



**Zytoplasmatische Funktionen der
Armadillo-repeat Proteine
Plakophilin1 und p0071**

Dissertation

Zur Erlangung des Akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Annika Wolf

geboren am 01.05.1980 in Bad Langensalza

Gutachter:

Prof. Dr. M. Hatzfeld

Prof. Dr. E. Wahle

Prof. Dr. A. Beck-Sickinger

Halle/Saale, Dezember 2008

Verteidigungsdatum: 03.06.2009

meinen Eltern

„Es gibt nur einen Weg zum Glück, und der bedeutet, aufzuhören mit der Sorge um Dinge, die jenseits der Grenzen unseres Einflussvermögens liegen.“

Epiktet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zell-Zell-Adhäsion	1
1.2	Die <i>Armadillo-repeat</i> Proteinfamilie	2
1.3	Funktionen der <i>Armadillo-repeat</i> Proteine	4
1.3.1	Funktionen der Plakophiline und des p0071 in der Zell-Zell-Adhäsion	4
1.3.2	Funktionen der <i>Armadillo-repeat</i> Proteine in der Signaltransduktion	7
1.3.3	Funktionen der <i>Armadillo-repeat</i> Proteine im Rho-Signalweg.....	8
1.3.3.1	Rho-GTPasen.....	8
1.3.3.2	Funktionen der Catenine im Rho-Signalweg.....	10
1.3.3.3	Funktion und Regulation von RhoA in der Zytokinese.....	12
1.3.4	Translation	16
1.3.4.1	<i>Cap</i> -abhängige Initiation der Translation.....	16
1.3.4.2	Translationskontrolle unter zellulärem Stress – Bildung von <i>stress granules</i>	18
1.4	Zielstellung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	21
2.1.2	Bakterienstämme	21
2.1.3	Hefestämme	21

2.1.4	Zelllinien.....	22
2.1.5	Antikörper.....	22
2.1.6	Plasmide.....	23
2.1.7	Oligonukleotide	24
2.1.8	Kit-Systeme	24
2.1.9	Chromatographiesäulen	24
2.1.10	Radiochemikalien	24
2.1.11	Sonstiges.....	25
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	25
2.2.2	RNA-Isolierung	25
2.2.3	Reverse Transkription.....	26
2.2.4	Herstellung von Expressionsplasmiden.....	27
2.2.5	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	27
2.3	Zellbiologische Methoden	29
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	29
2.3.2	Transfektion eukaryotischer Zellen	29
2.3.3	Zellsynchronisierung	30
2.3.3.1	Synchronisierung der Zellen mit doppeltem Thymidinblock.....	30
2.3.3.2	Synchronisierung der Zellen mittels Thymidin/Nocodazol-Block.....	30

2.3.4	Induktion von Stress	30
2.3.5	Immunfluoreszenz	31
2.3.6	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC).....	31
2.3.7	Durchflusszytometrie.....	32
2.3.8	Zellproliferationstest über BrdU-Einbau	32
2.3.9	Zellviabilitätstest mittels Kristallviolett-Färbung.....	33
2.3.10	Caspaseaktivitätsmessung.....	33
2.4	Mikrobiologische Methoden.....	33
2.4.1	Expression von Plakophilin1, eIF4A1 und GST	34
2.5	Biochemische Methoden	34
2.5.1	SDS-PAGE und Western Blot Analyse.....	34
2.5.2	Metabolische Markierung von Zellen mit L-(³⁵ S)-Methionin.....	36
2.5.3	Proteinreinigung	36
2.5.3.1	Reinigung von Plakophilin1	36
2.5.3.2	Reinigung von eIF4A1	37
2.5.3.3	Reinigung von transient exprimierten Flag-Fusionsproteinen	38
2.5.4	GST pull-down	38
2.5.5	Hefe-Dihybrid System.....	39
2.5.6	Messung des Guaninnukleotid-Austauschs von RhoA.....	39
2.5.7	ATPase Aktivitätstest	40

2.5.8	Reporteragen-Analysen	41
2.5.8.1	Translationsanalysen <i>in vivo</i>	41
2.5.8.2	Translationsanalysen <i>in vitro</i>	41
2.5.9	Statistische Auswertungen	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Funktion des Plakophilin1 im Zytoplasma	43
3.1.1	Lokalisierung der Plakophiline unter zellulärem Stress	43
3.1.2	Charakterisierung der Interaktion zwischen Plakophilin1 und eIF4A1.....	47
3.1.2.1	Nachweis der Interaktion im Hefe-Dihybrid System	47
3.1.2.2	Nachweis der Interaktion mittels GST pull-down	48
3.1.2.3	Nachweis der Assoziation zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementationsanalyse (BiFC).....	50
3.1.3	Plakophilin1 und eIF4A1 haben keinen Einfluss auf die <i>stress granule</i> Bildung... 52	
3.1.4	Funktionen von Plakophilin1 und eIF4A1 bei der Kontrolle der Translation <i>in vivo</i>	55
3.1.4.1	<i>Knockdown</i> von Plakophilin1, Plakophilin3 und eIF4A1 inhibieren die Proteinsynthese	55
3.1.4.2	Überexpression von Plakophilin1 und eIF4A1 stimulieren die Proteinsynthese	58
3.1.4.3	Plakophilin1, Plakophilin3 und eIF4A1 stimulieren die Translation	61
3.1.5	Funktionen von Plakophilin1 und eIF4A1 bei der Kontrolle der Translation <i>in vitro</i>	62
3.1.5.1	Plakophilin1 stimuliert die <i>cap</i> -abhängige Translation <i>in vitro</i>	63

3.1.5.2	Einfluss von Plakophilin1 auf die ATPase Aktivität von eIF4A1	64
3.1.6	Plakophilin1 und eIF4A1 beeinflussen die Proliferation und Zellgröße	66
3.2	Funktion des p0071 im Zytoplasma	71
3.2.1	Lokalisation von p0071 in der Mitose	71
3.2.2	Funktion von p0071 im Rho-Signalweg.....	72
3.2.2.1	Ektopische Expression von p0071 induziert einen Zytokinesedefekt	72
3.2.2.2	<i>Knockdown</i> von p0071 induziert einen Zytokinesedefekt.....	74
3.2.2.3	Spezifitätskontrolle des RNAi-vermittelten Phänotyps.....	75
3.2.2.4	<i>Knockdown</i> von p0071 hemmt die Akkumulation von Aktin am kontraktilen Ring	78
3.2.2.5	p0071 beeinflusst die RhoA-Aktivität	79
3.2.2.6	p0071 interagiert mit RhoA	81
3.2.2.7	p0071 interagiert mit dem GEF-Protein Ect2	81
3.2.3	Funktionelle Analyse der Interaktion zwischen p0071 und Ect2	83
3.2.3.1	p0071 reduziert den dominant negativen Effekt der Ect2-N-terminalen Domäne ..	84
3.2.3.2	p0071 reduziert den durch <i>Knockdown</i> von Ect2 induzierten Zytokinesedefekt	85
3.2.3.3	Ect2 reguliert die Lokalisation von p0071.....	86
3.2.3.4	p0071 verstärkt die GEF-Aktivität von Ect2	87
4	Diskussion.....	89
4.1	Funktionen der Plakophiline.....	89
4.1.1	Funktionen der Plakophiline in der Translation	89

4.1.2	Einfluss von Plakophilin1 auf die Proliferation und Zellgröße	96
4.1.3	Rolle der Plakophiline in der Tumorgenese	98
4.1.4	Ausblick.....	99
4.2	Funktion des p0071.....	101
4.2.1	Funktion des p0071 in der Zytokinese.....	101
4.2.2	Regulation des Rho-Signalweges: Eine gemeinsame Funktion aller p120 ^{ctn} - verwandten Proteine?.....	106
4.2.3	Rolle von p0071 in der Tumorgenese.....	106
4.2.4	Ausblick.....	107
5	Zusammenfassung	109
6	Literatur	111
7	Anhang.....	127
7.1	Oligonukleotide	127
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	130

1 Einleitung

1.1 Zell-Zell-Adhäsion

Die Zell-Zell-Adhäsion ist die Voraussetzung für den Aufbau und die Aufrechterhaltung von dreidimensionalen Gewebestrukturen in Organismen. Dabei spielen die Zell-Zell-Adhäsionsproteine eine entscheidende Rolle. Einerseits sorgen sie extrazellulär für das Anheften der Zellen aneinander und andererseits vermitteln sie intrazellulär über Adapterproteine die Assoziation mit dem Zytoskelett und sind somit entscheidend für die Aufrechterhaltung der Zellstabilität und Form im Zellverband bzw. im Gewebe. Defekte in der Zell-Zell-Adhäsion können zur neoplastischen Transformation, zur Tumorprogression und zur Metastasierung führen (Behrens, 1999; Mareel *et al.*, 1997; Takeichi, 1993). Zu den Zell-Zell-Adhäsionsproteinen zählen unter anderem die Cadherine (Hynes and Lander, 1992). Cadherine sind transmembrane Glycoproteine, die über ihre aminoternale extrazelluläre Domäne calciumabhängige homophile Bindungen eingehen. Die intrazelluläre Domäne variiert innerhalb der Cadherin-Superfamilie und wird deswegen häufig zur Unterteilung der Cadherine in Subfamilien herangezogen. Vertreter dieser Subgruppe sind unter anderem die klassischen Cadherine und die desmosomalen Cadherine. Die größte Gruppe bilden die klassischen Cadherine, die Zell-Zell-Kontakte des Typs 1 an *Adherens Junctions* ausbilden. Die klassischen Cadherine sind nach Art des Gewebes benannt, z.B. E- (epithelial; (Ringwald *et al.*, 1987)), P- (plazental; (Nose *et al.*, 1987)), N- (neuronal, (Hatta *et al.*, 1988)) und weitere. Zu den desmosomalen Cadherinen gehören die Desmocolline und Desmogleine, welche in drei bzw. vier zelltyp- und differenzierungsspezifischen Isoformen, Desmocollin 1-3 und Desmoglein 1-4, exprimiert werden (Koch *et al.*, 1991; Mechanic *et al.*, 1991; Schafer *et al.*, 1994; Whittock and Bower, 2003). Catenine interagieren mit der intrazellulären Domäne der Cadherine und sind am Aufbau und an der Regulation der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion beteiligt. Die größte Gruppe bilden die *Armadillo-repeat* Proteine. In *Adherens Junctions* vernetzen sie klassische Cadherine mit dem Aktinzytoskelett und in Desmosomen die desmosomalen Cadherine mit Intermediärfilamenten.

1.2 Die Armadillo-repeat Proteinfamilie

Armadillo-repeat Proteine sind charakterisiert durch eine zentrale Domäne, die sich aus einer Wiederholung von 42 Aminosäuren, dem sogenannten *Armadillo (Arm)*-Motiv, zusammensetzt. Ursprünglich wurde das *Arm*-Motiv im *D. melanogaster* Segmentpolaritätsgen *Armadillo* identifiziert (Riggelman *et al.*, 1989; Wieschaus and Riggelman, 1987). Die *Armadillo-repeat* Proteine wurden aufgrund ihrer Sequenzhomologien, der Anzahl und Organisation ihrer *Arm*-Motive und ihrer subzellulären Lokalisation in verschiedene Untergruppen unterteilt (Abb. 1.1 (Hatzfeld, 2005)).

