domänen. Zahlen in Klammern geben die jeweilige Aminosäureposition an; die sichelförmige Gesamtstruktur von PKP3 wurde zugunsten der besseren Darstellbarkeit vernachlässigt. **b:** zusätzliche 15 N-terminale Aminosäuren von PKP3b, **a:** N-Terminus von PKP3a, **HR2(18-51):** HR2-Domäne, **1.:** S134/145, **2.:** S280/283/280, **(294):** Übergang von Kopf- und ARM-repeat-Domäne, **3.:** S313/314, **(342):** Ende des Kopf-Konstruktes, welches im Hefe-2-hybrid-assay verwendet wurde **(516-586):** Insert, **(770-797):** unstrukturierter C-Terminus von PKP3 (modifiziert nach: Bonn  *et al.*, 1999, 2003; Hatzfeld 2006; Mühmer *et al.*, 2013; Fischer-Ke o *et al.*, 2014).

5.1.2 Regulation der Funktionen in Desmosomen

Über die PKP3-Kopf-Domäne werden auch Interaktionen mit desmosomalen Proteinen und insbesondere DSP vermittelt. Für eine Interaktion im Hefe-2-Hybrid-assay mit den 63 N-terminalen Aminosäuren von DSP ist die HR2-Domäne in der PKP3-Kopf-Domäne notwendig (Abbildung 22). Diese HR2-Domäne ist innerhalb der Plakophiline und für PKP3 in verschiedenen Spezies konserviert (Bonn  *et al.*, 1999, 2003). DSP und PKP3 ko-lokalisieren unabhängig von der Phosphorylierung der drei Serin-Motive miteinander. Es gibt daher keinen Hinweis, dass diese Interaktion durch die PKP3-Phosphorylierung beeinträchtigt wird. Die PKP3-Phosphorylierung im zweiten und dritten Motiv beeinträchtigt jedoch die desmosomale Lokalisation von DSP, vermutlich weil die rekrutierende Funktion von PKP3 durch seinen Zytoplasma-Arrest eingeschränkt ist. Unphosphoryliertes PKP3 unterliegt demgegenüber keinem Zytoplasma-Arrest und steht weiterhin für die DSP-Rekrutierung zur Verfügung. Diese Hypothese wird durch die prominente desmosomale Ko-lokalisation von DSP und PKP3-2A, -3A und 123A gestützt.

DSP spielt bei der Verankerung von Intermediärfilamenten an Desmosomen eine zentrale Rolle. Deshalb hat die Phosphorylierung von PKP3 über eine eingeschränkte DSP-Rekrutierung vermutlich einen negativen Einfluss auf die Zell-Zelladhäsion. Da die verwendeten MCF-7-Zellen kaum PKP1 exprimieren und somit eine redundante Funktion bei der Rekrutierung desmosomaler Proteine wegfällt, spielt die Rekrutierung von DSP durch PKP3 womöglich eine größere Rolle als in anderen Zellen.

Strukturellen Aufgaben von PKP3 in Desmosomen sind typischerweise mit einer membranständigen Lokalisation verbunden, weshalb vermutet werden kann, dass auch die Rekrutierung anderer desmosomaler Proteine und insbesondere von PKP3-Interaktionspartnern wie Plakoglobin und den genannten desmosomalen Cadherinen, durch die zytoplasmatische Lokalisation von PKP3 beeinflusst wird. Womöglich führt die Phosphorylierung bzw. Interaktion mit 14-3-3-Proteinen über eine Konformationsänderung der PKP3-Kopf-Domäne zu einem geänderten Interaktionsverhalten mit desmosomalen Proteinen. Ein Hinweis auf die verminderte Zell-Zelladhäsion sind Zellzwischenräume, die unabhängig von der Fixierungsmethode, gehäuft bei einer zytoplasmatischen Lokalisation von PKP3 auftraten.

Die Stabilisierung der Rap1/E-Cadherin-Interaktion durch PKP3 hat einen positiven Einfluss auf die Rekrutierung von E-Cadherin an die Zellmembran (Todorovic *et al.*, 2014). Rap1 lokalisiert im aktiven Zustand membrannah, nach PKP3-KD kommt weniger Rap1 an der Zellmembran vor (Hogan *et al.*, 2004; Asuri *et al.*, 2008; Todorovic *et al.*, 2014). Womöglich entfällt auch dieser begünstigende Einfluss auf die Zell-Zelladhäsion durch die zytoplasmatische Lokalisation von PKP3. Die Hypothese, dass die zytoplasmatische Lokalisation von PKP3 die Zell-Zelladhäsion beeinträchtigt und dass die Lokalisation über die Phosphorylierung durch die p70-S6-Kinase reguliert wird, ist in Abbildung 23 schematisch dargestellt. Die Aktivierung der p70-S6-Kinase wird in Abschnitt 5.3 behandelt.

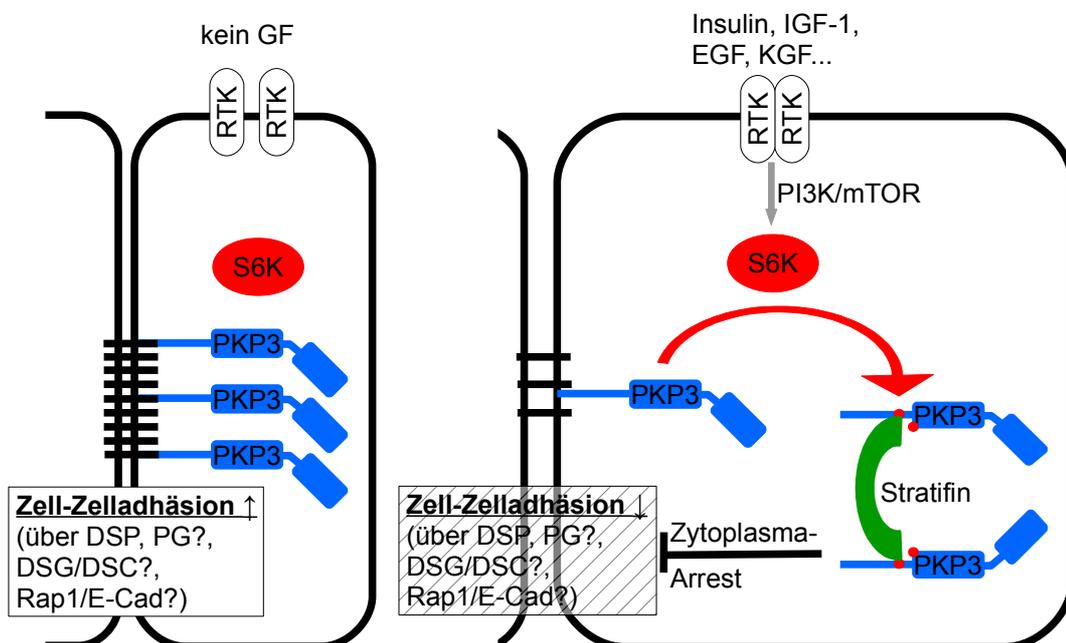


Abbildung 23: Die Phosphorylierung von PKP3 durch die p70-S6-Kinase bedingt über Interaktion mit 14-3-3-Proteinen seine zytoplasmatische Lokalisation und beeinträchtigt die Zell-Zelladhäsion. RTK: Rezeptor-Tyrosinkinasen, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, mTOR: mammalian target of rapamycin, S6K: p70-S6-Kinase, E-Cad: E-Cadherin, Stratifin/14-3-3 σ bildet bevorzugt homophile Dimere, woraus zwei Bindungsstellen resultieren (Wilker *et al.*, 2005).

Roberts *et al.* untersuchten die Auswirkungen des Stratifin-KD auf die Zell-Zelladhäsion und Migrationsfähigkeit (Roberts *et al.*, 2013). Der Stratifin-KD ging mit einer verringerten Zell-Zelladhäsion einher. Dies spricht aber nicht zwingend gegen eine adhäsionsfördernde Funktion von PKP3 an der Zellmembran, denn Stratifin ist mit über 100 Proteinen assoziiert, wobei ca. ein Drittel davon an der Regulation der Zell-Zelladhäsion beteiligt sind. Die beeinträchtigte Zell-Zelladhäsion nach Stratifin-KD ist deshalb nicht spezifisch auf die fehlende PKP3-Stratifin-Interaktion zurückzuführen (Benzinger *et al.*, 2005). Ebenfalls ist die verbesserte Migrationsfähigkeit nach Stratifin-KD nicht unbedingt kausal mit der gleichzeitig auftretenden membranständigen Lokalisation von PKP3 verknüpft (Roberts *et al.*, 2013). Denn neben den vielfältigen Interaktionen von Stratifin hemmt es auch direkt die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die an der Regulation der Migration beteiligt ist (Cianfarani *et al.*, 2011; Haase *et al.*, 2003). Eine Möglichkeit, wie PKP3 die Migrationsfähigkeit von Zellen beeinflusst, wird auch im Zusammenhang mit der Hochregulation der Matrix-Metalloprotease 7 und Dephosphorylierung von Keratin 8 nach PKP3-KD diskutiert. Dieses Ergebnis wurde bislang nicht *in vivo* verifiziert (Khapare *et al.*, 2012; Basu *et al.*, 2015).

5.2 Zytoplasmatische Funktionen von PKP3

Bislang wurden viele direkte, zytoplasmatische Interaktionspartner von PKP3 identifiziert. Ebenso ist der positive bzw. negative Effekt der PKP3-Überexpression bzw. des PKP3-KD auf zytoplasmatische Zellprozesse wie z.B. die Translation belegt. PKP3 interagiert indirekt mit RNA und direkt mit mRNA-bindenden Proteinen, welche Funktionen bei der mRNA-Prozessierung, dem mRNA-Abbau und der Translationsinitiation z.B. als mRNA-Helicase erfüllen (Hofmann *et al.*, 2006; Hogg und Goff, 2010; Fischer-Kešo *et al.*, 2014). Dennoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt. Die PKP3-Expression zeigt zudem widersprüchliche Korrelationen mit der Proliferationsrate. Deshalb stellt sich die Frage, wie die zytoplasmatischen Funktionen von PKP3 in den verschiedenen Epithelien und Tumorzellen reguliert werden. Die Annahme, dass zytoplasmatische Funktionen von PKP3 z.B. Translation und Proliferation begünstigen, wird durch die hier gezeigten Ergebnisse bestätigt.

5.2.1 Regulation zytoplasmatischer Funktionen

Da die zytoplasmatische Lokalisation von PKP3 vermutlich seine Funktionen im Zytoplasma begünstigt, wurde der Einfluss der PKP3-Phosphorylierung auf die Proliferation untersucht. Im BrdU-Assay wurde ein signifikanter Unterschied im BrdU-Einbau zwischen Phosphomimic-Mutation und nachgeahmter Hypophosphorylierung des 2. oder 3. Motives gemessen. Das spricht dafür, dass die zytoplasmatische Lokalisation dieser Phosphomimic-Klone mit einer gesteigerten Proliferationsrate einhergeht. Für die im 2. oder 3. Motiv mutierten Phosphomimic-Klone lag die Proliferationsrate signifikant über der des Wildtyps. Für die PKP3-3A- und PKP3-123A-Mutanten wurde eine niedrigere Proliferationsrate gemessen, als nach Expression des Wildtyps. Der proliferationssteigernde Einfluss von PKP3, der nach Überexpression

beobachtet wurde, unterliegt demnach der Regulation durch die Phosphorylierung im 2. oder 3. Motiv bzw. die Lokalisation von PKP3. Die nachgeahmte (Hypo-) Phosphorylierung des 1. Serin-Motivs zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinen signifikanten Unterschied in der Proliferationsrate. Es sind mehrere Mechanismen denkbar, wie das zytoplasmatisch lokalisierende PKP3 die Proliferation stimuliert:

Durch effizientere Translation von mRNAs, die für proliferationsfördernde Proteine codieren:

Viele Proteine, die Wachstums und Proliferation kontrollieren, wie z.B. Rezeptoren für VEGF, IGF-2, GDF-1, PDGF-2, TGF β , FGF-2 und viele Transkriptionsfaktoren werden von mRNAs mit langen, strukturierten 5'UTR (5' untranslatierte Region) codiert (van der Velden und Thomas, 1999; Mignone *et al.*, 2002). Für eine effiziente Translation dieser mRNAs muss diese 5'UTR-Struktur durch Helicasen des cap-Komplexes entwunden werden. Da PKP3 die cap-abhängige Translation stimuliert, ist es denkbar, dass es auch die Translationseffizienz dieser Wachstums- und Transkriptionsfaktoren steigert und so die Proliferation stimuliert (Wolf *et al.*, 2010).

Durch die Stimulation der globalen Translation:

Die Zellzyklusprogression bzw. Proliferation ist an eine Zunahme der Gesamtproteinmenge bzw. Proteinsynthese gekoppelt (Johnston *et al.*, 1977). Der stimulierende Einfluss von PKP3 auf die globale Translation könnte also über die Zunahme der Zellmasse den proliferationsstimulierenden Effekt von PKP3 erklären. PKP3 stimuliert neben der cap-abhängigen Translation auch die cap-unabhängige Translation von viralen internen Ribosomen Eintrittsstellen (IRES) (Wolf *et al.*, 2010; Kießling, 2014; Abbildung 26).

Die Identifikation weiterer Interaktionspartner könnte Aufschluss über einen möglichen Mechanismus geben, wie PKP3 seinen Einfluss auf die Translation ausübt. Für die Translation durch diese viralen IRES sind verschiedene eukaryotische Initiationsfaktoren (eIF) nötig. PKP3 stimuliert die EMCV-IRES-abhängige Translation, die alle eIF außer eIF4E benötigt. Die Translation durch CrPV-IRES bzw. HCV-IRES benötigt keine eIF bzw. nur eIF2/3 wird jedoch nicht durch PKP3 stimuliert (Kießling, 2014). Im Gegensatz zu PKP1 konnte für PKP3 keine Interaktion mit der mRNA-Helikase eIF4A1 bzw. eine Stimulation seiner ATPase-Aktivität gezeigt werden (Wolf *et al.*, 2010, 2013). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der stimulierende Einfluss von PKP3 auf die Translation nur durch bestimmte eIF vermittelt wird.

Nach PKP3-KD wurde ein geringfügig erhöhtes Proteinlevel für PRL3 (phosphatase of regenerativ liver 3) gefunden, wobei das PRL3-mRNA-Level unverändert blieb (Khapare *et al.*, 2012). Ob dieses Ergebnis auf eine negative post-transkriptionelle Regulation von PRL3 durch PKP3 im Sinne der Translationsinhibition zurückzuführen ist, bleibt offen. Denn in der genannten Veröffentlichung wurde keine direkte Interaktion oder Ko-lokalisierung von PKP3 mit PRL3-mRNA untersucht.

Die signifikant reduzierte Zellgröße von HaCat-Zellen nach PKP3-KD zeigt den positiven Einfluss auf die Proteinsynthese (Kießling, 2014). PKP3-*knockout*-Mäuse haben im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ein niedrigeres Gewicht, was auch durch eine beeinflusste Proteinsynthese erklärbar ist (Sklyarova *et al.*,

2008). p70-S6K-*knockout*-Mäuse haben ebenfalls ein signifikant geringeres Gewicht und weisen eine reduzierte Zellgröße auf (Magnuson *et al.*, 2012). Die Tatsache, dass PKP3-*knockout* und p70-S6K-*knockout* einen ähnlichen Phänotyp zeigen, ist mit der Annahme vereinbar, dass PKP3 als Substrat der p70-S6K an der Wachstumsregulation beteiligt ist.

Durch direkte Stimulation von Zellzyklusproteinen und Transkriptionsfaktoren:

Eine Lokalisation im Zellkern ist ein Hinweis auf eine direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusproteinen. Eine schwache Kernlokalisierung von PKP3 wurde nur in der Erstbeschreibung von PKP3 in HCT-8 und HaCaT-Zellen gezeigt (Bonné *et al.*, 1999, 2003). Keine der untersuchten Phosphorylierungen rief eine Kernlokalisierung von PKP3 in HeLa oder MCF-7-Zellen hervor. In embryonalen Stammzellen von Mäusen wurde PKP3 jedoch in der Kernfraktion präzipitiert und das *Xenopus laevis*-Homolog von PKP3 (xPKP3) zeigte in HeLa-Zellen eine schwache Kernlokalisierung nach Überexpression des Transkriptionsfaktors xETV1 (Munoz *et al.*, 2014). Es gibt Hinweise, dass PKP3 mit der inhibitorischen Domäne von ETV1 interagiert und dessen transkriptionelle Aktivität stimuliert. Die physiologische Relevanz dieser Interaktion wird dadurch bekräftigt, dass die Überexpression von ETV1 in PKP3-*knockout*-Fröschen den Phänotyp teilweise normalisieren kann (Munoz *et al.*, 2012, 2014), allerdings beschränken sich diese Ergebnisse auf einen embryologischen Kontext in *Xenopus laevis*. Ob für die Stimulation des ETV1 durch PKP3 eine Interaktion im Zellkern oder Zytoplasma nötig ist oder stattfindet, bleibt offen.

Dass ein PKP3-KO in der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* zu teils letalen Neuralrohrdefekten führt, PKP3-*knockout*-Mäuse jedoch lebensfähig sind und einen vergleichsweise milden Phänotyp zeigen, macht deutlich, dass die Funktionen von PKP3 in verschiedenen Wirbeltierklassen vom Kontext abhängt (Munoz *et al.*, 2012; Sklyarova *et al.*, 2008).

Es wurde auch die Stimulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch PKP3 beobachtet, wobei der physiologische Zusammenhang noch unklar ist (Arimoto *et al.*, 2014).

Über eine verminderte Zell-Zelladhäsion:

Kontaktinhibition beschreibt die Eigenschaft von Zellen, ihr Wachstum bzw. Proliferation bei Kontakt zu anderen Zellen einzustellen und so die Gewebekomöostase zu regulieren. Wenn die Zell-Zelladhäsion, z.B. durch Wegfall des begünstigenden Einflusses von PKP3 auf desmosomale Zell-Zellkontakte beeinträchtigt ist, könnten über die verminderte Kontaktinhibition Zellwachstum und Proliferation stimuliert werden.

Obwohl über die Mechanismen, die dem Einfluss auf Proliferation und Translation zugrunde liegen, bislang nur spekuliert werden kann, ist ein spezifischer, direkter Einfluss besser mit einer zytoplasmatischen als mit einer membranständigen PKP3-Lokalisation vereinbar. Die Proliferationsstimulation durch die zytoplasmatisch lokalisierenden PKP3-Mutanten PKP3-2E, -3E und 123E unterstützt diese Annahme (Schema siehe Abbildung 24).

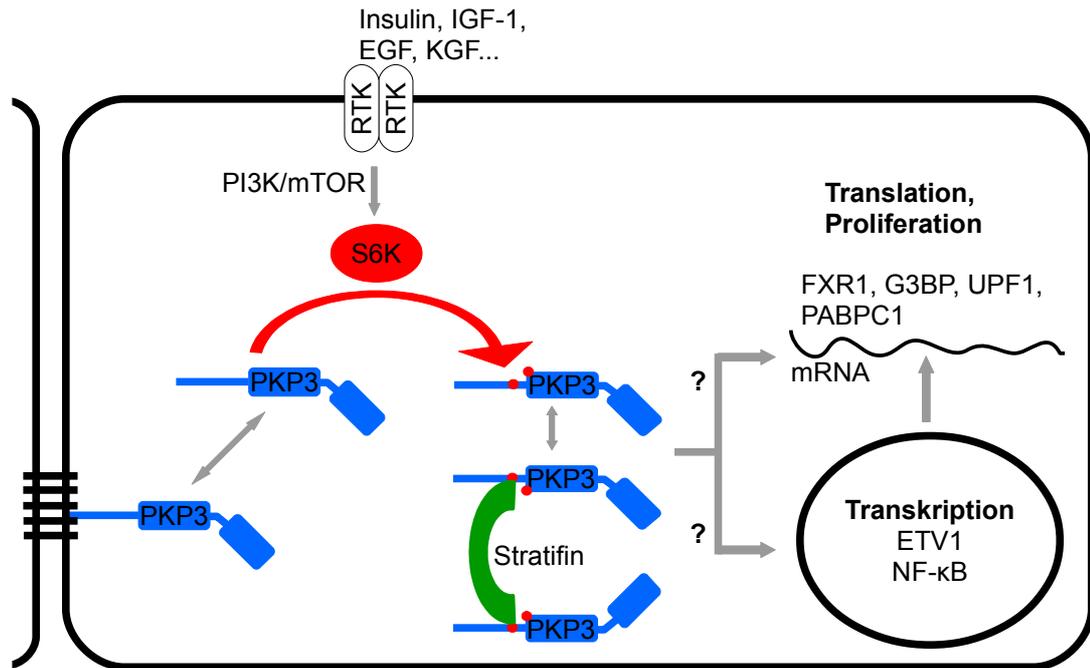


Abbildung 24: Regulation zytoplasmatischer Funktionen von PKP3 durch die p70-S6-Kinase. RTK: Rezeptor-Tyrosinkinasen, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, mTOR: mammalian target of rapamycin, S6K: p70-S6-Kinase.

5.3 Aktivierung der p70-S6-Kinase *in vivo*

Da die Regulation von PKP3 durch die p70-S6-Kinase erfolgt, wird im folgenden kurz darauf eingegangen, wie diese Kinase *in vivo* aktiviert wird und in welchem physiologischen Kontext PKP3 über diesen Mechanismus reguliert werden könnte.

Die p70-Isoform der S6-Kinasen (RSK) gehört wie AKT/PKB, PKC zu den Serin/Threonin-Kinasen der AGC-Gruppe. Die p70-S6-Kinase verfügt über eine katalytisch aktive N-terminale Domäne, die über eine unstrukturierte Linker-Domäne mit der C-Terminale autoinhibitorischen Pseudosubstratdomäne verbunden ist (Abbildung 25). Bei der Aktivierung der p70-S6K wird die katalytisch aktive Domäne infolge einer Konformationsänderung in der Linker-Domäne freigelegt. Diese Konformationsänderung erfolgt aufgrund von mehrstufigen Phosphorylierungsschritten durch unterschiedliche upstream-Kinasen. Die Phosphorylierung von 4 Serinen in der Pseudosubstrat-Domäne ist nötig, damit T389 für die Phosphorylierung durch mTOR (mammalian target of rapamycin) zugänglich gemacht wird. Mutagenesestudien haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von T229, S371 und T389 für die Aktivierung der p70-S6K essentiell sind, wobei T389 (mTOR) die p70-S6K-Aktivität maßgeblich steigert (Magnuson *et al.*, 2012). S371 wird von einer unbekannt Kinase konstitutiv phosphoryliert (Moser *et al.*, 1997; Keshwani *et al.*, 2011). T229 wird durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) phosphoryliert (Alessi *et al.*, 1998; Pullen *et al.*, 1998). Die Verfügbarkeit von Aminosäuren ist ein wichtiger Kontrollpunkt bei der Aktivierung des mTOR/S6K-Signalweges, wobei eine Regulation durch den Tuberöse-Sklerose-Komplex (TSC1/2 bzw. Hamartin/Tuberin) vermutet wird (Abbildung 26, Gao *et al.*, 2002).

PDK1 und AKT/TSC/mTOR unterliegen ihrerseits der Regulation durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die durch eine Vielzahl von Rezeptor-Tyrosinkinasen bzw. Wachstumsfaktoren aktiviert wird.

Neben vielen anderen Wachstumsfaktoren aktivieren der Insulin-like growth factor (IGF-1), epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF) und der keratinocyte growth factor (KGF/FGF7) den PI3K/p70-S6K-Signalweg (Chandrasekher *et al.*, 2001; Klos *et al.*, 2006; Fenton und Gout 2011).

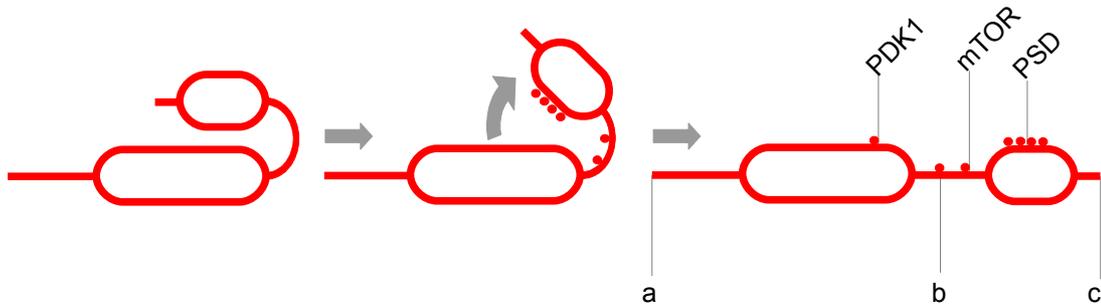


Abbildung 25: Phosphorylierung und Konformationsänderung führen zur Aktivierung der p70-S6K. Wichtige Domänen sind: a: N-Terminus der p70-S6K, **b:** konstitutiv phosphoryliertes S371 in der unstrukturierten Linker-Domäne, **c (502):** C-Terminus, **PDK1** (Phosphoinositid-abhängige Kinase 1): phosphoryliert T229 in der katalytisch aktiven Domäne, **mTOR** (mammalian target of rapamycin): phosphoryliert T389 in der unstrukturierten Linker-Domäne, **PSD:** phosphorylierte Serine S411/418/421/424 in der autoinhibitorischen Pseudosubstratdomäne (modifiziert nach Magnuson *et al.*, 2012).