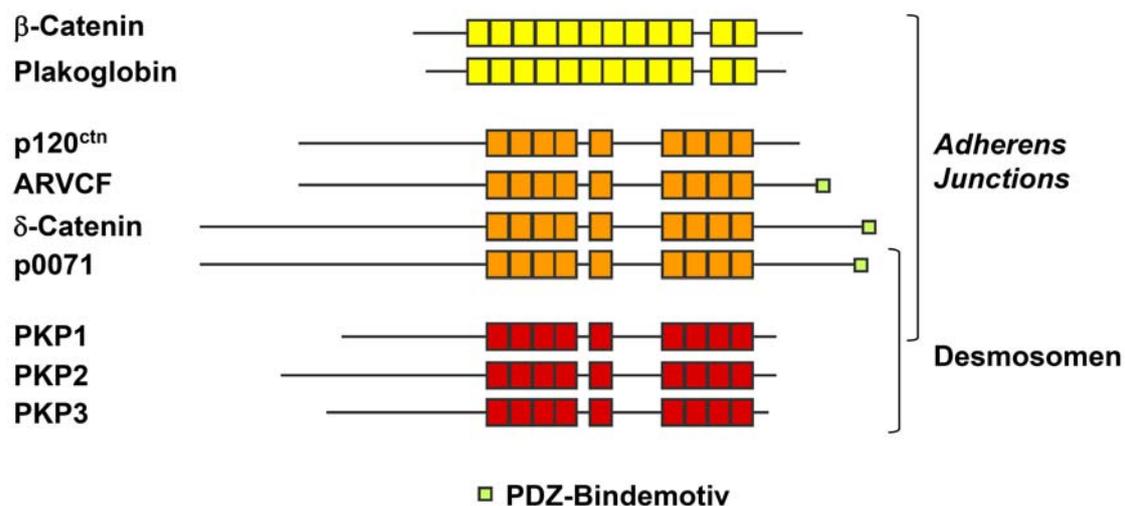


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der *Armadillo-repeat* Proteinfamilie. Die *Armadillo-repeat* Proteinfamilie, charakterisiert durch eine variable Anzahl von *Arm-repeats*, besteht aus drei Unterfamilien. Zur Familie der klassischen Catenine gehören β -Catenin und Plakoglobin. Die p120^{ctn}-verwandten Proteine bilden die zweite Unterfamilie mit p120^{ctn}, ARVCF, δ -Catenin und p0071. Sie interagieren mit den klassischen Cadherinen in *Adherens Junctions*. Am C-terminalen Ende enthalten ARVCF, δ -Catenin und p0071, jedoch nicht p120^{ctn}, ein PDZ-Bindemotiv. Zur dritten Unterfamilie gehören die Plakophiline (PKP1-3). Sie sind Plaque-Proteine der Desmosomen. p0071 interagiert sowohl mit klassischen als auch mit desmosomalen Cadherinen.

Zur Untergruppe der klassischen Catenine gehören β -Catenin und Plakoglobin (Synonym: γ -Catenin). Die zweite Untergruppe bilden die p120 Catenin-(p120^{ctn}) verwandten Proteine, welche sich in zwei Subfamilien, die Plakophiline und die p120^{ctn} Subfamilie, untergliedert. Die p120^{ctn} Subfamilie umfasst neben p120^{ctn} selbst (Hatzfeld, 1999; Reynolds *et al.*, 1989), die Proteine ARVCF (*armadillo repeat gene deleted in velo cardio facial syndrome* (Sirotkin *et al.*, 1997)), NPRAP/ δ -Catenin/Neurojungin (*neural plakophilin-related Armadillo protein* (Paffenholz and Franke, 1997; Zhou *et al.*, 1997)) und p0071 (Hatzfeld and

Nachtsheim, 1996). Die Proteine der klassischen Catenine und der p120^{ctn} Subfamilie binden an die klassischen Cadherine in den *Adherens Junctions*. Demgegenüber sind die Plakophiline an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten über Desmosomen beteiligt. Neben Plakoglobin vermittelt p0071 als einziges bisher bekanntes Protein die Adhäsion sowohl in *Adherens Junctions* als auch in Desmosomen (Cowin *et al.*, 1986; Hatzfeld *et al.*, 2003).

Alle Mitglieder der *Armadillo-repeat* Proteinfamilie verfügen über eine N-terminale „Kopf“-Domäne, eine zentrale hochkonservierte *Armadillo-repeat* Domäne und einen C-terminalen „Schwanz“. Die dreidimensionale Struktur der *Armadillo-repeat* Domäne von β -Catenin repräsentiert eine superhelikale Struktur, wobei jeder einzelne *Armadillo-repeat* aus drei α -Helices aufgebaut ist. An der Oberfläche dieser Superhelix bilden basische Aminosäuren eine Spalte, die eine Bindungsstelle für Liganden wie z.B. Cadherine darstellt (Huber *et al.*, 1997). Die klassischen Catenine, β -Catenin oder Plakoglobin, binden an die distale Region der zytoplasmatischen Cadherindomäne (*catenin binding domain*, CBD) und vermitteln über α -Catenin die Assoziation mit dem Aktinzytoskelett.

Strukturanalysen der Plakophilin1 *Armadillo-repeat* Domäne zeigten, dass diese aus neun *Arm*-Motiven besteht (Choi and Weis, 2005). Zwischen dem fünften und sechsten *Arm*-Motiv befindet sich ein flexibler Bereich (*loop*), welcher einen Knick in die superhelikale Region einführt. Dieser Sequenzbereich ist innerhalb der p120^{ctn}-verwandten Proteine hoch konserviert (Choi and Weis, 2005).

Die Proteine der p120^{ctn} Subfamilie assoziieren über ihre *Armadillo-repeat* Domäne mit der Juxtamembran-Domäne (JMD) von klassischen Cadherinen und sind an der Vernetzung der zytoplasmatischen Domänen der Cadherinmoleküle (*Cadherin Clustering*) beteiligt. Somit haben sie eine entscheidende Funktion in der Aufrechterhaltung der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion (Calkins *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2003; Hatzfeld *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2004; Thoreson *et al.*, 2000).

Am C-terminalen Ende enthalten ARVCF, δ -Catenin und p0071, nicht jedoch p120^{ctn}, ein PDZ-(*PSD-95/Discs-large/ZO-1*) Bindemotiv (DSWV (Fanning and Anderson, 1998)), über welches die Interaktion mit Proteinen, die PDZ-Domänen enthalten, vermittelt wird. Alle drei Proteine interagieren mit dem PDZ-Protein Erbin, welches Funktionen in der Zellintegrität und der Zellpolarität ausübt (Izawa *et al.*, 2002; Jaulin-Bastard *et al.*, 2002; Laura *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zur p120^{ctn} Subfamilie interagieren die Plakophiline (Plakophilin1-3) über ihre N-terminale „Kopf“-Domäne mit den desmosomalen Cadherinen und koordinieren über Desmoplakin und Plakoglobin die Assoziation mit den Intermediärfilamenten (Bonne *et al.*, 1999; Bonne *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2002; Hatzfeld *et al.*, 1994; Hatzfeld *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2000; Kowalczyk *et al.*, 1999). Überexpressionsstudien zeigen, dass Plakophilin1 über seine *Armadillo-repeat* Domäne mit dem Aktinzytoskelett assoziiert (Hatzfeld *et al.*, 2000). In einem Hefe-Dihybrid *screen* mit der Plakophilin1 *Armadillo-repeat* Domäne wurden Aktin und Filamin, ein Aktin-bindendes Protein, als putative Interaktionspartner identifiziert (Hatzfeld, persönliche Mitteilung). Dies impliziert, dass Plakophilin1 direkt und/oder indirekt mit dem Aktinzytoskelett interagieren könnte.

1.3 Funktionen der Armadillo-repeat Proteine

1.3.1 Funktionen der Plakophiline und des p0071 in der Zell-Zell-Adhäsion

Zur Unterfamilie der Plakophiline gehören Plakophilin1, 2 und 3, welche vorwiegend in Zell-Zell-Verbindungen des desmosomalen Typs zu finden sind (Bonne *et al.*, 1999; Bonne *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2002; Hatzfeld *et al.*, 1994; Hatzfeld, 1999; Heid *et al.*, 1994; Hofmann *et al.*, 2000; Kowalczyk *et al.*, 1999; Mertens *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt interagieren sie mit den desmosomalen Cadherinen und verbinden die Intermediärfilamente (Cytokeratin, Desmin bzw. Vimentin) mit den Desmosomen über Desmoplakin und Plakoglobin. *In vitro* Studien zeigen, dass neben Desmoplakin auch die Plakophiline direkt mit Keratinen interagieren können (Bonne *et al.*, 2003; Hatzfeld *et al.*, 1994; Hatzfeld *et al.*, 2000; Heid *et al.*, 1994; Hofmann *et al.*, 2000; Kapprell *et al.*, 1988; Smith and Fuchs, 1998). Die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist bislang ungeklärt, da die Plakophiline im äußeren Plaque, unmittelbar unterhalb der Plasmamembran, lokalisieren und somit für die Interaktion mit Intermediärfilamenten nicht frei zugänglich sind (Abb. 1.2).

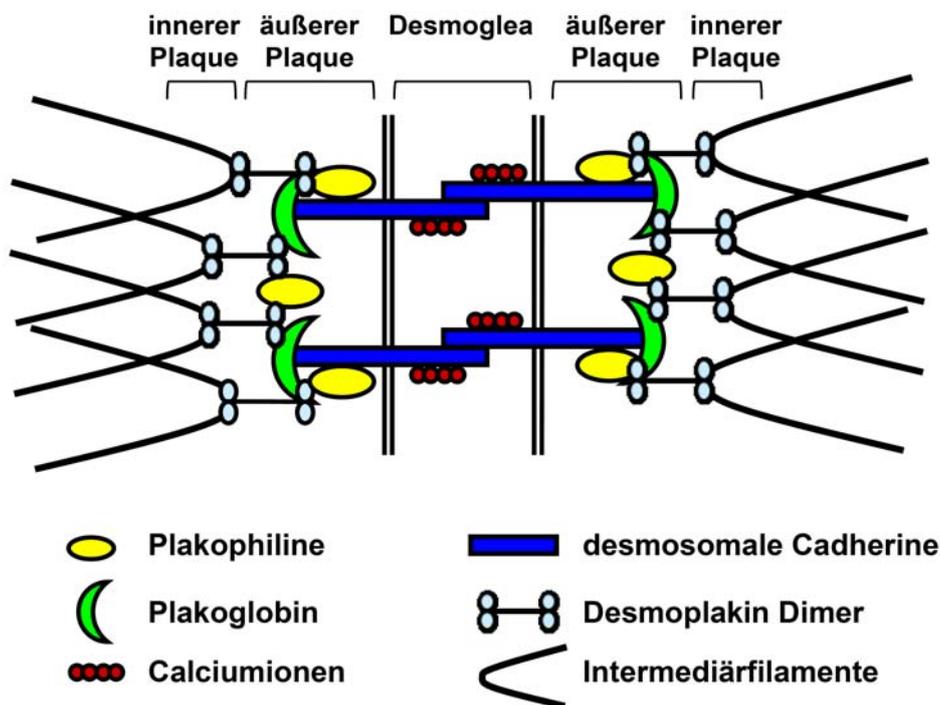


Abb. 1.2: Molekulare Organisation eines Desmosoms. Desmosomale Cadherine gehen im Interzellulärraum (Desmoglea) calciumabhängige Verbindungen ein. Zum äußeren Plaque (ODP) gehören der C-terminus der desmosomalen Cadherine, Plakoglobin, die Plakophiline und der N-terminus von Desmoplakin. Zum inneren Plaque (IDP) zählt der C-terminus von Desmoplakin und dessen Verbindung mit den Intermediärfilamenten. Abbildung modifiziert nach (Green and Gaudry, 2000; Kitajima, 2002).

Plakophilin1 stimuliert die Rekrutierung und Stabilisierung desmosomaler Proteine an der Plasmamembran in Keratinozyten, was zu einer erhöhten Desmosomenzahl und Desmosomengröße führt (Bornslaeger *et al.*, 2001; Hatzfeld *et al.*, 2000; South *et al.*, 2003). Ähnliche Effekte konnten auch in den Suprabasalzellen im Vergleich zu Basalzellen der Haut bzw. einfachen Epithelien beobachtet werden (Kowalczyk *et al.*, 1999). Dieser Effekt wird über die N-terminale „Kopf“-Domäne vermittelt, welche direkt mit Desmoglein 1, Desmocollin 1, Desmoplakin und Keratinen interagiert (Hatzfeld *et al.*, 1994; Hatzfeld *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2000; Kowalczyk *et al.*, 1999; Smith and Fuchs, 1998). Die Stabilisierung von Keratin an der Plasmamembran nach Überexpression von Plakophilin1 ist vermutlich indirekt und entsteht primär durch die erhöhte Rekrutierung von Desmoplakin. Die „Kopf“-Domäne ist sowohl für die desmosomale Lokalisation als auch für die Akkumulation von Plakophilin1 im Zellkern verantwortlich (Hatzfeld *et al.*, 2000). Die Plakophiline 2 und 3 zeigen, im Vergleich zu Plakophilin1, keinen Adhäsions-verstärkenden Phänotyp (Bonne *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 1999). Überexpression von Plakophilin2 ist sogar

mit einem Verlust von Adhäsion in vielen Zellen verbunden (Green and Hatzfeld, persönliche Mitteilung). Trotz dieser Unterschiede bezüglich der Regulation von Adhäsion haben alle Plakophiline mehrere gemeinsame desmosomale Bindungspartner. Plakophilin2 interagiert mit Desmoplakin, Desmoglein 1 und Desmocollin 1a (Chen *et al.*, 2002). Plakophilin3 interagiert mit Desmoplakin, Desmoglein 1 und möglicherweise auch mit Desmocollin 1a (Bonne *et al.*, 2003).

Für Plakophilin1 und 2, jedoch nicht für Plakophilin3, sind zwei Spleißvarianten bekannt. Sie unterscheiden sich durch eine Insertion von 21 Aminosäuren im vierten *Arm*-Motiv für Plakophilin1 und von 44 Aminosäuren im dritten *Arm*-Motiv für Plakophilin2 (Mertens *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). Für die Spleißvarianten von Plakophilin1 wurde eine unterschiedliche Lokalisation in der Zelle beschrieben. Während die kürzere Plakophilin1-Variante (Plakophilin1a) vorwiegend an Desmosomen, jedoch auch zytoplasmatisch und nukleär zu finden ist, lokalisiert Plakophilin1b ausschließlich im Zellkern (Schmidt *et al.*, 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der Spleißvarianten, wird vermutet, dass die Regulation des differentiellen Spleißens die zelluläre Funktion von Plakophilin1 entscheidend beeinflusst (Hatzfeld, 2007). Plakophilin2a und 2b zeigen keine Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation und zelltypspezifischen Verteilung. Beide lokalisieren in Desmosomen und im Zellkern (Mertens *et al.*, 1996).

Mutationen in Plakophilin1 und 2 sowie die Plakophilin1-Defizienz zeigen, dass beide Proteine eine wichtige Funktion in der Zell-Zell-Adhäsion ausüben. Der Verlust von Plakophilin1 führt zu einer autosomal rezessiven Erkrankung der Haut (*skin fragility ectodermal dysplasia syndrome*), für die eine Blasenbildung und Verkrustungen der Epidermis sowie der Verlust von Haaren und die Reduktion an Schweißdrüsen charakteristisch ist (Hamada *et al.*, 2002; McGrath *et al.*, 1997; McGrath *et al.*, 1999; Whittock *et al.*, 2000). Die Anzahl, Größe und Stabilität der Desmosomen war reduziert sowie die Keratinverankerung gestört. Des Weiteren wurden generelle Entwicklungsstörungen im Zusammenhang mit dem Fehlen von Plakophilin1 beschrieben (Ersoy-Evans *et al.*, 2006). Mutationen in Plakophilin2 führten zu arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie (ARVC (Gerull *et al.*, 2004)). Mausmodelle zeigten, dass eine Plakophilin2-Defizienz zu embryonaler Lethalität am Tag 10.5 führt (Grossmann *et al.*, 2004). Plakophilin2 stellt somit eine essentielle strukturelle Komponente des Herzens dar.

p0071 ist ein Mitglied der p120^{ctn} Subfamilie, zu der auch p120^{ctn}, δ -Catenin und ARVCF gehören. Es lokalisiert in Zell-Zell-Kontakten und interagiert sowohl mit klassischen Cadherinen über seine *Armadillo-repeat* Domäne als auch mit desmosomalen Proteinen (Desmoplakin, Plakoglobin und Desmocollin 3a) über seine N-terminale „Kopf“-Domäne (Calkins *et al.*, 2003; Hatzfeld and Nachtsheim, 1996; Hatzfeld *et al.*, 2003). *In vivo* führt die Überexpression von p0071 zur Stabilisierung von Cadherinen an der Membran, während Desmosomen bei hoher Expression reduziert sind (Hatzfeld *et al.*, 2003). Dieses macht deutlich, dass p0071 eine essentielle regulatorische Bedeutung zukommt, indem es neben der Regulation der Cadherin-Stabilität und des Cadherin *Clustering* auch eine Funktion im Crosstalk zwischen *Adherens Junctions* und Desmosomen ausübt.

1.3.2 Funktionen der *Armadillo-repeat* Proteine in der Signaltransduktion

Neben der bereits beschriebenen Funktion von β -Catenin und p120^{ctn} in der Zell-Zell-Adhäsion zeigen diese Proteine Funktionen in Signaltransduktionswegen.

β -Catenin, welches nicht in Adhäsionsverbindungen vorliegt, wird über einen Multiproteinkomplex (bestehend aus Axin/APC, CKI und GSK3 β) phosphoryliert. Phosphoryliertes β -Catenin wird anschließend von TrCP (*β -transduction repeat-containing proteins*) ubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Aberle *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002; Polakis, 2000). Die Kontrolle des Abbaus erfolgt über den Wnt-Signalweg. Dieser hat eine besondere Funktion während der Embryonalentwicklung aber auch eine fundamentale Bedeutung bei der Tumorprogression. Bei Bindung eines Wnt-Liganden an den *frizzled*-Rezeptor wird β -Catenin im Zytoplasma stabilisiert und in den Zellkern transloziert. Dort interagiert β -Catenin mit den Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie und beeinflusst die Genexpression von Zielgenen (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996; Molenaar *et al.*, 1996). Zielgene sind Proteine, die an der Kontrolle der Zellproliferation, Apoptose und der Zellmotilität beteiligt sind.

Wie bereits für β -Catenin beschrieben lokalisiert auch p120^{ctn} im Zellkern (Mariner *et al.*, 2000; van Hengel *et al.*, 1999). In einem Hefe-Dihybrid *screen* wurde Kaiso, ein Transkriptionsfaktor der POZ-ZF (*Pox virus and zinc finger*) Superfamilie, als direkter Interaktionspartner für p120^{ctn} identifiziert (Daniel and Reynolds, 1999; Prokhortchouk *et al.*, 2001). Die Funktion von p120^{ctn} in der Transkriptionskontrolle ist dennoch weitestgehend

unbekannt.

Die Plakophiline weisen neben der desmosomalen Lokalisation auch eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation auf (Bonne *et al.*, 1999; Hatzfeld *et al.*, 2000; Kapprell *et al.*, 1988; Mertens *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1999). Diese duale Lokalisation impliziert, dass die Plakophiline neben ihrer adhäsiven Funktion im Plaque auch eine Rolle in Signaltransduktionswegen haben könnten. Für Plakophilin2 konnte über Interaktionsstudien gezeigt werden, dass dieses mit der größten Untereinheit der RNA Polymerase III (RPC155) und dem Transkriptionsfaktor TFIIB im Zellkern assoziiert (Mertens *et al.*, 2001). Die RNA Polymerase III hat eine entscheidende Funktion im RNA Metabolismus und der Translation. Im Vergleich zu Plakophilin2 wurde für Plakophilin1 eine stärkere Kernlokalisation beschrieben (Chen *et al.*, 2002), jedoch sind bisher keine nukleären Bindungspartner bekannt. Die möglichen Funktionen der Plakophiline in der Signaltransduktion sind bis *dato* rein spekulativ und weitestgehend unbekannt.

1.3.3 Funktionen der *Armadillo-repeat Proteine* im Rho-Signalweg

1.3.3.1 *Rho-GTPasen*

Die Rho-(*ras homologous*) GTPasen gehören zur Ras-(*rat sarcoma*) Superfamilie der GTPasen. Zurzeit sind mehr als 20 humane Rho-GTPasen bekannt, von denen RhoA, Rac1 und Cdc42 am besten charakterisiert sind. Diese sind an der Regulation vieler unterschiedlicher Aktivitäten des Aktinzytoskeletts beteiligt (Aspenstrom *et al.*, 2004; Hall, 1998). Die Aktivierung von RhoA stimuliert die Bildung von kontraktilen Aktinfasern, wie sie in Stressfasern und im kontraktilen Ring vorkommen (Glotzer, 2005; Ridley and Hall, 1992). Aktives Rac1 induziert die Ausbildung von Lamellipodien, die an der Führungsfront einer sich bewegenden Zelle lokalisiert sind (Ridley *et al.*, 1992). Cdc42 induziert nach Aktivierung die Polymerisation von Aktin an der Zellperipherie und stimuliert die Ausbildung von Filopodien (Kozma *et al.*, 1995; Nobes and Hall, 1995). RhoA, Rac1 und Cdc42 spielen demnach eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen wie Zellpolarität, Zytokinese, Morphogenese, Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Matrix-Adhäsion und Zellmotilität (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Hall, 1998; Nobes and Hall, 1999; Raftopoulou and Hall, 2004). Zusätzlich sind sie aber auch in Signalwege involviert, die nicht unmittelbar mit einer Veränderung des Aktinzytoskeletts einhergehen. Hierzu zählen die Regulation der

Genexpression, Zellzyklus-Progression, Vesikeltransport, Mikrotubuli-Organisation und Tumorgenese (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Hall, 2005; Ridley, 2004).