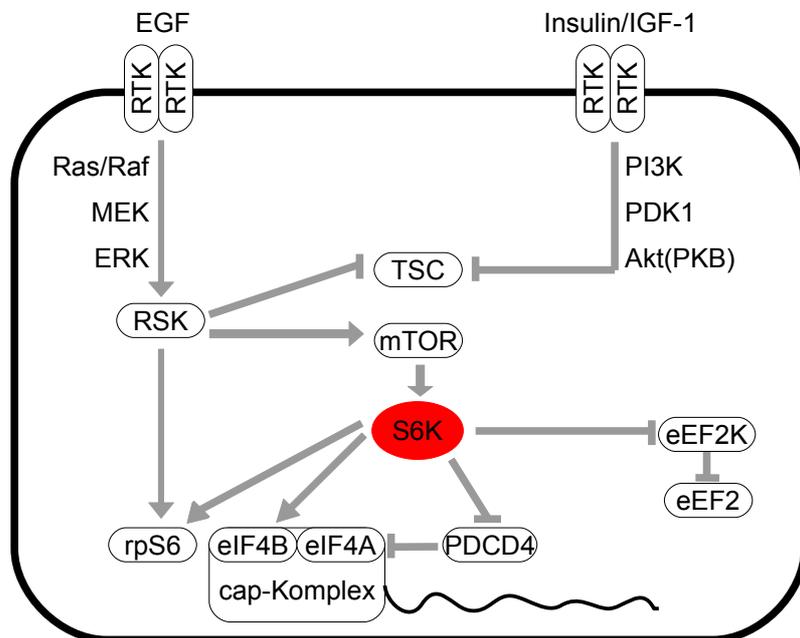


Abbildung 26: Die Funktion der p70-S6-Kinase bei der Translation und aktivierende Signalwege. RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase, **PI3K:** Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), **TSC:** Tuberöse-Sklerose-Komplex, **eIF4A/B:** bei der Translationsinitiation lagern sich neben eIF4A/B die eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF3 und -4G/E im cap-Komplex zusammen, **eEF2:** eukaryotischer Elongationsfaktor 2, **rpS6:** ribosomales Protein S6, **RSK:** ribosomal S6 kinase, (modifiziert nach Anjum und Blenis, 2008; Magnuson *et al.*, 2012).

5.4 Die PKP3/p70-S6-Kinase-Interaktion im physiologischen Kontext

Neben dem positiven Einfluss auf Translation und Zellgröße (Holz *et al.*, 2005; Ruvinsky und Meyuhos, 2006) begünstigt die p70-S6-Kinase auch die Zellzyklusprogression (Fingar *et al.*, 2002) und das Zellüberleben (Harada *et al.*, 2001). Zusätzlich wird eine migrationsfördernde Funktion diskutiert, da die p70-S6-Kinase direkt an F-Aktin binden kann eine Reorganisation der Aktinfilamente bewirkt (Ip und Wong, 2012). Da PKP3 als neues Substrat der p70-S6-Kinase identifiziert wurde, werden womöglich die proliferationsstimulierende Funktion und der Einfluss auf die Zell-Zelladhäsion unter anderem durch PKP3 vermittelt.

Der PKP3-*knockout* in Mäusen beeinträchtigt vor allem Prozesse, die eine hohe Dynamik von Zell-Zellkontakten erfordern, wie z.B. entzündliche Prozesse und den Haarzyklus (Sklyarova *et al.*, 2008). Dazu passt, dass die Bildung von Desmosomen und *adherens junctions* in PKP3-*knockdown* Mauskeratinozyten verlangsamt ist, womöglich aufgrund der beeinträchtigten DSP-Rektutierung in Phase III der Desmosomenbildung (Todorovic *et al.*, 2014; Keil *et al.*, 2016). Die Wundheilung von Epithelien erfordert ebenfalls eine hohe Dynamik von Zell-Zellkontakten. Der Wundverschluss erfordert zum einen die Migration von Zellen aus dem Wundrand in die Defektzone, was eine vorübergehend herabgesetzte Zell-Zelladhäsion erfordert. Zum anderen ist die Nachproduktion von Zellmasse für den Defektverschluss erforderlich. Dies geschieht über die Stimulation der Proteinsynthese und Proliferationsrate in den angrenzenden Zellen. Bei der Wundheilung spielt der IGF/PI3K/S6K-Signalweg eine große Rolle, wie im Mausmodell gezeigt wurde (Yu *et al.*, 2007). In humaner Haut wird die Wundheilung durch den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) stimuliert, der zusammen mit dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) auch die Regeneration von verschiedenen mehrschichtigen humanen Epithelien stimuliert. Diese Stimulation wird durch die p70-S6-Kinase vermittelt (Werner *et al.*, 1992; Marchese *et al.*, 1995; Chandrasekher *et al.*, 2001).

In diesen Epithelien wird auch das p70-S6-Kinase Substrat PKP3 exprimiert (nextBio Body Atlas, <https://www.nextbio.com/b/search/ba.nb> Datenbankzugriff: 20.7.2016).

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die p70-S6-Kinase die Lokalisation und somit die membranständigen und zytoplasmatischen Funktionen von PKP3 reguliert, wird darüber womöglich das Gleichgewicht zwischen Migration und Zell-Zelladhäsion bzw. Proliferation und Kontaktinhibition bei der Wundheilung koordiniert. Es ist denkbar, dass die Stimulation der p70-S6-Kinase mit genannten Wachstumsfaktoren im Kontext der Wundheilung die translations- und proliferativestimulierende Funktion durch Phosphorylierung von PKP3 begünstigt und so Zellmasse für den Defektverschluss bereitstellt. Die Phosphorylierung von PKP3 könnte die Zell-Zelladhäsion vermindern und so die Migration von Zellen aus dem Wundrand in die Defektzone ermöglichen. Der proliferationsstimulierende und migrationsfördernde Einfluss des PI3K/AKT/mTOR/p70S6K-Signalweges fördert die Wundheilung von Magenepithel. Die klinische Relevanz zeigt sich in der Entwicklung (Phase III) eines entsprechenden Medikamentes zur Behandlung des *Ulcus ventriculi* (Kim *et al.*, 2012).

Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten zeigten Neuber *et al.*, dass auch c-Src bzw. EGF-Stimulation durch Phosphorylierung von Y195 die Lokalisation von PKP3 beeinflusst (Neuber *et al.*, 2014). Es ist denkbar, dass die Lokalisation von PKP3 über eine mehrstufige Phosphorylierung durch unterschiedliche Kinasen reguliert wird. Einige dieser Kinasen sind in MCF-7-Zellen womöglich konstitutiv aktiv, weshalb die p70-S6-K-abhängige Phosphorylierung von PKP3 ausschlaggebend für die Lokalisationsänderung ist.

Neben der Wundheilung könnte die Regulation von PKP3 durch die p70-S6-Kinase auch eine Rolle bei der Differenzierung mehrschichtiger Epithelien spielen. In humanen Epithelschnitten lokalisiert PKP3 in basalen Zellschichten vorwiegend zytoplasmatisch und stimuliert dort womöglich Translation und Proliferation, was für diese Zellschicht typisch ist. Dagegen lokalisiert PKP3 in apikaleren Zellschichten eher desmosomal und fördert so womöglich über die Zell-Zelladhäsion die Barrierefunktion dieser Zellschichten (Schmidt *et al.*, 1999; Bonné *et al.*, 2003).

5.5 Regulation von PKP3 durch die p70-S6-Kinase in Tumoren

Die Regulation von Proliferation und Migration ist nicht nur im Kontext der Wundheilung relevant. Unkontrollierte Proliferationssteigerung, Verlust der Kontaktinhibition, geringe Zell-Zelladhäsion und gesteigerte Migrationsfähigkeit im Sinne der Metastasierung sind wesentliche Kriterien maligner Tumoren. Es sind sowohl positive als auch negative Korrelationen des PKP3-Expressionsgrades mit der Migrationsfähigkeit und anderen Malignitätskriterien in verschiedenen Tumoren bekannt (siehe Tabelle 1, ausführlicher in: Hatzfeld *et al.*, 2014). Eine mögliche Erklärung dieser widersprüchlichen Studienlage ist die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation und Funktion von PKP3, welche von Signalwegen abhängt, die in verschiedenen Tumoren unterschiedlich aktiv sind. Es fällt auf, dass Tumorzellen, die besonders invasiv wachsen, vorwiegend zytoplasmatisches PKP3 aufweisen (Papagerakis *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2005; Aigner *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2012). Eine weniger membranständige Lokalisation von PKP3 trägt womöglich ähnlich zur Migrationssteigerung bzw. verminderter Zell-Zelladhäsion bei, wie bereits für PKP1 gezeigt wurde (Wolf *et al.*, 2013). Da die Hypophosphorylierung des 3. Motives eine niedrigere Proliferationsrate als der PKP3-Wildtyp hervorruft, kann geschlossen werden, dass die Proliferation nicht nur vom Expressionsgrad sondern auch wesentlich von der PKP3-Phosphorylierung z.B. durch die p70-S6-Kinase abhängt. Die Rolle von PKP3 als Tumorsuppressor oder Onkogen ist deshalb im Kontext der aktivierten Signalwege zu sehen.

Die konstitutive Aktivierung von Signalwegen, die mit Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation einhergeht, ist eine häufige Eigenschaft von Tumoren. Die p70-S6-Kinase ist in vielen Karzinom-Zelllinien konstitutiv aktiv, was mit einer gesteigerten Proliferation und Migrationsfähigkeit korreliert ist (Kwon *et al.*, 2002). Neben anderen Effektorproteinen kommt aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auch PKP3 als Substrat der p70-S6-Kinase bei der Regulation von Proliferation und Migration in Frage. Die Aktivität der p70-S6-Kinase wird durch upstream-Kinasen im PI3K/PDK1/AKT/mTOR-Signalweg hervorgerufen, die

womöglich unabhängig von PKP3 das Verhalten von Tumoren beeinflussen. In vielen Studien an verschiedenen Tumoren ist jedoch auch der spezifische Einfluss der p70-S6-Kinase auf Proliferation und Migration gezeigt. In Ovarial-, Prostata-, Gallenblasen-, Plattenepithel- und kolorektalem Karzinom sowie in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen ist der PI3K/AKT/mTOR/p70S6K-Signalweg hochreguliert, was Proliferation, Zellüberleben, Migration und Invasivität begünstigt und mitunter zum Verlust von E-Cadherin führt (Zhou und Wong, 2006; Bhola *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2013; Wang H. *et al.*, 2014; Wang Y. *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2016). Diese Effekte werden durch spezifische Hemmung der p70-S6-Kinase auch nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren abgemildert, was die Bedeutung der S6-Kinase in Tumoren unterstreicht (Cho *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2016). Die gezeigte Proliferationssteigerung bzw. verminderte DSP-Rekrutierung, die mit der zytoplasmatischen Lokalisation bzw. Phosphorylierung von PKP3 durch die p70-S6-Kinase einhergeht, ist gut mit anderen Funktionen der S6-Kinase und ihrer Aktivierung *in vivo* bzw. in Tumoren vereinbar. Der p70-S6K-Signalweg ist in Mammakarzinomen insbesondere im Zusammenhang mit Lokalrezidiven hochreguliert, was den in MCF-7-Zellen beobachteten Effekten der PKP3-Phosphorylierung klinische Relevanz verleiht (van der Hage *et al.*, 2004; Segatto *et al.*, 2013).

Die Regulation der Lokalisation und Funktion von Plakophilin3 durch die p70-S6-Kinase könnte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse entscheidend dafür sein, ob PKP3 eine Rolle als Tumorsuppressor oder Onkogen zukommt.

6 Zusammenfassung

Zell-Zelladhäsion, Migration und eine koordinierte Proliferation sind essentielle Prozesse in mehrzelligen eukaryotischen Organismen und ermöglichen z.B. Wachstum, Wundheilung und embryonale Entwicklung.

Die klinische Relevanz einer strengen Regulation zeigt sich angesichts der Dysregulation dieser Zellprozesse z.B. in metastasierenden Tumoren und bei hyperproliferativ-entzündlichen Hauterkrankungen.