Alle kleinen GTPasen agieren als molekulare Schalter, indem sie zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Status wechseln. Die Balance zwischen aktivem und inaktivem Zustand wird durch drei Gruppen regulatorischer Proteine, den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), den GTPase aktivierenden Proteinen (GAPs) und den Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) gewährleistet (Abb. 1.3).

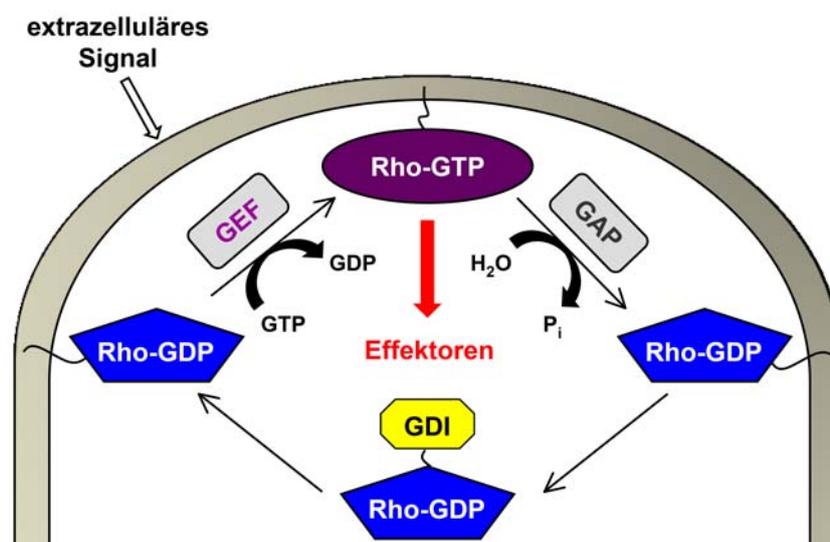


Abb. 1.3: Schematische Übersicht der Regulationsmechanismen der Rho-GTPasen. Die Rho-Proteine zirkulieren zwischen dem aktiven, GTP-gebundenen, und dem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand. Dabei wird die Schalterfunktion an der Membran durch GEFs (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren) und GAPs (GTPase aktivierende Proteine) reguliert. GDIs (Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren) verhindern die Aktivierung der Rho-GTPase, indem sie an die posttranslational C-terminal angefügte Isoprenyl-Gruppe der Rho-GTPase binden, und dadurch die Rho-GTPase von ihrem Wirkungsort, der Membran, entfernen. Die Freisetzung der Rho-GTPasen aus dem GDI-Rho-GTPase-Komplex an die Membran ermöglicht eine erneute Aktivierung. Abbildung wurde verändert nach (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

GEFs fördern den Austausch von gebundenem Nukleotid, indem sie die Dissoziation von GDP und die nachfolgende Aufnahme von GTP beschleunigen. Im menschlichen Genom sind bisher mehr als 70 Rho-GEFs bekannt (Garcia-Mata and Burrige, 2007), deren Aktivität selbst einer strikten Kontrolle unterliegt. Die Inaktivierung der GTPase, d.h. die Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat wird durch GAPs reguliert, von denen für Rho-Proteine über 80 identifiziert worden sind (Moon and Zheng, 2003). Weitere negative Regulatoren der Rho-Aktivität sind die GDIs, von denen bisher nur drei identifiziert wurden

(DerMardirossian and Bokoch, 2005). GDIs binden bevorzugt GDP-gebundene GTPasen und verhindern die spontane und GEF-katalysierte Nukleotidfreigabe (Hoffman *et al.*, 2000). Zusätzlich beeinflussen GDIs die Lokalisation der GTPasen in der Zelle, indem sie den GDP-gebundenem Zustand zytoplasmatisch stabilisieren (Olofsson, 1999). Zur Aktivierung der GTPasen müssen diese an die Membran transportiert werden, was eine Dissoziation des GDI-GTPase-Komplexes voraussetzt. In der GTP-gebundenen aktiven Form interagieren die GTPasen mit ihren Effektoren und erzeugen eine Vielzahl von Antwortprozessen.

Es sind weitaus mehr GEFs, GAPs und Effektoren als GTPasen selbst beschrieben (Garcia-Mata and Burridge, 2007; Moon and Zheng, 2003). Viele GEF- und GAP-Proteine sind nicht spezifisch für eine GTPase. Die Aktivität der GEFs und GAPs unterliegt deshalb einer strikten Kontrolle, um eine korrekte Zellantwort hervorzurufen. Die Regulation der Aktivität von GEFs und GAPs erfolgt u.a. durch die subzelluläre Lokalisation, durch Aufhebung einer inhibitorischen intramolekularen Interaktion sowie durch Phosphorylierung.

1.3.3.2 Funktionen der Catenine im Rho-Signalweg

Neben der Funktion von p120^{ctn} im Cadherin *Clustering* (Thoreson *et al.*, 2000; Yap *et al.*, 1998) moduliert zytoplasmatisches p120^{ctn} die Aktivität der GTPasen und beeinflusst die Zellmotilität (Abb. 1.4 A) (Anastasiadis and Reynolds, 2000; Grosheva *et al.*, 2001; Noren *et al.*, 2000). Überexpression von p120^{ctn} führt zur Ausbildung von langen Zellfortsätzen (*branching phenotype*) in Fibroblasten oder von Lamellipodien in Epithelzellen (Reynolds *et al.*, 1996). Deletionsexperimente zeigten, dass dieser Phänotyp über die *Armadillo-repeat* Domäne von p120^{ctn} vermittelt wird und nicht durch Überexpression von β -Catenin induziert werden konnte (Reynolds *et al.*, 1996). Die Bildung von Lamellipodien, Filopodien und langen Zellfortsätzen wird durch die Rho-GTPasen (siehe 1.3.3.1) reguliert. p120^{ctn} reduzierte die RhoA-Aktivität und erhöhte die Aktivität von Rac1 und Cdc42 (Anastasiadis and Reynolds, 2000, 2001; Krakstad *et al.*, 2004; Noren *et al.*, 2000). Der inhibierende Einfluss von p120^{ctn} auf die RhoA-Aktivität erfolgt vermutlich auf direktem und/oder indirektem Weg: (1) da p120^{ctn} die GDP-gebundene Form von RhoA stabilisiert, wurde eine GDI-ähnliche Funktion vorgeschlagen (Anastasiadis and Reynolds, 2000, 2001), (2) p120^{ctn} interagiert mit p190RhoGAP, welches RhoA inaktiviert (Wildenberg *et al.*, 2006), (3) p120^{ctn} inhibiert RhoA indirekt über die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 (Sander *et al.*, 1999). Die Aktivierung von

Rac1 und Cdc42 wird vermutlich über den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav2 moduliert, welcher direkt mit p120^{ctn} interagiert (Noren *et al.*, 2000). Der Einfluss von p120^{ctn} im Rho-Signalweg wird durch Überexpression von Cadherinen blockiert, welche p120^{ctn} zur Zellmembran sequestrieren (Anastasiadis and Reynolds, 2000; Grosheva *et al.*, 2001; Noren *et al.*, 2000; Reynolds and Rocznik-Ferguson, 2004). Ein Verlust von E-Cadherin führt zur Zunahme von zytoplasmatischem p120^{ctn}, verbunden mit einer erhöhten Motilität und Invasivität (Noren *et al.*, 2000; Thoreson *et al.*, 2000).

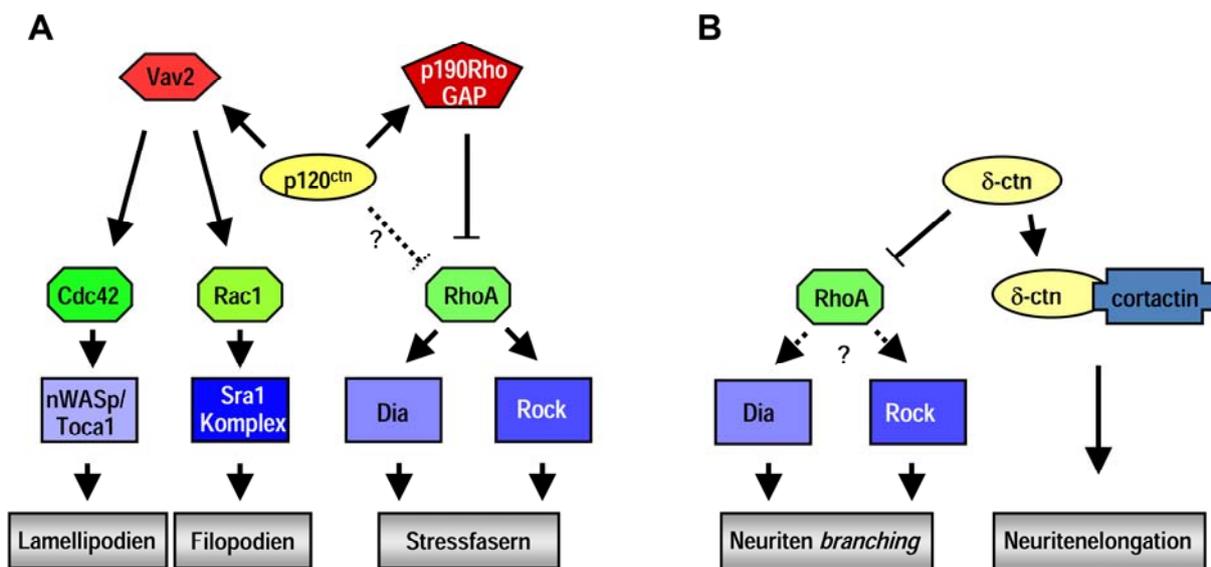


Abb. 1.4: Funktionen von p120^{ctn} und δ -Catenin im Rho-Signalweg. (A) p120^{ctn} inhibiert RhoA, welches mit der Reduktion von Stressfasern und Kontraktivität einhergeht. Die Inhibierung von RhoA wird vermutlich über die Interaktion mit p190RhoGAP vermittelt. Zudem interagiert p120^{ctn} direkt mit RhoA und reguliert dessen Aktivität vermutlich in einer GDI-ähnlichen Art und Weise. p120^{ctn} interagiert mit dem GEF Vav2, welches Rac1 und Cdc42 aktiviert. Diese induzieren eine Aktin-Reorganisation und die Bildung von Lamellipodien und/oder Filopodien. **(B)** δ -Catenin reguliert die RhoA-Aktivität während der neuronalen Entwicklung. Über die Interaktion mit Cortactin induziert δ -Catenin die Neuritenverlängerung. Demgegenüber inhibiert δ -Catenin RhoA, wodurch die Bildung des *branching* Phänotyps verursacht wird. In Anlehnung an (Keil *et al.*, 2007).

ARVCF und δ -Catenin sind weitere Mitglieder der p120^{ctn} Subfamilie, welche ebenso wie p120^{ctn} an die Juxtamembran Domäne (JMD) der Cadherine binden. Für beide Proteine wurden nach Überexpression ein *branching* Phänotyp und Regulation des Rho-Signalweges beschrieben (Fang *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 1996). ARVCF moduliert die Aktivität der Rho-GTPasen über eine direkte Interaktion mit RhoA und Vav2 (Fang *et al.*, 2004). Das deutet darauf hin, dass ARVCF einen ähnlichen Regulationsmechanismus zeigt, wie er bereits für p120^{ctn} beschrieben wurde. δ -Catenin wird hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert (Ho *et al.*, 2000). Die Induktion des *branching*

Phänotyps und die Neuritenverlängerung nach Überexpression von δ -Catenin werden über zwei verschiedene Mechanismen vermittelt (Abb. 1.4 B). Zum einen inhibiert δ -Catenin die Aktivität von RhoA und induziert den *branching* Phänotyp, zum anderen interagiert δ -Catenin mit Cortactin, ein aktinbindendes Protein, und induziert über den Arp2/3 Komplex die Neuritenverlängerung (Martinez *et al.*, 2003). Die Beteiligung von möglichen Regulatoren (GEFs, GAPs und GDIs) sowie Effektoren in diesem Prozess sind bislang ungeklärt.

Ebenfalls wird vermutet, dass die Plakophilinen Funktionen im Rho-Signalweg ausüben könnten. Plakophilin1 assoziiert über seine *Armadillo*-Domäne mit dem Aktinzytoskelett. Überexpression der *Armadillo-repeat* Domäne von Plakophilin1 induziert die Ausbildung von Lamellipodien, Filopodien und langen Zellfortsätzen in Epithelzellen (Hatzfeld *et al.*, 2000). Ein ähnlicher Phänotyp wurde auch nach Überexpression von Plakophilin2 beobachtet (Green and Hatzfeld, persönliche Mitteilung). Dieser Zellmotilitäts-Phänotyp ähnelt dem bereits beschriebenen *branching* Phänotyp von p120^{ctn} und impliziert eine mögliche Funktion im Rho-Signalweg. p120^{ctn} reguliert die Aktivität der Rho-GTPasen über GEFs und GAPs (Noren *et al.*, 2000; Wildenberg *et al.*, 2006). Für Plakophilin1 wurde ebenso eine Interaktion mit einem Rho-GEF Protein beschrieben und daraus folgend eine Funktion von Plakophilin1 im Rho-Signalweg vermutet (Hatzfeld *et al.*, in Vorbereitung).

1.3.3.3 Funktion und Regulation von RhoA in der Zytokinese

Der Prozess der Zellteilung wird innerhalb des Zellzyklus als M-Phase bezeichnet und setzt sich aus zwei Vorgängen zusammen: der Kernteilung (Mitose) und der Zytoplasmateilung (Zytokinese). Im folgenden Abschnitt werden die Strukturen und der molekulare Mechanismus während der Zytokinese beschrieben. Die Zytokinese beginnt bereits in der Anaphase mit der Ausprägung und Positionierung der Teilungsfurche. An diesem Prozess sind die Zentrosomen, die zentrale Spindel (Überlappungsbereiche der polaren Mikrotubuli) und der kontraktile Ring beteiligt (Glotzer, 2001). Die Bildung des kontraktilen Ringes wird über die GTPase RhoA reguliert. In der späten Telophase ist der Abschnürungsprozess so weit fortgeschritten, dass die Zellen nur noch über eine dünne zytoplasmatische Brücke verbunden sind. Diese Brücke enthält eine Struktur gebündelter Mikrotubuli und assoziierter Proteine und wurde erstmals von Flemming beschrieben und als Zentralkörper bezeichnet (Flemming, 1891). Weiterhin muss aufgrund der

Oberflächenvergrößerung während des Abschnürungsprozesses neue Membran im Bereich des kontraktilen Ringes eingebaut werden.

Die zentrale Spindel bestimmt die Position, an der die Teilungsfurche entsteht, und wird während des gesamten Abschnürungsprozesses benötigt (Wheatley and Wang, 1996). Am Aufbau der zentralen Spindel sind PRC1 (*protein regulator of cytokinesis 1*) und der Zentralspindlin-Komplex, bestehend aus dem Rho-GAP Protein MgcRacGAP/CYK-4 und dem Kinesin ähnlichen Protein MKLP1/Pavarotti/ZEN-4, beteiligt (Jantsch-Plunger *et al.*, 2000; Mishima *et al.*, 2002; Mollinari *et al.*, 2002). Der Zentralspindlin-Komplex ist für die Bildung stabiler Mikrotubuli-Bündel erforderlich (Adams *et al.*, 1998; Mishima *et al.*, 2002). Ein weiterer Komplex, welcher die Lokalisation des Zentralspindlin-Komplexes an der Teilungsfurche kontrolliert, ist der Aurora B Kinase Komplex (Schumacher *et al.*, 1998; Severson *et al.*, 2000). Aurora B phosphoryliert MgcRacGAP am Zentralkörper, wodurch es eine Spezifität für RhoA erlangt (Minoshima *et al.*, 2003). Depletion der *D. melanogaster* Aurora B Kinase über siRNAs oder Überexpression einer katalytisch inaktiven Form von Aurora B in humanen Zellen zeigen Zytokinesedefekte (Adams *et al.*, 2001; Giet and Glover, 2001; Tatsuka *et al.*, 1998; Terada *et al.*, 1998). Dieser dominant negative Phänotyp impliziert, dass die Phosphorylierung von Aurora B Substraten für den Abschluss der Zytokinese notwendig ist. Weitere Komponenten der zentralen Spindel sind die mitotische Protein Kinase Plk1 (*Polo-like kinase 1*) (Adams *et al.*, 1998) und das Rho-GEF Protein Ect2 (*epithelial cell transforming protein 2*) (Tatsumoto *et al.*, 1999; Yuce *et al.*, 2005). MgcRacGAP und MKLP1 werden für die Lokalisierung von Ect2 an die zentrale Spindel in der Anaphase benötigt (Yuce *et al.*, 2005). MKLP2, eine alternative Splicevariante von MKLP1, assoziiert mit den mitotischen Protein Kinasen Aurora B und Plk1 und ist für deren Transport von den Zentrosomen zur zentralen Spindel verantwortlich (Barr *et al.*, 2004; Gruneberg *et al.*, 2004). Neben der essentiellen Funktion der genannten Proteine an der Bildung der zentralen Spindel, spielen diese auch eine Rolle in der Signaltransduktion vom Tubulingerüst zum Cortex, wo die Teilungsfurche entsteht.

Für den Aufbau des kontraktilen Ringes sind die Aktivierung von Myosin II und die Polymerisation von Aktin verantwortlich (Abb. 1.5). Beide Prozesse werden von RhoA initiiert. Sowohl die Inhibierung von RhoA durch RNAi oder der C3-Transferase als auch die konstitutive Aktivierung von RhoA führt zur Blockade der Zytokinese (Aktories and Hall, 1989; Drechsel *et al.*, 1997; Jantsch-Plunger *et al.*, 2000). Wie bereits unter 1.3.3.1 erwähnt,

wird die Aktivität von RhoA durch GEFs, GAPs und GDIs reguliert. Das wichtigste GEF-Protein für RhoA in der Zytokinese ist Ect2 (Prokopenko *et al.*, 1999; Tatsumoto *et al.*, 1999). Inaktivierung von Ect2 über siRNAs bzw. durch Antikörper Mikroinjektions-Experimente verhindert Translokation von RhoA und Aktin zum äquatorialen Cortex und führt zur Bildung mehrkerniger Zellen (Kim *et al.*, 2005; Tatsumoto *et al.*, 1999; Yuce *et al.*, 2005). Auch die Überexpression eines N-terminalen Ect2-Fragmentes, dem die katalytische Domäne und das Kernlokalisierungssignal fehlen, induziert einen Zytokinesedefekt (Kimura *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2003; Tatsumoto *et al.*, 1999). Dieser Zytokinesedefekt beruht nicht auf einer fehlenden Bildung der Teilungsfurche und des Zentralkörpers, sondern auf Defekten in der Zellabschnürung (Chalamalasetty *et al.*, 2006). Das deutet darauf hin, dass für einen erfolgreichen Abschluss der Zytokinese sowohl die katalytische Aktivität als auch der Reimport von Ect2 in den Zellkern notwendig ist.

RhoA-GTP interagiert und aktiviert spezifische Effektorproteine, welche die Bildung des Aktomyosin kontraktile Ringes regulieren und koordinieren (Abb. 1.5). Zu den Effektorproteinen gehören die Rho-Kinasen (ROCKI, ROCKII und Citron Kinase) und die Formine. Die Rho-Kinasen lokalisieren an der Teilungsfurche und phosphorylieren MLC (*myosin light chain*) (Amano *et al.*, 1996; Kosako *et al.*, 2000; Kureishi *et al.*, 1997; Yamashiro *et al.*, 2003). Durch Inaktivierung der MLC Phosphatase kann ROCK indirekt die Phosphorylierung von MLC regulieren (Amano *et al.*, 1996; Kawano *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 1996). Neben den Rho-Kinasen sind weitere Kinasen, wie z. B. MLCK und ZIP Kinase, an der Phosphorylierung von MLC beteiligt (Murata-Hori *et al.*, 1999; Sellers *et al.*, 1981). Dieses führt zu einer verstärkten Aktin-Myosin-Interaktion und Kontraktilität. Formine, eine weitere Gruppe von Rho-Effektorproteinen, regulieren die Polymerisation und Stabilisierung der Aktinfilamente an der Teilungsfurche. Sie zeichnen sich durch eine Profilin-bindende FH1-Region und eine Aktin-bindende FH2-Region aus. Im inaktiven Zustand werden die FH1- und FH2-Domänen von einer N-terminalen GTPase-Bindungsdomäne (GBD) und einer C-terminalen Diaphanous-Autoregulatorischen Domäne (DAD) inhibiert. Die Bindung von GTP-RhoA an die GBD-Domäne löst die inhibitorische intramolekulare Interaktion zwischen GBD und DAD auf und aktiviert das Formin (Alberts, 2001). Über ihre FH1-Domäne interagieren die Formine mit Profilin, welches die Formin vermittelte Aktinnukleation stimuliert.

Wie bereits erwähnt reguliert die Citron Kinase die Phosphorylierung von MLC, aber hemmt im Gegensatz zu ROCK nicht die MLC Phosphatase (Yamashiro *et al.*, 2003). Depletion der Citron Kinase über siRNAs und Überexpression von Deletionsmutanten induzieren Zytokinesedefekte (Gruneberg *et al.*, 2006; Madaule *et al.*, 1998). Diese Zytokinesedefekte beruhen nicht auf einer fehlenden Bildung und Ingression der Teilungsfurche (Gruneberg *et al.*, 2006). Das deutet darauf hin, dass die Citron Kinase vermutlich den Abschnürungsprozess regulieren könnte. Zielproteine neben MLC sind bisher nicht charakterisiert.