Die Plakophiline sind multifunktionelle Proteine mit dualer Lokalisation und erfüllen sowohl strukturelle Funktionen in Zell-Zellkontakten vom desmosomalen Typ, als auch Funktionen bei der Proliferation und Signaltransduktion im Zytoplasma. Ihre Funktionen bei der Zell-Zelladhäsion, Migration und Proliferation unterliegen der Regulation durch Wachstumsfaktoren. Plakophilin3 kommt in nahezu allen untersuchten Wirbeltier-Epithelien vor. Die Korrelationen zwischen Plakophilin3-Expression und der Malignität bzw. Prognose verschiedener Karzinome sind jedoch widersprüchlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die p70-S6-Kinase als Regulator der subzelluläre Lokalisation und Funktionen von Plakophilin3 identifiziert. Die p70-S6-Kinase erfüllt Funktionen bei der Translation, Zellzyklusprogression und Zellmigration. Ihre Aktivierung erfolgt über Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1) und den PI3K/mTOR-Signalweg. Die Interaktion der aktiven p70-S6-Kinase mit Plakophilin3 zeigte sich in der BiFC (bimolekulare Fluoreszenzkomplementation), wobei die Aktivität der kotransfizierten p70-S6-Kinase die Lokalisation von Plakophilin3 beeinflusste. Die direkte Interaktion wurde *in vitro* mittels GST-pulldown gezeigt. Drei Serin-Motive wurden als putative Phosphorylierungsstellen ausgewählt und mittels Mutagenese eine Phosphorylierung bzw. Hypophosphorylierung im jeweiligen Serin-Motiv nachgeahmt.

Die Phosphorylierung im zweiten oder dritten Motiv (S280/283/285, S313/314) führt zu einer vermehrt zytoplasmatischen und weniger desmosomalen Lokalisation von Plakophilin3. Diese Motive sind in Säugetieren konserviert. Roberts *et al.* zeigten, dass nach Phosphorylierung im zweiten Motiv eine 14-3-3-Bindungsstelle entsteht, die über das 14-3-3 σ -Protein (Stratifin) den Austausch zwischen zytoplasmatischen und desmosomalen Plakophilin3-Pool begrenzt.

Plakophilin3 und Desmoplakin ko-lokalisieren unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der drei Motive. Die zytoplasmatische Lokalisation von Plakophilin3 vermindert aber die desmosomale Lokalisation dieses essentiellen Desmosomenbestandteils. Das diskontinuierliche Desmosomenmuster und das Auftreten von Zellzwischenräumen weisen auf einen negativen Einfluss der Plakophilin3-Phosphorylierung auf die Zell-Zelladhäsion hin. Die Phosphorylierung im zweiten oder dritten Motiv bzw. die zytoplasmatische Lokalisation von Plakophilin3 stimuliert die Proliferation, womöglich über die Translation bzw. weitere zytoplasmatische Funktionen von Plakophilin3. Die Hypophosphorylierung dieser Motive senkt demgegenüber die Proliferationsrate und führt zur prominenten desmosomalen (Ko-) Lokalisation von Desmoplakin und Plakophilin3, womöglich als Zeichen verstärkter desmosomaler Zell-Zelladhäsion. Die Phosphorylierung im ersten Motiv (S134/135) erfüllt keine erkennbare lokalisationsregulierende oder proliferationsstimulierende Funktion. Da PKP3 die Translation, Proliferation und Zell-Zelladhäsion beeinflusst, ist seine Regulation durch die p70-S6-Kinase im Kontext der Wundheilung denkbar.

Die Regulation der Funktion bzw. Lokalisation von Plakophilin3 durch die p70-S6-Kinase kann seine Korrelation mit erhöhter Proliferation, verminderter Zell-Zelladhäsion und gesteigerter Migrationsfähigkeit bzw. Metastasierungstendenz in Tumoren erklären. Insbesondere weil die Aktivität der p70-S6-Kinase in vielen Tumoren gesteigert ist. Es kann geschlussfolgert werden, dass die Rolle von Plakophilin3 als Tumorsuppressor oder als Onkogen vom zellulären Kontext und insbesondere von Signalwegen abhängt, welche die Plakophilin3-Phosphorylierung durch die p70-S6-Kinase steuern.

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Elneel K, Ochiishi T, Medina M, Remedi M, Gastaldi L, Caceres A, Kosik KS (2008) A delta-catenin signaling pathway leading to dendritic protrusions. *J Biol Chem.* Nov 21;283(47):32781-91
- Aigner K, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Dampier B, Bonn  S, van Roy F, Mikulits W, Schreiber M, Brabletz T, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A (2007) The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression. *FEBS Lett.* 17;581(8):1617-24
- Al-Amoudi A, Casta o-Diez D, Devos DP, Russell RB, Johnson GT, Frangakis AS (2011) The three-dimensional molecular structure of the desmosomal plaque. *Proc Natl Acad Sci USA.* Apr 19;108(16):6480-5
- Al-Amoudi A, Frangakis AS (2008) Structural studies on desmosomes. *Biochem Soc Trans.* 2008 Apr;36(Pt 2):181-7
- Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J (1998) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol.* 1998 Jan 15;8(2):69-81
- Amador V, Monte E, García-Martínez JL, Prat S (2001) Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila armadillo*. *Cell.* 106 (3):343-54
- Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB (2001) Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol.* 2000 Sep;2(9):637-44
- Anastasiadis PZ, Reynolds AB (2000) The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci.* 2000 Apr;113 (Pt 8):1319-34
- Anjum R, Blenis J (2008) The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Oct;9(10):747-58
- Arimoto K, Burkart C, Yan M, Ran D, Weng S, Zhang DE (2014) Plakophilin-2 promotes tumor development by enhancing ligand-dependent and -independent epidermal growth factor receptor dimerization and activation. *Mol Cell Biol.* 2014 Oct;34(20):3843-54
- Asuri S, Yan J, Parnavitana NC, Quilliam LA (2008) E-cadherin dis-engagement activates the Rap1 GTPase. *J Cell Biochem.* 2008 Nov 1;105(4):1027-37
- Bass-Zubek AE, Hobbs RP, Amargo EV, Garcia NJ, Hsieh SN, Chen X, Wahl JK 3rd, Denning MF, Green KJ (2008) Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol.* May 19;181(4):605-13
- Basu S, Thorat R, Dalal SN (2015) MMP7 is required to mediate cell invasion and tumor formation upon Plakophilin3 loss. *PLoS One.* Apr 13;10(4):e0123979
- Bazzi H, Christiano AM (2007) Broken hearts, woolly hair, and tattered skin: when desmosomal adhesion goes awry. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Oct;19(5):515-20
- Beausoleil SA, Villen J, Gerber SA, Rush J, Gygi SP (2006) A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nat Biotechnol* 24:1285–1292
- Benzinger A, Muster N, Koch HB, Yates JR 3rd, Hermeking H (2005) Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2005 Jun;4(6):785-9
- Bhola NE, Thomas SM, Freilino M, Joyce S, Sahu A, Maxwell J, Argiris A, Seethala R, Grandis JR (2011) Targeting GPCR-mediated p70S6K activity may improve head and neck cancer response to cetuximab. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 1;17(15):4996-5004
- Bonn  S, Gilbert B, Hatzfeld M, Chen X, Green KJ, van Roy F (2003) Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol.* 2003 Apr 28;161(2):403-16

- Bonné S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F (1999) Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci.* Jul;112 (Pt 14):2265-76
- Bornslaeger EA, Godsel LM, Corcoran CM, Park JK, Hatzfeld M, Kowalczyk AP, Green KJ (2001) Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *J Cell Sci.* Feb;114(Pt 4):727-38
- Breuninger S, Reidenbach S, Sauer CG, Ströbel P, Pfitzenmaier J, Trojan L, Hofmann I (2010) Desmosomal plakophilins in the prostate and prostatic adenocarcinomas: implications for diagnosis and tumor progression. *Am J Pathol.* May;176(5):2509-19
- Bujalowski PJ, Nicholls P, Barral JM, Oberhauser AF (2014) Thermally-induced structural changes in an armadillo repeat protein suggest a novel thermosensor mechanism in a molecular chaperone. *FEBS Lett.* Jan 2;589(1):123-30
- Calkins CC, Hoepner BL, Law CM, Novak MR, Setzer SV, Hatzfeld M, Kowalczyk AP (2003) The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):1774-83
- Chandrasekher G, Kakazu AH, Bazan HE (2001) HGF- and KGF-induced activation of PI-3K/p70 s6 kinase pathway in corneal epithelial cells: its relevance in wound healing. *Exp Eye Res.* 2001 Aug;73(2):191-20
- Chen RQ, Yang QK, Lu BW, Yi W, Cantin G, Chen YL, Fearn C, Yates JR 3rd, Lee JD (2009) CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells. *Cancer Res.* 15;69(6):2663-8
- Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ (2002) Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem.* Mar 22;277(12):10512-22
- Cho YR, Kim SH, Ko HY, Kim MD, Choi SW, Seo DW (2011) Sepiapterin inhibits cell proliferation and migration of ovarian cancer cells via down-regulation of p70S6K-dependent VEGFR-2 expression. *Oncol Rep.* 2011 Oct;26(4):861-7
- Choi HJ, Weis WI (2005) Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol.* Feb 11;346(1):367-76
- Cianfarani F, Bernardini S, De Luca N, Dellambra E, Tatangelo L, Tiveron C, Niessen CM, Zambruno G, Castiglia D, Odorisio T (2011) Impaired keratinocyte proliferative and clonogenic potential in transgenic mice overexpressing 14-3-3 σ in the epidermis. *J Invest Dermatol.* Sep;131(9):1821-9
- Coates JC (2003) Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends Cell Biol.* 13 (9):463-71
- Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell.* 94/2:193-204
- Covault J, Liu QY, el-Deeb S (1991) Calcium-activated proteolysis of intracellular domains in the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991 Aug;11(1):11-6
- Daniel JM, Reynolds AB (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol.* May;19(5):3614-23
- Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol.* 2003 Nov 10;163(3):525-34
- Demirag GG, Sullu Y, Yucel I (2012) Expression of Plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in breast cancers. *Med Oncol.* 2012 Sep;29(3):1518-22
- Dusek RL, Getsios S, Chen F, Park JK, Amargo EV, Cryns VL, Green KJ (2006) The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates

- apoptosis in keratinocytes. *J Biol Chem.* Feb 10;281(6):3614-24
- Ersoy-Evans S, Erkin G, Fasshi H, Chan I, Paller AS, Sürücü S, McGrath JA (2006) Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome resulting from a new homozygous mutation, 888delC, in the desmosomal protein plakophilin 1. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Jul;55(1):157-61
- Fang X, Ji H, Kim SW, Park JI, Vaught TG, Anastasiadis PZ, Ciesiolka M, McCrea PD (2004) Vertebrate development requires ARVCF and p120 catenins and their interplay with RhoA and Rac. *J Cell Biol.* 2004 Apr;165(1):87-98
- Fenton TR, Gout IT (2011) Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Jan;43(1):47-59
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J (2002) Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* Jun 15;16(12):1472-8
- Fischer-Kešo R, Breuninger S, Hofmann S, Henn M, Röhrig T, Ströbel P, Stoecklin G, Hofmann I (2014) Plakophilins 1 and 3 bind to FXR1 and thereby influence the mRNA stability of desmosomal proteins. *Mol Cell Biol.* Dec 1;34(23):4244-56
- Furukawa C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Ito T, Tsuchiya E, Sone S, Nakamura Y (2005) Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* Aug 15;65(16):7102-10
- Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D (2002) Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):699-704
- Garrod D, Berika MY, Bardsley WF, Holmes D, Taberner L (2005) Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci.* Dec 15;118(Pt 24):5743-54
- Garrod D, Chidgey M, North A (1996) Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Oct;8(5):670-8
- Garrod D, Chidgey M (2007) Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):572-87. Epub 2007 Aug 9. Review
- Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L (2004) Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2004 Nov;36(11):1162-4
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 1952 12:264-265
- Godsel LM, Dubash AD, Bass-Zubek AE, Amargo EV, Klessner JL, Hobbs RP, Chen X, Green KJ (2010) Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol Biol Cell.* 2010 Aug 15;21(16):2844-59
- Godsel LM, Hsieh SN, Amargo EV, Bass AE, Pascoe-McGillicuddy LT, Huen AC, Thorne ME, Gaudry CA, Park JK, Myung K, Goldman RD, Chew TL, Green KJ (2005) Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *J Cell Biol.* 2005 Dec 19;171(6):1045-59
- Goitre L, Cutano V, Retta SF (2014) Fluorescence microscopy study of Rap1 subcellular localization. *Methods Mol Biol.* 2014;1120:197-205
- Gosavi P, Kundu ST, Khapare N, Sehgal L, Karkhanis MS, Dalal SN (2011) E-cadherin and plakoglobin recruit plakophilin3 to the cell border to initiate desmosome assembly. *Cell Mol Life Sci.* Apr;68(8):1439-54