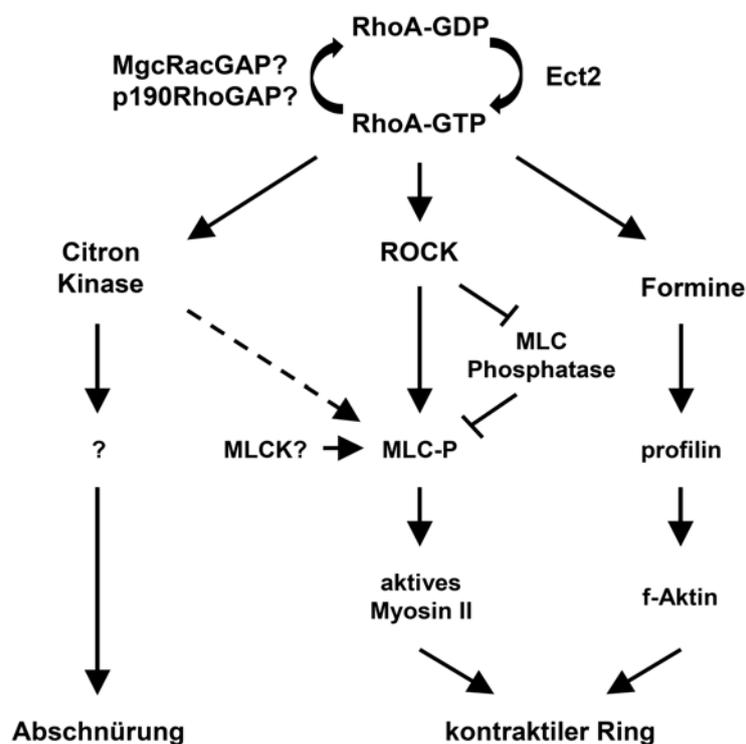


Abb. 1.5: RhoA-Signalweg in der Zytokinese. Die Aktivität von RhoA wird durch das GEF-Protein Ect2 und durch GAPs, vermutlich MgcRacGAP und p190RhoGAP, reguliert. Im GTP-gebundenen Zustand aktiviert RhoA spezifische Effektoren, welche die Bildung des Aktomyosin kontraktiven Ringes und die Abschnürung regulieren.

Für einen erfolgreichen Abschluss der Zytokinese muss RhoA inaktiviert werden, was zur Depolymerisation and damit zum Abbau der Aktinfilamente führt. Die Inaktivierung von RhoA wird zum einen durch den Reimport von Ect2 in den Zellkern und zum anderen durch MgcRacGAP reguliert (Minoshima *et al.*, 2003; Tatsumoto *et al.*, 1999). Die Aktivität von MgcRacGAP unterliegt, ebenso wie bei den GEFs, einer strikten Kontrolle. Durch Phosphorylierung von MgcRacGAP durch die Kinase Aurora B wird die Substratspezifität für

Rac1 und Cdc42 zu RhoA hin verschoben (Minoshima *et al.*, 2003). Demwider sprechen die Daten von Yamada und Kollegen, die keine Beteiligung der GAP-Aktivität von MgcRacGAP während der Zytokinese in B Lymphozyten postulieren (Yamada *et al.*, 2006). Daher stellt sich die Frage, ob weitere GAPs die RhoA-Aktivität während der Zytokinese regulieren können. Ein möglicher Kandidat wäre p190RhoGAP, welches an der Teilungsfurche lokalisiert und nach Überexpression einen Zytokinesedefekt induziert (Su *et al.*, 2003). Der genaue Regulationsmechanismus für die Inaktivierung von RhoA und die Abschnürung ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die präzise zeitliche und räumliche Regulation der RhoA-Aktivität ist essentiell für den Ablauf der Zytokinese.

1.3.4 Translation

In einem Hefe-Dihybrid *screen* mit der Plakophilin1 „Kopf“-Domäne wurden die eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren (eIF) 4A1 und verschiedene Untereinheiten von eIF3 als putative Interaktionspartner identifiziert (Hatzfeld, persönliche Mitteilung). Aufgrund der möglichen Funktion von Plakophilin1 während der Translation, auf die ein Teil der vorliegenden Arbeit aufbaut, wird der Mechanismus der Translationsinitiation kurz eingeführt. Die Initiation ist der limitierende Regulationsschritt in der Translation. Dieser beinhaltet alle Prozesse, die stattfinden, um Ribosomen zusammen mit der Initiator-Methionyl-transfer-RNA (Met-tRNA_i) auf dem Startcodon einer mRNA zu assemblieren. An diesem Prozess sind verschiedene eIFs beteiligt. Im folgenden Abschnitt wird nur auf die *cap*-abhängige Translationsinitiation näher eingegangen, obwohl auch alternative Initiationsschritte, wie die IRES-vermittelte Translationsinitiation, eine wichtige Rolle spielen.

1.3.4.1 *Cap-abhängige Initiation der Translation*

Die Translationsinitiation von Eukaryoten beginnt mit der Anlagerung des komplexen Faktors eIF4F an der *cap*-Struktur der mRNA. eIF4F setzt sich aus den Initiationsfaktoren eIF4G, eIF4E und eIF4A zusammen. eIF4G ist ein multifunktionelles Adapterprotein, welches im N-Terminus eine Bindungsstelle für eIF4E und PABPC1 (poly(A)-Bindepotein) und im zentralen Bereich eine Bindungsstelle für eIF4A und eIF3 aufweist. Der C-terminale

Bereich von eIF4G enthält eine zweite eIF4A-Bindungsstelle und eine Bindungsstelle für die eIF4E-phosphorylierende Kinase Mnk1 (De Gregorio *et al.*, 1999; Imataka and Sonenberg, 1997; Imataka *et al.*, 1998; Lamphear *et al.*, 1995; Mader *et al.*, 1995; Pyronnet *et al.*, 1999). Die Bindung des eIF4F-Komplexes an der *cap*-Struktur wird über eIF4E vermittelt (Sonenberg *et al.*, 1978). eIF4A1 ist eine bidirektional arbeitende RNA-Helikase, die unter ATP-Verbrauch Sekundärstrukturen der mRNA aufwindet (Rozen *et al.*, 1990; Svitkin *et al.*, 2001). Der eIF4F-Komplex besitzt eine deutlich höhere Helikase-Aktivität als eIF4A allein und wird durch eIF4B und eIF4H stimuliert (Oberer *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2001; Rozen *et al.*, 1990). Daher wird angenommen, dass eIF4A im Komplex mit eIF4E und eIF4G die physiologisch relevante Form von eIF4A darstellt.

Die 80S-Ribosomen dissoziieren in ihre 40S- und 60S-Untereinheiten durch die Bindung von eIF3, eIF1 und eIF1A an die ribosomale 40S-Untereinheit. Der ternäre Komplex, bestehend aus der Met-tRNA_i und dem GTP beladenen eIF2, lagert sich an die ribosomale 40S-Untereinheit an und bildet so den 43S Prä-Initiationskomplex (Majumdar *et al.*, 2003). Die Bindung des 43S Prä-Initiationskomplexes an der *cap*-Struktur wird über das *cap*-Bindepotein eIF4E vermittelt und mit Hilfe von eIF4G und eIF3 koordiniert (Lamphear *et al.*, 1995; Morino *et al.*, 2000). Der gebildete 48S Initiationskomplex durchsucht die mRNA nach dem Startcodon. Bei der Selektion des Startcodons sind neben eIF2 auch die beiden Initiationsfaktoren eIF1 und eIF1A beteiligt (Pestova *et al.*, 1998). Nach Basenpaarung des Startcodons mit dem Met-tRNA_i-Anticodon stimuliert eIF5 die Hydrolyse des an eIF2 gebundenen GTP. Die Initiationsfaktoren dissoziieren von der 40S ribosomalen Untereinheit ab. eIF5B vermittelt die Rekrutierung der 60S ribosomalen Untereinheit, wodurch das 80S Ribosom entsteht (Pestova *et al.*, 2001). Die Regeneration des eIF2-GDP-Komplexes erfolgt durch das GEF-Protein eIF2B.

Der Prozess der Translationsinitiation ist streng reguliert. Die Aktivität der Initiationsfaktoren spielt dabei eine entscheidende Rolle und kann auf vielfältige Weise kontrolliert werden: (1) durch die reversible Phosphorylierung, (2) durch die Interaktion mit Repressormolekülen und (3) durch die Proteolyse von eIF4G. Die Phosphorylierung von eIF4E, 4E-BPs (4E-Bindeproteine), eIF4B, eIF4G, eIF3 und dem ribosomalen S6 Protein korreliert mit der Aktivierung der Proteinsynthese (Übersicht in (Gingras *et al.*, 1999b; Hay and Sonenberg, 2004), während die Phosphorylierung von eIF2 α die Translationsinitiation inhibiert (Regulationsmechanismus siehe 1.3.4.2; Übersicht in (Holcik and Sonenberg,

2005)). Mnk1 und 2 (*MAP kinase integrating kinase*), rekrutiert durch eIF4G, phosphorylieren eIF4E am Serin209 (Fukunaga and Hunter, 1997; Pyronnet *et al.*, 1999; Waskiewicz *et al.*, 1997). Durch die Phosphorylierung von eIF4E wird vermutlich dessen Affinität zur *cap*-Struktur erhöht und die Bildung des vollständigen eIF4F-Komplexes gefördert (Minich *et al.*, 1994). Die Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins, sowie von eIF4B, eIF4G und 4E-BPs wird über den Akt-mTOR-S6K Signaltransduktionsweg reguliert. 4E-BPs (4E-BP1, -BP2 und -BP3) sind negative Regulatoren der Translationsinitiation. Sie binden in ihrer unphosphorylierten Form an eIF4E. Dabei scheinen diese Bindeproteine nicht die Bindung von eIF4E an der *cap*-Struktur zu unterbinden (Pause *et al.*, 1994a). Vielmehr unterdrücken sie die Interaktion mit eIF4G und damit die Formation des funktionellen eIF4F-Komplexes (Haghighat *et al.*, 1995; Mader *et al.*, 1995). Durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 wird die Affinität zu eIF4E reduziert und der eIF4F-Komplex kann gebildet werden (Gingras *et al.*, 1999a). Eine Inaktivierung des eIF4F-Komplexes kann auch durch verschiedene virale Faktoren hervorgerufen werden. Die enterovirale Protease 2A spaltet eIF4G, wodurch es zu einer Inhibierung der *cap*-abhängigen Translation kommt (Etchison *et al.*, 1982; Lamphear *et al.*, 1993; Lamphear *et al.*, 1995).

1.3.4.2 Translationskontrolle unter zellulärem Stress – Bildung von stress granules

Unter zellulärem Stress kommt es zu einer Reprogrammierung der Translationsmaschinerie, wobei die Proteinexpression vermutlich auf solche Proteine beschränkt wird, die unter diesen Bedingungen für das Überleben der Zelle essentiell sind. Dabei werden mRNAs translationell reprimiert und in dieser inaktiven aber prinzipiell translationskompetenten Form gespeichert. Sie lokalisieren zusammen mit RNA-bindenden Proteinen (RBPs) in definierten zytoplasmatischen Partikeln, den *stress granules* (Anderson and Kedersha, 2002a, b; Kedersha and Anderson, 2002). *Stress granules* können durch verschiedene Stimuli wie z.B. Hitzeschock, oxidativer Stress, UV-Bestrahlung, osmotischer Stress, Nahrungsmangel, Hypoxie oder Virusinfektionen induziert werden. Infolge der veränderten Umweltbedingungen werden Kinasen (PKR, PERK, GCN2 und HRI) aktiviert, welche eIF2 α am Serin51 phosphorylieren (Übersicht in (Holcik and Sonenberg, 2005)). Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zur Inaktivierung von eIF2B und bewirkt somit eine Reduktion des eIF2-GTP-tRNA^{Met} ternären Komplexes (Kedersha and Anderson, 2002;

Kedersha *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass die RNA-bindenden Proteine TIA-1 und TIAR den Platz des aktiven ternären Komplexes einnehmen können und einen inaktiven 48S*-Komplex bilden (Anderson and Kedersha, 2002b). Aufgrund der Autoaggregation von TIA-1 und TIAR kommt es zur Ausbildung von *stress granules* (Kedersha *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus der Formation dieser zytoplasmatischen Strukturen ist bisher noch nicht in allen Einzelheiten bekannt.

Neben der Inhibierung der Translation durch Phosphorylierung von eIF2 α können *stress granules* auch unabhängig von diesem Schlüsselereignis entstehen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Störung der Aktivität von eIF4A durch Agenzien wie Hippuristanol oder Pateamin A die Ausbildung von *stress granules* induzieren (Bordeleau *et al.*, 2005; Bordeleau *et al.*, 2006; Dang *et al.*, 2006; Low *et al.*, 2005). Ebenfalls führt die Inaktivierung des eIF4F-Komplexes infolge einer Poliovirus-Infektion zur Assemblierung von *stress granules* unabhängig von der Phosphorylierung von eIF2 α (Mazroui *et al.*, 2006). Allen initialen Schritten der *stress granule* Entstehung ist eine Inhibierung der Translationsinitiation gemeinsam.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die Plakophiline und p0071 sind Mitglieder der *Armadillo*-Multigenfamilie. Neben ihrer Funktion als Strukturprotein bei der Regulation von Adhäsion weisen diese Proteine auch eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation auf. Die Funktion der Plakophiline und des p0071 im Zytoplasma ist bislang weitestgehend unbekannt. Um Hinweise auf eine mögliche zytoplasmatische Funktion von Plakophilin1 zu erhalten, wurde in vorangegangenen Arbeiten ein Hefe-Dihybrid *screen* von einer HeLa cDNA Bank mit der Plakophilin1 „Kopf“-Domäne durchgeführt. Auf diesem Weg wurden folgende putative Interaktionspartner für Plakophilin1 identifiziert: eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor (eIF) 4A1, eIF3S8 (eIF3p110), eIF3S5 (eIF3p47) und eIF3S6 *interacting protein* (IP) (eIF3p48 IP). Alle haben Funktionen in der Translationsinitiation, wobei diese für eIF4A1 am besten charakterisiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Plakophiline hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und Interaktion mit eIF4A1 untersucht werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss der Plakophiline auf die Translation mittels *in vivo* und *in vitro* Studien analysiert

werden. Um einen ersten Hinweis darüber zu erhalten, wie Plakophilin1 die Translation stimulieren könnte, sollte der direkte Einfluss von Plakophilin1 auf die ATPase-Aktivität von eIF4A1 untersucht werden. Die Regulation der Translation steht im Zusammenhang mit der Regulation des Zellwachstums und der Zellgröße. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Proliferationsaktivität und die Zellgröße nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 zu bestimmen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die zytoplasmatische Funktion von p0071 charakterisiert werden. Aus Vorarbeiten von Frau Prof. Hatzfeld war bekannt, dass die Überexpression von p0071 einen Zellteilungsdefekt induziert, welcher mit der Bildung von mehrkernigen Zellen einhergeht. Aufgrund dieser Hinweise war zu vermuten, dass p0071 eine Funktion während der Mitose und/oder der Zytokinese haben könnte. Um dieser Frage nachzugehen, sollte zum einen die Lokalisation von p0071 während der Mitose und zum anderen die Funktion von p0071 während der Zytokinese und der molekulare Mechanismus des Zellteilungsdefektes näher analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck und Karl Roth in der Qualitätsstufe p.a. bezogen. Enzyme und DNA-Größenstandards wurden von Fermentas bezogen. Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma PAA bezogen.

2.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
TOP10F'	<i>E. coli</i> , F' $\{lacI^q Tn10 (Tet^r)\}$ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG$
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> , F' <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> ($\lambda cIts857 ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1$), <i>dcm</i> (DE3)
BL21 (DE3) pLysS	<i>E. coli</i> , F' <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal</i> ($\lambda cIts857 ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1$), <i>dcm</i> (DE3) <i>pLysS</i> (Cam^r)

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium:

LB (Luria Bertani): 1% NaCl (w/v); 1% Trypton (w/v); 0,5% Hefeextrakt (w/v); pH 7.0

Für LB-Agar wurde 1,5% (w/v) Agar zugegeben.

Zur Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit des Vektors mit 150 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin supplementiert.

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde 2xYT-Medium verwendet.

2xYT: 1% NaCl (w/v); 1,6% Trypton (w/v); 1% Hefeextrakt (w/v); pH 7.0

2.1.3 Hefestämme

Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden folgende Hefestämme verwendet.

Stamm	Genotyp
YRG2	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>

Die Anzucht von *S. cerevisiae* vor der Transformation erfolgte in YPD-Medium:

YPD: 2% BactoPepton (w/v); 1% Hefeextrakt (w/v); 2% Glukose (w/v);
pH 6.5

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte in SD-Medium:

SD: 0,67% Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren (w/v); 2% Glukose
(w/v); 1x synthetisches Aminosäure Drop-Out-Supplement; pH 5.8
Für YPD- bzw. SD-Agar wurde 1,5% (w/v) Agar hinzugegeben.

2.1.4 Zelllinien

HaCaT humane epitheliale Keratinozyten Zelllinien (Boukamp *et al.*, 1988)
HEK 293 humane embryonale Nieren Zelllinie (Graham *et al.*, 1977)
HeLa humane epitheliale Cervix-Karzinoma Zelllinie (Gey, 1952)
MCF-7 humane Mammakarzinomzelllinie (Dickson *et al.*, 1986)

2.1.5 Antikörper

Tab. 2.1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Primärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
anti- α -Tubulin (DM1 α)	mAK Maus	Sigma-Aldrich	1:750 IF, 1:4000 WB
anti-Flag	mAK Maus	Sigma-Aldrich	1:1000 IF; 1:4000 WB
anti-GFP (Klon GFP-20)	mAK Maus	Sigma-Aldrich	1:200 WB
anti-Plakophilin2	mAK Maus	Progen	1:50 IF; 1:200 WB
anti-Plakophilin3	mAK Maus	Progen	1:200 WB
anti-Plakophilin3	mAK Maus	Zymed	1:1000 IF
anti-TIAR	mAK Maus	BD Transduction	1:500 IF
anti-Vinculin (hVin1)	mAK Maus	Sigma-Aldrich	1:2500 WB
anti-His	mAK Maus	QIAGEN	1:2000 WB
anti-GST	mAK Maus	Parmingen/BD	1:2000 WB
anti-E-Cadherin	mAK Maus	BD Transduction	1:1000 IF
anti-HA	pAK Kaninchen	Rockland	1:500 IF
anti-p0071 (678)	pAK Kaninchen	Hatzfeld <i>et al.</i> , 1996	1:750 IF, 1:1000 WB
anti-Plakophilin1 (667)	pAK Kaninchen	Hatzfeld <i>et al.</i> , 2000	1:750 IF; 1:3000 WB
anti-eIF4A1	pAK Ziege	Santa Cruz	1:250 IF; 1:500 WB

anti-TIAR	pAK Ziege	Santa Cruz	1:500 IF
anti-Ect2	pAK Ziege	Abcam	1:200 IF
Sekundärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Cy3-anti Maus IgG	Esel	Dianova	1:750
Alexa488-anti Maus IgG	Esel	Molecular Probes	1:250
HRP-anti Maus IgG	Esel	Dianova	1:10.000
Cy3-anti Kaninchen IgG	Esel	Dianova	1:750
Alexa647-anti Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes	1:200
HRP-anti Kaninchen IgG	Ziege	Dianova	1:10.000
Cy3-anti Ziege IgG	Esel	Dianova	1:750
Alexa488-anti Ziege IgG	Esel	Molecular Probes	1:250
HRP-anti Ziege IgG	Esel	Dianova	1:10.000

2.1.6 Plasmide

pcDNA3	Invitrogen
pDsRed-N1	BD Biosciences
pEGFP-C2	BD Biosciences
pGADT7	BD Biosciences
pGBKT7	BD Biosciences
pGEX-5x1	Amersham GE Healthcare
pRSETA	Invitrogen
BLOCK-iT	Invitrogen
pCR [®] 2.1. TOPO [®]	Invitrogen
pRL-CMV	Promega
pYFP1-Flag-C2	S. Hüttelmaier
pYFP1-Flag-N2	S. Hüttelmaier
pYFP2-HA-C2	S. Hüttelmaier
pcDNA3-FL	(Hüttelmaier <i>et al.</i> , 2005)
pcDNA3-da-RhoA	A. Reynolds
pcDNA3-dn-RhoA	A. Reynolds
pGFP-G3BP	(Stohr <i>et al.</i> , 2006)
pET16b-eIF4A1 R362Q	(Pause <i>et al.</i> , 1994b)
pGemCAT	(Ostareck <i>et al.</i> , 1997)
pGFP-p0071 wt	(Hatzfeld <i>et al.</i> , 2003)

p0071 wt-DsRed (Hatzfeld *et al.*, 2003)

pGBKT7-p0071 *repeats* (Hatzfeld *et al.*, 2003)

2.1.7 Oligonukleotide

Die für die Klonierung und qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide sowie siRNAs sind im Anhang Tab. 7.1-7.3. aufgeführt. Sie wurden von MWG bezogen.