- Green KJ, Simpson CL (2007) Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol.* 2007 Nov;127(11):2499-515
- Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM (2010) Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Feb;2(2):a000125
- Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, Behrend M, Erdmann B, Franke WW, Birchmeier W (2004) Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol.* 2004 Oct 11;167(1):149-6
- Haase I, Evans R, Pofahl R, Watt FM (2003) Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci.* 2003 Aug 1;116(Pt 15):3227-38
- Hansen S, Tremmel D, Madhurantakam C, Reichen C, Mittl PR, Plückthun A (2016) Structure and Energetic Contributions of a Designed Modular Peptide-Binding Protein with Picomolar Affinity. *J Am Chem Soc.* Mar16;138(10):3526-32
- Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ (2001) p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci USA.* Aug 14;98(17):9666-7
- Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol.* 1988 Mar;106(3):873-81
- Hatzfeld M (1999) The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol.* 186:179-22
- Hatzfeld M (2005) The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol.* Mar;84(2-3):205-14
- Hatzfeld M (2006) Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta.* 1773(1):69-77 Epub 2006 May 6
- Hatzfeld M (2010) A nuclear function for plakophilin-1 in the DNA damage response? *J Invest Dermatol.* Nov;130(11):2538-40
- Hatzfeld M, Green KJ, Sauter H (2003) Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *J Cell Sci.* 2003 Apr 1;116(Pt 7):1219-33
- Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U (2000) The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol.* 2000 Apr 3;149(1):209-22
- Hatzfeld M, Kristjansson GI, Plessmann U, Weber K (1994) Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *J Cell Sci.* 1994 Aug;107 (Pt 8):2259-70
- Hatzfeld M, Nachtsheim C (1996) Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *J Cell Sci.* Nov;109 (Pt 11):2767-78
- Hatzfeld M, Wolf A, Keil R (2014) Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. *Cell Commun Adhes.* 2014 Feb;21(1):25-42
- Heid HW, Schmidt A, Zimbelmann R, Schäfer S, Winter-Simanowski S, Stumpp S, Keith M, Figge U, Schnölzer M, Franke WW (1994) Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation.* 1994 Dec;58(2):113-31
- Hobbs RP, Godsel LM, Green KJ (2013) Response to Garrod. *J Invest Dermatol.* 2013 Feb;133(2):578-9
- Hobbs RP, Green KJ (2012) Desmoplakin regulates desmosome hyperadhesion. *J Invest Dermatol.* 2012 Feb;132(2):482-5

- Hofmann I, Casella M, Schnölzer M, Schlechter T, Spring H, Franke WW (2006) Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules. *Mol Biol Cell*.17(3): 1388-98
- Hofmann I, Mertens C, Brettel M, Nimmrich V, Schnölzer M, Herrmann H (2000) Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci*. Jul;113 (Pt 13):2471-83
- Hogan C, Serpente N, Cogram P, Hosking CR, Bialucha CU, Feller SM, Braga VM, Birchmeier W, Fujita Y (2004) Rap1 regulates the formation of E-cadherin- based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol*. 2004 Aug;24(15):6690-700
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):569-80
- Hosking CR, Ulloa F, Hogan C, Ferber EC, Figueroa A, Gevaert K, Birchmeier W, Briscoe J, Fujita Y (2007) The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin. *Mol Biol Cell*. 2007 May;18(5):1918-27
- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):871-82
- Intong LR, Murrell DF (2012) Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostic criteria and classification. *Clin Dermatol*. 2012 Jan-Feb;30(1):70-7
- Ip CK, Wong AS (2012) p70 S6 kinase and actin dynamics: A perspective. *Spermatogenesis*.1;2(1):44-52
- Iretton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F, Reynolds AB (2002) A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol*. 2002 Nov 11;159(3):465-76
- Ishiyama N, Lee SH, Liu S, Li GY, Smith MJ, Reichardt LF, Ikura M (2010) Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):117-28
- Johnston GC, Pringle JR, Hartwell LH (1977) Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res*. 1977 Mar 1;105(1):79-9
- Kapprell HP, Owaribe K, Franke WW (1988) Identification of a basic protein of Mr 75,000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia. *JCellBiol*;106(5):1679-91
- Kaufmann U, Zuppinger C, Waibler Z, Rudiger M, Urbich C, Martin B, Jockusch BM, Eppenberger H, Starzinski-Powitz A (2000) The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. *J Cell Sci*. 2000 Nov;113 (Pt 22):4121-35
- Keil R, Rietscher K, Hatzfeld M (2016) Antagonistic Regulation of Intercellular Cohesion by Plakophilins 1 and 3. *J Invest Dermatol*. 2016 Oct;136(10):2022-9
- Keim-Janssen SA (2008) Desmosome disassembly during TGF-beta induced epithelial to mesenchymal transition. University of Nebraska Medical Center, 183 Seiten
- Kerppola TK (2008) Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods Cell Biol*. 2008;85:431-7
- Keshwani MM, von Daake S, Newton AC, Harris TK, Taylor SS (2011) Hydrophobic motif phosphorylation is not required for activation loop phosphorylation of p70 ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1). *J Biol Chem*. Jul 1;286(26):23552-8
- Kettenbach AN, Schweppe DK, Faherty BK, Pechenick D, Pletnev AA, Gerber SA (2011) Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of aurora and polo-like kinase

activities in mitotic cells. *Sci Signal* 4rs5

- Khapare N, Kundu ST, Sehgal L, Sawant M, Priya R, Gosavi P, Gupta N, Alam H, Karkhanis M, Naik N, Vaidya MM, Dalal SN (2012) Plakophilin3 loss leads to an increase in PRL3 levels promoting K8 dephosphorylation, which is required for transformation and metastasis. *PLoS One*. 7(6):e38561
- Kidd AR 3rd, Miskowski JA, Siegfried KR, Sawa H, Kimble J (2005) A beta-catenin identified by functional rather than sequence criteria and its role in Wnt/MAPK signaling. *Cell*. Jun 3;121(5):761-72
- Kießling C (2014) Die Funktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in der Regulation der Translation. Halle (Saale), Univ., Nat. Fak.I, 2014, 122 Seiten
- Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, Sowa ME, Rad R, Rush J, Comb MJ, Harper JW, Gygi SP (2011) Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell*. 2011 Oct 21;44(2):325-40
- Kim YW, Lee WH, Choi SM, Seo YY, Ahn BO, Kim SH, Kim SG (2012) DA6034 promotes gastric epithelial cell migration and wound-healing through the mTOR pathway. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Feb;27(2):397-405
- Klammer M, Kaminski M, Zedler A, Oppermann F, Blencke S, Marx S, Müller S, Tebbe A, Godl K, Schaab C (2012) Phosphosignature predicts dasatinib response in non-small cell lung cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Sep;11(9):651-68
- Klos KS, Wyszomierski SL, Sun M, Tan M, Zhou X, Li P, Yang W, Yin G, Hittelman WN, Yu D (2006) ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006 Feb 15;66(4):2028-37
- Koutras C, Lessard CB, Lévesque G (2011) A nuclear function for the presenilin 1 neuronal partnerNPRAP/δ-catenin. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(2):307-16
- Kowalczyk AP, Hatzfeld M, Bornslaeger EA, Kopp D, Borgwardt JE, Corcoran CM, Settler A, Green KJ (1999) The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *JBiolChem*. Jun 25;274(26):18145 -8
- Kröger C, Loschke F, Schwarz N, Windoffer R, Leube RE, Magin TM (2013) Keratins control intercellular adhesion involving PKC-α-mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol*. 2013 May 27;201(5):681-92
- Kundu ST, Gosavi P, Khapare N, Patel R, Hosing AS, Maru GB, Ingle A, Decaprio JA, Dalal SN (2008) Plakophilin3 downregulation leads to a decrease in cell adhesion and promotes metastasis. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15;123(10):2303-14
- Kwon HK, Bae GU, Yoon JW, Kim YK, Lee HY, Lee HW, Han JW (2002) Constitutive activation of p70S6k in cancer cells. *Arch Pharm Res*. 2002 Oct;25(5):685-90
- Leal P, Garcia P, Sandoval A, Buchegger K, Weber H, Tapia O, Roa JC (2013) AKT/mTOR substrate P70S6K is frequently phosphorylated in gallbladder cancer tissue and cell lines. *Onco Targets Ther*. 2013 Oct 3;6:1373-84
- Lee M, Ji H, Furuta Y, Park JI, McCrea PD (2014) p120-catenin regulates REST and CoREST, and modulates mouse embryonic stem cell differentiation. *J Cell Sci*. 2014 Sep 15;127(Pt 18):4037-51
- Lewis JE, Wahl JK 3rd, Sass KM, Jensen PJ, Johnson KR, Wheelock MJ (1997) Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J Cell Biol*. Feb 24;136(4):919-34
- Liu M, Howes A, Lesperance J, Stallcup WB, Hauser CA, Kadoya K, Oshima RG, Abraham RT (2005) Antitumor activity of rapamycin in a transgenic mouse model of ErbB2-dependent human breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Jun 15;65(12):5325-36

- Liu J, Phillips BT, Amaya MF, Kimble J, Xu W (2008) The *C. elegans* SYS-1 protein is a bona fide beta-catenin. *Dev Cell*. 2008 May;14(5):751-61
- Loschke F, Homberg M, Magin TM (2016) Keratin Isotypes Control Desmosome Stability and Dynamics through PKC α . *J Invest Dermatol*. Jan;136(1):202-13
- Lu Q, Paredes M, Medina M, Zhou J, Cavallo R, Peifer M, Orecchio L, Kosik KS (1999) delta-catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. *J Cell Biol*. 8;144(3):519-32
- Ma XM, Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 May;10(5):307-18
- Madeira F, Tinti M, Murugesan G, Berrett E, Stafford M, Toth R, Cole C, MacKintosh C, Barton GJ (2015) 14-3-3-Pred: improved methods to predict 14-3-3-binding phosphopeptides. *Bioinformatics*. 2015 Jul 15;31(14):2276-83
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC (2012) Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *BiochemJ*. Jan 1;441(1):1-21
- Marchese C, Chedid M, Dirsch OR, Csaky KG, Santanelli F, Latini C, LaRoche WJ, Torrisi MR, Aaronson SA (1995) Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1369-76
- Mariner DJ, Wang J, Reynolds AB (2000) ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120(ctn) in E-cadherin complexes. *J Cell Sci*. Apr;113(Pt8):1481-90
- Mattey DL, Garrod DR (1986) Calcium-induced desmosome formation in cultured kidney epithelial cells. *J Cell Sci*. 1986 Sep;85:95-111
- McGrath JA, McMillan JR, Shemanko CS, Runswick SK, Leigh IM, Lane EB, Garrod DR, Eady RA (1997) Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet*. 1997 Oct;17(2):240-4
- Mertens C, Hofmann I, Wang Z, Teichmann M, Sepelchik S, Schnölzer M, Franke WW (2001) Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jul 3;98(14):7795-800
- Mertens C, Kuhn C, Franke WW (1996) Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol*. 1996 Nov;135(4):1009-25
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *GenomeBio* 3ReviewS0004
- Moritz A, Li Y, Guo A, Villén J, Wang Y, MacNeill J, Kornhauser J, Sprott K, Zhou J, Possemato A, Ren JM, Hornbeck P, Cantley LC, Gygi SP, Rush J, Comb MJ (2010) Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Sci Signal*. 2010 Aug 24;3(136)
- Moser BA, Dennis PB, Pullen N, Pearson RB, Williamson NA, Wettenhall RE, Kozma SC, Thomas G (1997) Dual requirement for a newly identified phosphorylation site in p70s6k. *Mol. Cell. Biol*. September 1997 17 9 5648-5655
- Mühmer M, Ditthardt D, Jäkel J, Wischmann V, Moll R, Schmidt A (2014) An alternative promoter of the human plakophilin-3 gene controls the expression of the new isoform PKP3b. *Cell Tissue Res*. 2014 Jan;355(1):143-62
- Müller J, Ritt DA, Copeland TD, Morrison DK (2003) Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *EMBO J*. Sep 1;22(17):4431-42
- Munoz WA, Kloc M, Cho K, Lee M, Hofmann I, Sater A, Vleminckx K, McCrea PD (2012) Plakophilin-3 is required for late embryonic amphibian development, exhibiting roles in ectodermal and neural tissues. *PLoS One*. 2012;7(4):e34342
- Munoz WA, Lee M, Miller RK, Ahmed Z, Ji H, Link TM, Lee GR, Kloc M, Ladbury JE, McCrea PD (2014)

- Plakophilin-3 catenin associates with the ETV1/ER81 transcription factor to positively modulate gene activity. *PLoS One*. 2014 Jan 27;9(1):e86784
- Nekrasova OE, Amargo EV, Smith WO, Chen J, Kreitzer GE, Green KJ (2011) Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes. *JCellBiol*. Dec 26;195(7):1185-203
- Neuber S, Jäger S, Meyer M, Wischmann V, Koch PJ, Moll R, Schmidt A (2014) c-Src mediated tyrosine phosphorylation of plakophilin 3 as a new mechanism to control desmosome composition in cells exposed to oxidative stress. *Cell Tissue Res*. 2015 Mar;359(3):799-81
- Nishioka T, Nakayama M, Amano M, Kaibuchi K (2012) Proteomic screening for Rho-kinase substrates by combining kinase and phosphatase inhibitors with 14-3-3 ζ affinity chromatography. *Cell Struct Funct* 2012 37, 39-48
- Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M (1987) Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *EMBO J*. 1987 Dec 1;6(12):3655-61
- Otomo T, Otomo C, Tomchick DR, Machius M, Rosen MK (2005) Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. *Mol Cell*. 2005 Apr 29;18(3):273-81
- Paffenholz R, Franke WW (1997) Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation*. 1997 Aug;61(5):293-304
- Papagerakis S, Shabana AH, Depondt J, Gehanno P, Forest N (2003) Immunohistochemical localization of plakophilins (PKP1, PKP2, PKP3, and p0071) in primary oropharyngeal tumors: correlation with clinical parameters. *Hum Pathol*. 2003 Jun;34(6):565-72
- Patel GK, Wilson CH, Harding KG, Finlay AY, Bowden PE (2006) Numerous keratinocyte subtypes involved in wound re-epithelialization. *J Invest Dermatol*. 2006 Feb;126(2):497-502
- Peifer M, Berg S, Reynold AB (1994) A Repeating Amino Acid Motif Shared by Proteins with Diverse Cellular Roles *Cell*, Vol. 76, 769-791, March 11, 1994
- Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S (1985) Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods*. Sep 3;82(1):169-79
- Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G (1998) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*. Jan 30;279 (5351):707-10
- Qiu ZX, Sun RF, Mo XM, Li WM (2016) The p70S6K Specific Inhibitor PF-4708671 Impedes Non-Small Cell Lung Cancer Growth. *PLoS One*. Jan 15;11(1):e0147185
- Rappe U, Schlechter T, Aschoff M, Hotz-Wagenblatt A, Hofmann I (2014) Nuclear ARVCF protein binds splicing factors and contributes to the regulation of alternative splicing. *J Biol Chem*. 2014 May 2;289(18):12421-34
- Raychaudhuri K, Gurjar M, Dalal SN (2015) Plakophilin3 and Plakoglobin recycling are differentially regulated during the disassembly of desmosomes. *J Biosci Tech*, Vol 6(1), 2015, 634-642
- Reichen C, Hansen S, Plückthun A (2013) Modular peptide binding: from a comparison of natural binders to designed armadillo repeat proteins. *J Struct Biol*. Feb;185(2):147-62 Epub 2013 Aug 3
- Reichen C, Madhurantakam C, Plückthun A, Mittl PR (2014) Crystal structures of designed armadillo repeat proteins: implications of construct design and crystallization conditions on overall structure. *Protein Sci*. Nov;23(11):1572-83
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994) Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol*. 1994 Dec;14(12):8333-42
- Reynolds AB, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Shapiro DN, Wu J, Daniel JM (1996) The gene

- encoding p120cas, a novel catenin, localizes on human chromosome 11q11 (CTNND) and mouse chromosome 2 (Catns). *Genomics*. Jan 1;31(1):127-9
- Rietscher K, Wolf A, Hause G, Rother A, Keil R, Magin TM, Glass M, Niessen CM, Hatzfeld M (2016) Growth Retardation, Loss of Desmosomal Adhesion, and Impaired Tight Junction Function Identify a Unique Role of Plakophilin 1 In Vivo. *J Invest Dermatol*. 2016 Jul;136(7):1471-8
- Riggelman B, Wieschaus E, Schedl P (1989) Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev*. 1989 Jan;3(1):96-113
- Ringwald M, Schuh R, Vestweber D, Eistetter H, Lottspeich F, Engel J, Dölz R, Jähmig F, Epplen J, Mayer S (1987) The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *EMBO J*. 1987 Dec 1;6(12):3647-53
- Rios-Doria J, Kuefer R, Ethier SP, Day ML (2004) Cleavage of beta-catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells. *Cancer Res*. Oct 15;64(20):7237-40
- Rittinger K, Budman J, Xu J, Volinia S, Cantley LC, Smerdon SJ, Gambin SJ, Yaffe MB (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell*. 1999 Aug;4(2):153-66
- Roberts BJ, Reddy R, Wahl JK 3rd (2013) Stratifin (14-3-3 σ) limits plakophilin-3 exchange with the desmosomal plaque. *PLoS One*. 2013 Oct 4;8(10):e77012
- Rosner M, Hengstschläger M (2011) Nucleocytoplasmic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR. *Oncogene*. 2011 Nov 3;30(44):4509-22
- Rosner M, Schipany K, Hengstschläger M (2011) p70 S6K1 nuclear localization depends on its mTOR-mediated phosphorylation at T389, but not on its kinase activity towards S6. *Amino Acids*. 2012 Jun;42(6):2251-6
- Ruvinsky I, Meyuhas O (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*. 2006 Jun;31(6):342-8
- Santel A, Frank S (2008) Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 60(7):448-55
- Schmidt A, Jäger S (2005) Plakophilins - hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *Eur J Cell Biol*. 2005 Mar;84(2-3):189-204
- Schmidt A, Langbein L, Prätzel S, Rode M, Rackwitz HR, Franke WW (1999) Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation*. Jun;64(5):291-306
- Schmidt A, Langbein L, Rode M, Prätzel S, Zimbelmann R, Franke WW (1997) Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res*. 1997 Dec;290(3):481-99
- Schwarz MA, Owaribe K, Kartenbeck J, Franke WW (1990) Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:461-91
- Segatto I, Berton S, Sonogo M, Massarut S, D'Andrea S, Perin T, Fabris L, Armenia J, Rampioni G, Lovisa S, Schiappacassi M, Colombatti A, Bristow RG, Vecchione A, Baldassarre G, Belletti B (2013) Inhibition of breast cancer local relapse by targeting p70S6 kinase activity. *J MolCellBiol* 5(6):428-3
- Setzer SV, Calkins CC, Garner J, Summers S, Green KJ, Kowalczyk AP (2004) Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of a431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration. *J Invest Dermatol*. 2004 Sep;123(3):426-33
- Simmermacher S (2012) Expression der Plakophiline in Melanomzellen und Analyse morphologischer und funktioneller Veränderungen nach der Überexpression von Plakophilin 2. Halle (Saale), Univ.,

- Sirotkin H, O'Donnell H, DasGupta R, Halford S, St Jore B, Puech A, Parimoo S, Morrow B, Skoultchi A, Weissman SM, Scambler P, Kucherlapati R (1997) Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics*. Apr 1;41(1):75-83
- Sklyarova T, Bonn e S, D'Hooge P, Denecker G, Goossens S, De Rycke R, Borgonie G, B osl M, van Roy F, van Hengel J (2008) Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol*. 2008 Jun;128(6):1375-85
- Smith EA, Fuchs E (1998) Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol*. 1998 Jun 1;141(5):1229-41
- Smith C, Zhu K, Merritt A, Picton R, Youngs D, Garrod D, Chidgey M (2004) Regulation of desmocollin gene expression in the epidermis: CCAAT/enhancer-binding proteins modulate early and late events in keratinocyte differentiation. *Biochem J*. 2004 Jun 15;380(Pt 3):757-6
- Sobolik-Delmaire T, Katafiasz D, Wahl JK 3rd (2006) Carboxyl terminus of Plakophilin-1 recruits it to plasma membrane, whereas amino terminus recruits desmoplakin and promotes desmosome assembly. *J Biol Chem*. Jun 23;281(25):16962-70
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. Nov;51(5):1409-16
- South AP, Wan H, Stone MG, Dopping-Hepenstal PJ, Purkis PE, Marshall JF, Leigh IM, Eady RA, Hart IR, McGrath JA (2003) Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *J Cell Sci*. 2003 Aug 15;116(Pt 16):3303-1
- Stokes DL (2007) Desmosomes from a structural perspective. *Curr Opin Cell Biol*. Oct;19(5):565-71
- Striegl H, Andrade-Navarro MA, Heinemann U (2010) Armadillo motifs involved in vesicular transport. *PLoS One*. 2010 Feb 1;5(2):e8991
- Takahashi H, Nakatsuji H, Takahashi M, Avirmed S, Fukawa T, Takemura M, Fukumori T, Kanayama H (2012) Up-regulation of plakophilin-2 and Down-regulation of plakophilin-3 are correlated with invasiveness in bladder cancer. *Urology*. 2012 Jan;79(1):240.e1-8
- Tariq H, Bella J, Jowitt TA, Holmes DF, Rouhi M, Nie Z, Baldock C, Garrod D, Taberner L (2015) Cadherin flexibility provides a key difference between desmosomes and adherens junctions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Apr 28;112(17):5395-400
- Todorovic V, Koetsier JL, Godsel LM, Green KJ (2014) Plakophilin 3 mediates Rap1-dependent desmosome assembly and adherens junction maturation. *Mol BiolCell*. Nov 15;25(23):3749-6
- Tucker DK, Stahley SN, Kowalczyk AP (2014) Plakophilin-1 protects keratinocytes from pemphigus vulgaris IgG by forming calcium-independent desmosomes. *J Invest Dermatol*. 134(4):1033-43
- van der Hage JA, van den Broek LJ, Legrand C, Clahsen PC, Bosch CJ, Robanus-Maandag EC, van de Velde CJ, van de Vijver MJ (2004) Overexpression of P70 S6 kinase protein is associated with increased risk of locoregional recurrence in node-negative premenopausal early breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2004 Apr 19;90(8):1543-50
- van der Velden AW, Thomas AA (1999) The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jan;31(1):87-106
- Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Sch olz C, Kelstrup CD, Young C, Nielsen ML, Olsen JV, Brakebusch C, Choudhary C (2012) Proteomic analyses reveal divergent ubiquitylation site patterns in murine tissues. *MolCellProteomics*. 11(12):1578-85
- Wallis S, Lloyd S, Wise I, Ireland G, Fleming TP, Garrod D (2000) The alpha isoform of protein kinase C is

- involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2000 Mar;11(3):1077-92
- Wang H, Duan L, Zou Z, Li H, Yuan S, Chen X, Zhang Y, Li X, Sun H, Zha H, Zhang Y, Zhou L (2014) Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway is involved in S100A4-induced viability and migration in colorectal cancer cells. *Int J Med Sci*. 2014 Jun 8;11(8):841-9
- Wang W, Amagai M, Ishiko A (2009) Desmosome splitting is a primary ultrastructural change in the acantholysis of pemphigus. *J Dermatol Sci*. 2009 Apr;54(1):59-61
- Wang Y, Zhou D, Chen S (2014) SGK3 is an androgen-inducible kinase promoting prostate cancer cell proliferation through activation of p70 S6 kinase and up-regulation of cyclin D1. *Mol Endocrinol*. 2014 Jun;28(6):935-48
- Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O (2001) The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem*. Nov 2;276(44):41175-8
- Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT (1992) Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA*. Aug 1;89(15):6896-900
- Wieschaus E, Riggleman R (1987) Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during *Drosophila* embryogenesis. *Cell*. Apr 24;49(2):177-84
- Wilker EW, Grant RA, Artim SC, Yaffe MB (2005) A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):18891-8
- Wolf A, Hatzfeld M (2010) A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell Cycle*. 2010 Aug 1;9(15):2973-8
- Wolf A, Keil R, Götzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, Hüttelmaier S, Hatzfeld M (2006) The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol*. Dec;8(12):1432-40
- Wolf A, Krause-Gruszczynska M, Birkenmeier O, Ostareck-Lederer A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M (2010) Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *J Cell Biol*. Feb;188(4): 463-71
- Wolf A, Rietscher K, Glaß M, Hüttelmaier S, Schutkowski M, Ihling C, Sinz A, Wingenfeld A, Mun A, Hatzfeld M (2013) Insulin signaling via Akt2 switches plakophilin 1 function from stabilizing cell adhesion to promoting cell proliferation. *J Cell Sci*. 2013 Apr 15;126(Pt 8):1832-44
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*. 1997 Dec 26;91(7):961-71
- Yu DH, Mace KA, Hansen SL, Boudreau N, Young DM (2007) Effects of decreased insulin-like growth factor-1 stimulation on hypoxia inducible factor 1-alpha protein synthesis and function during cutaneous repair in diabetic mice. *Wound Repair Regen*. 2007 Sep-Oct;15(5):628-35
- Zanivan S, Gnad F, Wickström SA, Geiger T, Macek B, Cox J, Fässler R, Mann M (2008) Solid tumor proteome and phosphoproteome analysis by high resolution mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2008 Dec;7(12):5314-26
- Zhou HY, Wong AS (2006) Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells. *Endocrinology*. May;147(5):2557-66

8 Thesen

1. Die Plakophiline sind multifunktionelle Proteine mit dualer Lokalisation, die sowohl strukturelle Funktionen in Desmosomen, als auch Funktionen bei der Proliferation, Translation und Signaltransduktion im Zytoplasma haben. Ihre Funktionen bzw. subzelluläre Lokalisation werden *in vivo* durch Wachstumsfaktoren reguliert.
2. Die p70-S6-Kinase ist ein bedeutender Effektor im Wachstumsfaktorsignalweg und kann Plakophilin3 *in vitro* an drei Serin-Motiven phosphorylieren. Die Phosphorylierung von Plakophilin3 reguliert seine Funktionen und subzelluläre Lokalisation.
3. Die Phosphorylierung im zweiten oder dritten Motiv (S^{280/283/285}/S^{313/314}) führt zu einer vermehrt zytoplasmatischen und weniger desmosomalen Lokalisation von Plakophilin3. Die Phosphorylierung im ersten Motiv (S^{134/135}) erfüllt zumindest in HeLa- und MCF-7-Zellen keine lokalisationsregulierende Funktion.
4. Die Ko-lokalisation von Plakophilin3 mit Desmoplakin wird durch die Phosphorylierungen nicht beeinträchtigt, die zytoplasmatische Lokalisation von Plakophilin3 vermindert aber die desmosomale Lokalisation dieses essentiellen Desmosomenbestandteils. Das diskontinuierliche Desmosomenmuster und das Auftreten von Zellzwischenräumen weisen auf einen negativen Einfluss der Plakophilin3-Phosphorylierung auf die Zell-Zelladhäsion hin.
5. Es wurde kein wesentlicher Einfluss der Plakophilin3-Phosphorylierung auf die Organisation der Aktinfilamente in HeLa- oder MCF-7-Zellen gefunden.
6. Die Phosphorylierung im zweiten oder dritten Motiv bzw. die zytoplasmatische Lokalisation von Plakophilin3 stimuliert die Proliferation und womöglich weitere zytoplasmatische Funktionen.
7. Die Hypophosphorylierung von Plakophilin3 im zweiten oder dritten Motiv senkt demgegenüber die Proliferationsrate und führt zur prominenten desmosomalen (Ko)lokalisierung von Desmoplakin und Plakophilin3.
8. Die Regulation der Funktion bzw. Lokalisation von Plakophilin3 durch die p70-S6-Kinase kann seine Korrelation mit erhöhter Proliferation, verminderter Zell-Zelladhäsion und gesteigerter Migrationsfähigkeit bzw. Metastasierungstendenz in Tumoren erklären.
9. Ob Plakophilin3 eine Rolle als Tumorsupressor oder Onkogen zukommt, hängt vom zellulären Kontext und insbesondere von Signalwegen ab, welche die PKP3-Phosphorylierung durch die p70-S6-Kinase steuern.

9 Anhang

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung	Medium	für
α -Desmoplakin (I&II)	mouse	Progen	1:100	Milchblockpuffer	IF
α -FLAG	mouse	Sigma	1:750	Milchblockpuffer	BiFC
α -HA	rabbit	Rockland	1:500	Milchblockpuffer	BiFC
α -DsRed	rabbit	Clontech	1:500	1 %(m/v) BSA /PBS	BrdU
α -BrdU Klon BU-33	mouse	Sigma	1:250	1 %(m/v) BSA /PBS	BrdU
α -His ₆	mouse	Roche	1:3000	5 %(m/v) Milchpulver/TBST	ID
α -GST	mouse	BD	1:3000	5 %(m/v) Milchpulver/TBST	ID
α -PKP3	mouse	Santa Cruz	1:750	5 %(m/v) Milchpulver/TBST	ID
α -S6K	rabbit	Cell Signaling	1:1000	1 %(m/v) BSA /TBST	ID

Tabelle 14: verwendete Primärantikörper IF=Immunfluoreszenz (3.2.3); BiFC=Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (3.2.4); BrdU=Zellproliferationstest mittels BrdU-Einbau (3.2.5); ID=Immundetektion (3.3.5).

Antikörper	Firma	Verdünnung	Medium	für
α -mouse Dylight488	Thermo Scientific	1:250	Milchblockpuffer	IF
α -mouse Dylight594	Thermo Scientific	1:250	Milchblockpuffer	IF
α -mouse Cy3	Dianova	1:750	Milchblockpuffer	BiFC
α -rabbit Cy3	Dianova	1:750	Milchblockpuffer	BiFC
α -mouse Dylight649	Thermo Scientific	1:250	Milchblockpuffer	BiFC
α -rabbit Dylight649	Thermo Scientific	1:250	Milchblockpuffer	BiFC
α -rabbit Cy3	Dianova	1:750	1 %(m/v) BSA /PBS	BrdU
α -mouse Dylight488	Thermo Scientific	1:250	1 %(m/v) BSA /PBS	BrdU
α -mouse Meerrettichperoxidase	Dianova	1:20000	5 %(m/v) Milchpulver/TBST	ID
α -rabbit Meerrettichperoxidase	Dianova	1:40000	5 %(m/v) Milchpulver/TBST	ID

Tabelle 15: verwendete Sekundärantikörper.

Vektor	Firma / Hersteller	Selektionsantibiotikum
pDsRed1-N1	Clontech	Kanamycin
pDsRed1-N1 PKP3-wt	AG Hatzfeld	Kanamycin
pEGFP-C2	Clontech	Kanamycin
pCR 2.1.TOPO-TA	Invitrogen	Ampicillin
pCR 2.1.TOPO-TA PKP3-wt	AG Hatzfeld	Ampicillin
pGEX-5x1	Amersham GE Healthcare	Ampicillin
pGEX-5x1 PKP3-wt	AG Hatzfeld	Ampicillin
pRSET A	Invitrogen	Ampicillin
pRSET A S6K-wt	AG Hatzfeld	Ampicillin
pRSET A S6K T 389 →E	AG Hatzfeld	Ampicillin
pVen1-FLAGPKP3-wt	AG Hatzfeld	Kanamycin
pVen2-HA S6K-wt	AG Hatzfeld	Kanamycin
pVen2-HA S6K T 389 →A	AG Hatzfeld	Kanamycin
pVen2-HA S6K T 389 →E	AG Hatzfeld	Kanamycin

Tabelle 16: verwendete Plasmide.

Primerbeschreibung	Primersequenz (mutierte Triplets fettgedruckt)
S 134/135 →A forward	GC AGT CGG AGG CTG GCT GCA GCC CAC AAC GGG GG
S 134/135 →A reverse	CC CCC GTT GTG GGC TGC AGC CAG CCT CCG ACT GC
S 134/135 →E forward	GC AGT CGG AGG CTG GAG GAG GCC CAC AAC GGG GG
S 134/135 →E reverse	CC CCC GTT GTG GGC CTC CTC CAG CCT CCG ACT GC
S 280 →A forward	GTG GCT CGA GCG CCA GCT GTG CGC AGC CTC AGC
S 280 →A reverse	GCT GAG GCT GCG CAC AGC TGG CGC TCG AGC CAC
S 280 →E forward	GTG GCT CGA GCG CCA GAA GTG CGC AGC CTC AGC
S 280 →E reverse	GCT GAG GCT GCG CAC TTC TGG CGC TCG AGC CAC
S 280/283/285 →A forward	CCA GCT GTG CGC GCC CTC GCC CTC AGC CTG GCT
S 280/283/285 →A reverse	AGC CAG GCT GAG GGC GAG GGC GCG CAC AGC TGG
S 280/283/285 →E forward	CCA GAA GTG CGC GAG CTC GAG CTC AGC CTG GCT
S 280/283/285 →E reverse	AGC CAG GCT GAG CTC GAG CTC GCG CAC TTC TGG
S 313/314 →A forward	CGA ACC CTG CAG AGA CTC GCG GCC GGT TTT GAT GAC ATT G
S 313/314 →A reverse	C AAT GTC ATC AAA ACC GGC CGC GAG TCT CTG CAG GGT TCG
S 313/314 →E forward	CGA ACC CTG CAG AGA CTC GAG GAG GGT TTT GAT GAC ATT G
S 313/314 →E reverse	C AAT GTC ATC AAA ACC CTC CTC GAG TCT CTG CAG GGT TCG

Tabelle 17: verwendete Primer, Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Restriktions- endonukleasen	Erkennungssequenz für Restriktionsverdau
<i>BseR I</i>	GAGGAGN_
<i>Bsp 1407 I (BsrGI)</i>	T_ GTACA
<i>BsiW I (Pfi23 II)</i>	C_ GTACG
<i>EcoR I</i>	G_ AATTC
<i>Eco52 I (XmaIII)</i>	C_ GGCCG
<i>Fsp I (NsbI)</i>	TGC_ GCA
<i>Sal I</i>	G_ TCGAC
<i>Xmn I (PdmI)</i>	GAANN_ NNTTC

Tabelle 18: Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen. N: Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) oder Cytosin (C); der Unterstrich zeigt die Restriktionsschnittstelle.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
5x TBE	445 mM TRIS/HCl pH 8,0; 445 mM H ₃ BO ₃ ; 10 mM EDTA
5x KCM	0,5 M KCl; 0,15 M CaCl ₂ ; 0,25 M MgCl ₂
LB-Medium	5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; pH 7,0
LB-Agar	20 g Agar pro 1 l LB-Medium
Lösung A	50 mM Glucose; 25 mM TRIS pH 8,8; 10 mM EDTA
Lösung B	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Lösung C	30 ml 5 M CH ₃ COOK; 5,75 ml CH ₃ COOH; 14,25 ml ddH ₂ O
10x PBS(E)	1,35M NaCl; 25mM KCl; 10mM KH ₂ PO ₄ ; 100 mM Na ₂ HPO ₄ ; (5 mM EDTA); pH 7,4
Formaldehyd-lösung	3,7 %(w/v) Paraformaldehyd; 10 %(v/v) 10x PBS pH 7,3; ddH ₂ O
Milchblockpuffer	1 %(w/w) Magermilchpulver in PBS, unlösliche Bestandteile werden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 6000rpm entfernt.
MT-Puffer	100 mM PIPES pH 6,9; 2 mM EDTA; 1 mM EGTA; 4 M Glycerol; 0,5 %(v/v) Triton X-100
Mowiol	5 %(w/v) Mowiol; 30 %(v/v) Glycerol; 0,25 %(w/v) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
BSA-Puffer	1 %(m/v) BSA (Sigma); 0,1 %(v/v) Triton X-100; PBS
2xYT-Medium	10 g/l Hefeextrakt; 16 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; pH 7,2
Lysepuffer	50 mM TRIS/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 mM DTT; Proteaseinhibitoren: 1 mM Pefabloc; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin; DTT und Proteaseinhibitoren frisch zugesetzt
4x SDS-Probenpuffer	8 %(w/v) SDS; 250 mM TRIS/HCl pH 6,8; 30 %(v/v) Glycerol; 10 %(v/v); β-Mercaptoethanol; 0,25 %(v/v) Bromphenolblau
Elektrophorese-puffer	25 mM TRIS/HCl pH 8,8; 132 mM Glycerol; 0,1 %(v/v) SDS
10x Ponceau-Rot	2 %(w/v) Ponceau S; 30 %(w/v) Trichloressigsäure; 30 %(w/v) 5-Sulfosalicylsäure
10x TBST	100mM TRIS/HCl pH 7,6; 1mM NaCl; 1 %(v/v) Tween-20
CL-Lösung I	5 ml 1M TRIS/HCl pH 8,5; 225 µl Cumarinsäurenlösung (0,3 g/20 ml Dimethylsulfoxid); 500 µl Luminollösung (0,8 g/20ml DMSO); 45ml ddH ₂ O
CL-Lösung II	5 ml 1 M TRIS/HCl pH 8,5; 30 µl H ₂ O ₂ ; 45 ml ddH ₂ O

Tabelle 19: Verwendete Puffer und Lösungen Insofern nicht anders angegeben, wurden die Puffer und Lösungen von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Lösungen für die Zellkultur wurden von (PAA, Cölbe) bezogen. PCR-Puffer für *Pfu*-Polymerase wurde von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen, 6x DNA-Ladepuffer von ThermoFisherScientific (Waltham). Die verwendeten Blotpuffer (I -III) enthalten 20 %(v/v) Methanol und sind wie folgt mit TRIS/HCl gepuffert: I: 0,3 M pH 10,4; II: 25 mM pH 10,4; III: 25mM pH 9,4. Blotpuffer III enthält 40 mM ε-Aminocapronsäure.

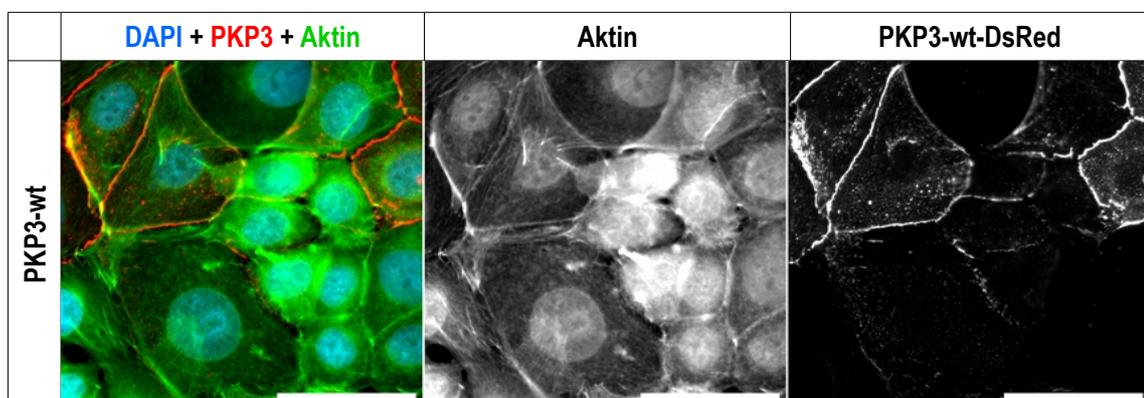


Abbildung 27: PKP3-wt mit Aktin in MCF-7-Zellen. 48h nach Transfektion erfolgte die Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd. Aktin wurde mit einem an Phalloidin konjugierten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

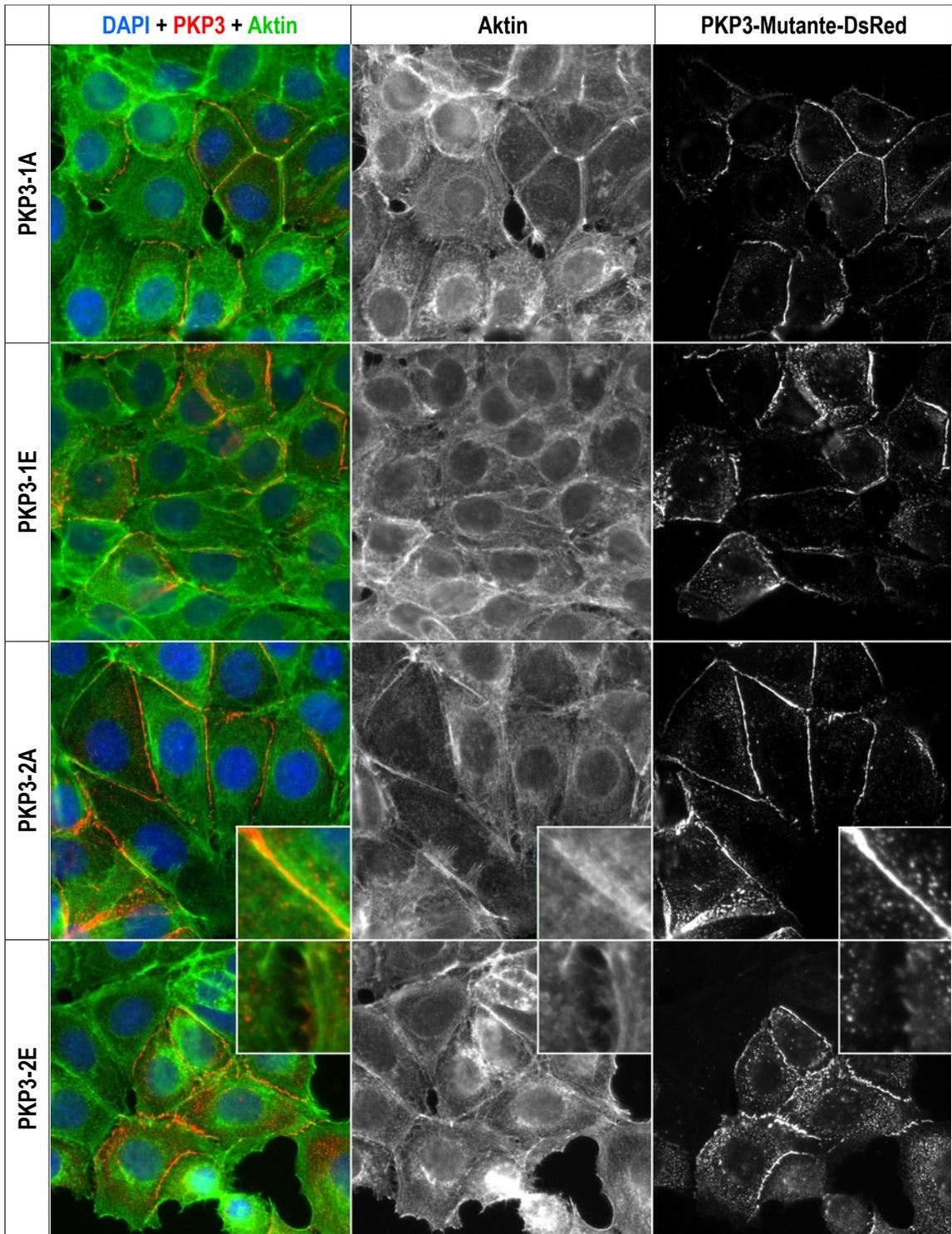


Abbildung 28: PKP3-1A/E und PKP3-2A/E mit Aktin in MCF-7-Zellen. 48h nach Transfektion erfolgte die Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd. Aktin wurde mit einem an Phalloidin konjugierten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 8µm.

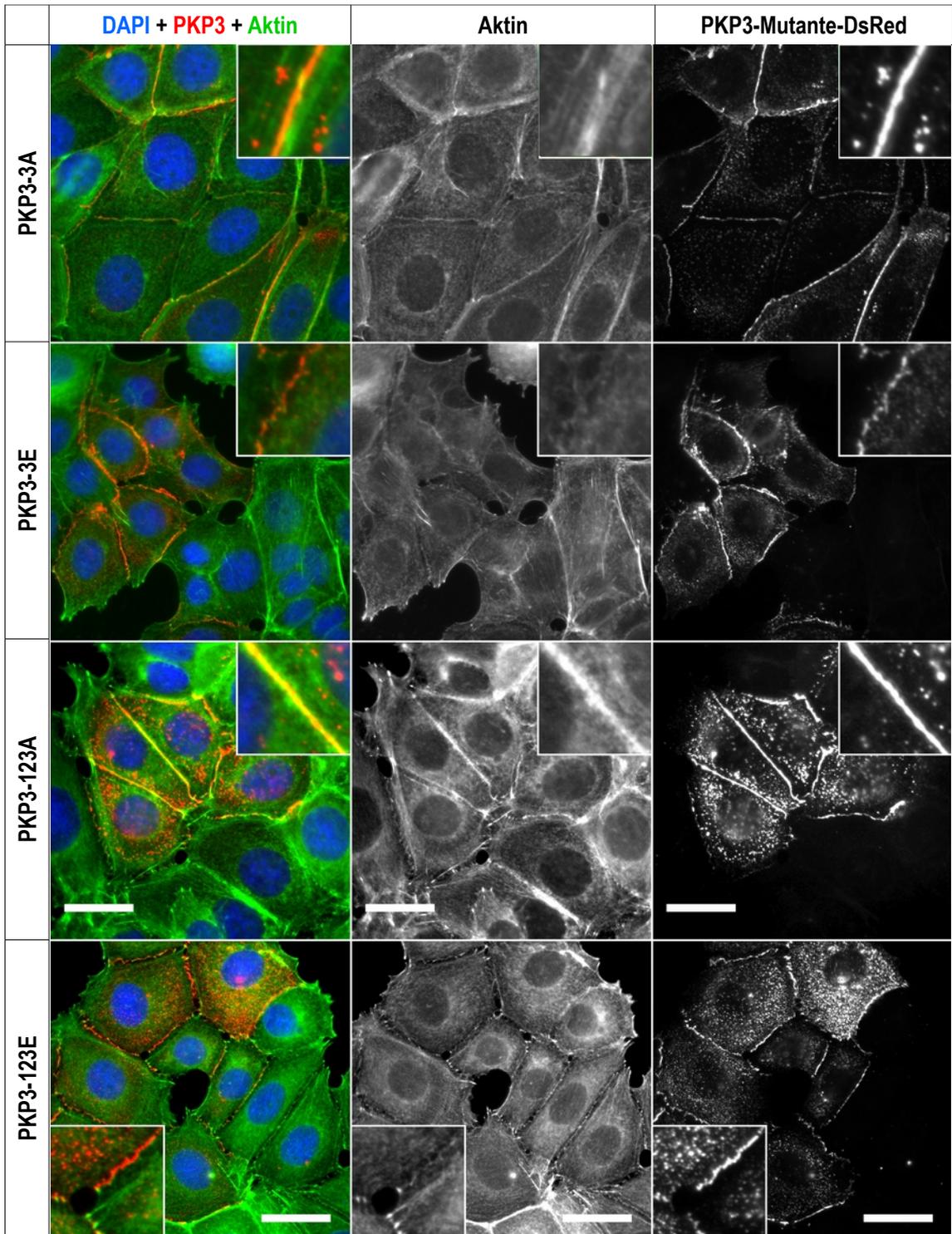


Abbildung 29: PKP3-3A/E und PKP3-123A/E mit in in MCF-7-Zellen. 48h nach Transfektion erfolgte die Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd. Aktin wurde mit einem an Phalloidin konjugierten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm, das Vergrößerungsfenster entspricht 8µm, bei PKP3-123A/E 11µm.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

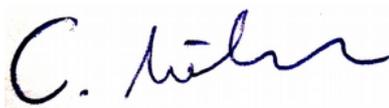
Angaben über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Es ist mir bekannt, das ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.



Marius-Claudius Möllmer

Halle an der Saale, 18.11.2016

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Marius-Claudius Möllmer
geboren am 01.10.1989 in Torgau
römisch-katholisch
ledig, kinderlos



Universitäre Ausbildung:

02/2016 Approbation als Arzt
seit 11/2015 Promotion in AG Hatzfeld am Institut für Molekulare Medizin
Abteilung Pathobiochemie
11/2015: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 2,6)
10/2009 - 10/2015: Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Pflichtassistentz:

08/2015 - 10/2015: Chirurgie am Malteser Krankenhaus St. Franziskus-Hospital
Flensburg
06/2015 - 08/2015: Chirurgie am Evangelisch-Lutherischen Diakonissenkrankenhaus
Flensburg
03/2015 - 06/2015: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde am Städtischen Klinikum Dessau
11/2014 - 03/2015: Innere Medizin am Berufsgenossenschaftliche Klinikum
Bergmannstrost Halle (Saale)

Famulatur:

03/2014: Praxis für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde Dipl. med. Pötzl, Torgau
02/2014 - 03/2014: Urologie und Kinderurologie am Stiftung Rehabilitation
Heidelberg (SRH) Krankenhaus Sigmaringen GmbH
08/2013 - 09/2013: Praxis für Innere Medizin und Angiologie Dr. med. Hirsch, Halle
(Saale)
08/2013: Praxis für Radiologie Dr. med. Gaus und Dr. med. Ganseforth,
Wilhelmshaven

07/2013 - 08/2013: Innere Medizin am Nordwest-Krankenhaus Sanderbusch gGmbH
08/2012: Interdisziplinäre Notaufnahme (internistischer Bereich) an der
Ubbo-Emmius-Klinik gGmbH, Aurich
03/2012: Innere Medizin (Gastroenterologie) am HELIOS-Klinikum Köthen

Wehrdienst und Beschäftigungsverhältnisse:

03/2009 - 09/2009 Angestellter am Kreiskrankenhaus Torgau „Johann Kentmann“
gGmbH
07/2008 - 03/2009 Zivildienst in der Abteilung für Hämatonkologie des
Universitätsklinikums Leipzig

Schulbildung:

2006 - 2008: Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife am Johann-Walter-
Gymnasium, Torgau
2001 - 2006: Joe-Polowsky-Gymnasium, Torgau
1995 - 2001: Grundschule am Rodelberg, Torgau

Sonstige Interessen und Befähigungen:

Führerscheinklasse B
Oberstufenabschluss II im Fach Klavier
1. Platz Regionalwettbewerb "Jugend musiziert" 2008 Klavier, solo
Englisch - fließend in Wort und Schrift



Marius-Claudius Möllmer

Halle an der Saale, 18.11.2016

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld für die Betreuung, konstruktive Kritik sowie aufmunternden Zuspruch bei der Anfertigung dieser Dissertation. Der Arbeitsgruppe Hatzfeld und besonders Annika Wolf, René Keil und Annemarie Köppen danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und hilfreiche Diskussionen. Für praktische Hinweise zum experimentellen Vorgehen danke ich Andrej Mun.

Ich danke meinen Eltern und Großeltern, die mir diese Dissertation ermöglicht haben, meinem Bruder für wertvolle Kommentare sowie Sophia Wagner für die liebevolle Unterstützung.

Meinem Freundeskreis und der katholischen Studentengemeinde Halle und danke ich für die vielen geselligen Abende, die stets eine willkommene Abwechslung waren.