2.1.8 Kit-Systeme

Expand High Fidelity PCR System	Roche
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed
Jetquick Plasmid Maxiprep Kit	Genomed
Jetquick Plasmid Miniprep Kit	Genomed
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
MEGAscript-T7-Kit	Ambion
NucleoSpin RNA clean-up Kit	Macherey-Nagel
MicroBC Assay	Uptima
Dual-Glo™ Luziferase Assay System	Promega
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega
SenoLyte™ MG Phosphate Assay	MoBiTec
RhoGEF exchange Assay	Cytoskeleton
Cell Proliferation ELISA Kit, BrdU	Roche
Cell Line Nucleofector® Kit V	Amaxa

2.1.9 Chromatographiesäulen

Histrap	Amersham Pharmacia
HiLoad 16/60 Superdex 200	Amersham Pharmacia
MonoQ	Amersham Pharmacia

2.1.10 Radiochemikalien

(α - ³⁵ S) Redivue Methionin	Amersham Pharmacia
(γ - ³² P) ATP	Perkin Elmer

2.1.11 Sonstiges

ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
TLC Cellulose	Merck
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche
Hyperfilm™ MP	Amersham
Blotmembran	Whatman
Zellkulturmaterialien	TPP
qRT-PCR-Materialien	peQLab
PhosphoImager-Screens	Molecular Dynamics, Fuji

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie DNA-Präzipitation, -Gelelektrophorese, PCR und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden nach (Sambrook, 1989) bzw. nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *Mini-* bzw. *Maxi-Plasmid-Purification-Kit* der Firma Genomed. Enzymatische Reaktionen, wie Ligation oder Restriktionsspaltung von DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der entsprechenden Enzyme und Puffer. Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der *Jetquick Gel Extraction Spin Kit* der Firma Genomed verwendet.

2.2.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung der TRIZOL-Methode. Die Zellen einer 2 cm Schale wurden mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml TRIZOL aufgenommen. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden Zelltrümmer für 10 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 200 µl Chloroform extrahiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Trennung des Phasengemisches durch Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4°C). Der RNA-haltige, wässrige Überstand wurde vorsichtig, unter

Vermeidung eines Kontaktes mit der proteinhaltigen Interphase, abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurden die RNA durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl kaltem 80%igen Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 30 µl RNase/DNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Um eine DNA-Kontamination auszuschließen, wurden für die Reporter-gen-Analysen ein DNase-Verdau durchgeführt. Standardmäßig wurden 5 µg Gesamt-RNA, 5 µl DNaseI (1 Units/µl), 5 µl DNase-Puffer in 50 µl Gesamtvolumen für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 50 µl RNase/DNase-freiem Wasser aufgefüllt und die Gesamt-RNA mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol erneut extrahiert. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 10 µl Ammoniumacetat (3 M) und 250 µl 100% Ethanol für 1 h bei -20°C. Die RNA wurde wie oben beschrieben pelletiert, gewaschen, getrocknet und in RNase/DNase-freiem Wasser aufgenommen.

TRIZOL

0,8 M Guanidiniumthiocyanat
0,4 M Ammoniumthiocyanat
0,1 M NaAcetat, pH 5,0
5% (w/v) Glycerol
38% (v/v) Roti-Aqua-Phenol für RNA-Isolierung

Phosphatpuffer (PBS), pH 7.3

137 mM NaCl
2,6 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄

2.2.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNA mit Hilfe von *random hexamer*-Primern und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Mit sequenzspezifischen Primern können dann einzelne cDNAs in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert werden. Standardmäßig wurden 2 µg Gesamt-RNA mit 1 µl *random hexamer*-Primern in 11,5 µl Gesamtvolumen 5 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl dNTPs (10 mM), 2 µl DTT (100 mM) und 100 Units SuperScriptII Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben. Die Reaktion wurde 1 h bei 42°C inkubiert und danach durch Erhitzen auf 75°C für 15 min gestoppt. Die cDNA wurde falls nicht unmittelbar verwendet bei -20°C gelagert.

2.2.4 Herstellung von Expressionsplasmiden

Alle Klonierungen wurden standardmäßig wie folgt durchgeführt. Als Matrize für *de novo* Amplifikationen dienten cDNAs, welche mittels SuperScriptII (Invitrogen) aus HeLa- bzw. HaCaT-RNA nach Herstellerangaben synthetisiert wurden. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mittels der *Expand High Fidelity Polymerase* (Roche) und mit spezifischen Oligonukleotiden, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthielten, nach Angaben des Herstellers amplifiziert (Oligonukleotide siehe Anhang Tab. 7.1). Das PCR-Produkt wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande der entsprechenden Größe wurde anschließend mittels dem *Jetquick Gel Extraction Spin Kit* (Genomed) extrahiert und in pCR[®] 2.1. TOPO[®] ligiert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung verifiziert und anschließend über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in die verschiedenen Expressionsvektoren mittels T4-DNA-Ligase subkloniert. Für die Herstellung der shRNA-Konstrukte wurde der *BLOCK-iT inducible HI RNAi Entry Vector Kit* von Invitrogen verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den vom Hersteller gemachten Angaben. Die Primer-Sequenzen, die für die Klonierung benötigt wurden sind im Anhang Tab. 7.1 aufgeführt. Die shRNA-Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Konstrukte sind im Anhang Tab. 7.4 zusammengefasst.

2.2.5 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung der Expression von mRNA wurde in einer quantitativen RT-PCR, mit Hilfe des iCycler IQTM Systems (Bio-Rad) durchgeführt. Dieses System erlaubt eine quantitative und qualitative PCR mit Hilfe des Farbstoffes SYBR[®] Green I. Dieser fluoresziert nur, wenn er an doppelsträngige DNA (dsDNA) gebunden ist. Die verwendeten Primer sind im Anhang Tab. 7.2 aufgeführt. Beim Primerdesign ist besonders auf die Schmelztemperatur und auf mögliche Sekundärstrukturen, welche zu Primerdimerisierungen führen können, zu achten. Die Qualität und Spezifität des Produktes kann anhand einer Schmelzkurvenanalyse überprüft werden, welche im Anschluss an die PCR durchgeführt wurde. Durch langsame kontinuierliche Temperaturerhöhung wird das doppelsträngige PCR-Produkt in seine beiden Einzelstränge geschmolzen, wodurch das gebundene SYBR Green[®] freigesetzt wird und nicht mehr fluoresziert.

Jede qRT-PCR wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei kamen folgende Standardbedingungen zur Anwendung:

Master-Mix1: (Angaben pro Reaktionsansatz)

- 7,5 µl 2xPCR-Master-Mix (Promega)
- 0,3 µl SYBRgreen® (Stocklösung 1:1000 in DMSO verdünnt)
- 0,03 µl Fluorescein (Referenzfarbstoff, peQLab)
- 2,17 µl RNase/DNase-freies Wasser

Master-Mix2: (Angaben pro Reaktionsansatz)

- 10 µl Master-Master-Mix 1
- 0,03 µl *sense* Primer (100 µM)
- 0,03 µl *antisense* Primer (100 µM)

Der Master-Mix1 wurde im Überschuss für alle durchzuführenden Reaktionen hergestellt. Anschließend wurde der Master-Mix2 für jedes einzelne Primerpaar separat hergestellt. Pro Reaktion wurden zuerst 10 µl Master-Mix2 in ein *well* einer 96well-Mikrotiterplatte und anschließend 5 µl der zuvor 1:5 verdünnten cDNA pipettiert. Als negative Kontrollen bei der Amplifizierung des entsprechenden Gens wurde eine Wasserprobe bzw. RT-PCR-Ansätze ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Der qRT-PCR-Ansatz wurde nach folgendem Programm vermessen: initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C, 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (10 s bei 95°C), *annealing* (30 s bei 60°C) und Elongation (30 s bei 72°C), Schmelzkurve (60°C-95°C).

Die Auswertung der Messwerte erfolgte unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Bei dieser relativen Quantifizierung werden die C_T -Werte (*threshold cycle*; Zykluszahl, bei der die entstandene Produktmenge einen definierten Schwellenwert erreicht) der zu quantifizierenden Transkripte zweier Populationen (z.B. *Knockdown* und Kontrolle) direkt unter Normalisierung auf ein Kontrollgen mit einander verglichen. Eine vorherige Quantifizierung der Absolutmengen mittels Standardkurven ist dadurch nicht mehr notwendig. Hierbei wird eine 100%ige PCR-Effizienz vorausgesetzt. Zur Auswertung wurde folgende Formel verwendet:

$$R = 2^{((C_{T\text{-Zielgen}} - C_{T\text{-Kontrollgen}})_x - (C_{T\text{-Zielgen}} - C_{T\text{-Kontrollgen}})_y)}$$

R – mRNA ration; x – Population; y - Kontrollpopulation

Standardmäßig dienten in dieser Arbeit Cyclophilin A und RPLP0 als Kontrollgene der Normalisierung.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung von HaCaT, HEK 293 und HeLa Zellen erfolgte in DMEM (*Dublecco's Modified Eagle Medium*) mit 1 mM Natriumpyruvat und 10% (v/v) FCS (Fötale Kälber Serum) bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in 10 cm Schalen kultiviert. Je nach Konfluenz wurden die Zellen nach 2 bis 3 Tagen passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen mit PBSE gewaschen und durch Zugabe von 0,05 % Trypsin/PBSE abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden anschließend im Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl replatiert. Für Immunfluoreszenzanalysen wurden HaCaT und MCF-7 Zellen in 6well-Platten, welche 12 mm Deckgläschen enthielten, ausgesät. Die Zellzahl betrug 2×10^5 Zellen/well. Für Transfektionen mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen) wurden HaCaT, HEK 293 und HeLa Zellen in 6well-Platten mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/well kultiviert.

PBSE

137 mM NaCl
2,6 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
0,5 mM EDTA

2.3.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion von Plasmiden sowie von siRNAs in HEK 293 und HeLa Zellen erfolgte mittels Lipofectamine 2000 und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 20-24 h vor der Transfektion in der entsprechenden Zellzahl ausgesät und am Folgetag transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. In Abhängigkeit des experimentellen Ansatzes wurden die transfizierten Zellen entweder nach einer weiteren Inkubation von ca. 20 h bzw. 42 h analysiert oder nach ca. 8-10 h neu ausgesät. Die Transfektion von siRNAs in HaCaT Zellen erfolgte mittels Nukleofektion (Amaxa). 5×10^6 Zellen wurden mit 100 µl Amaxa-Lösung V resuspendiert, mit der siRNA

versetzt und in eine sterile Küvette überführt. Die Nukleofektion erfolgte mit dem Programm U-20. Danach wurden die Zellen in vorgewärmtes Kultivierungsmedium überführt und in 6well-Platten kultiviert. Die Analyse des *Knockdowns* erfolgte 48 h nach der Transfektion.

2.3.3 Zellsynchronisierung

2.3.3.1 Synchronisierung der Zellen mit doppeltem Thymidinblock

Thymidindesoxyribose oder kurz Thymidin (TdR) hemmt in höheren Konzentrationen die Ribonukleotid-Reduktase und führt somit zur Arretierung der Zellen in der Synthesephase (S-Phase). Die Zellen wurden zunächst für 24 h in Gegenwart von 3 mM Thymidin kultiviert und damit in der S-Phase synchronisiert. Anschließend wurden sie einmal mit Thymidin-freiem Medium gewaschen und darin für weitere 8 h kultiviert. Danach erfolgte der zweite Thymidin-Block durch wiederholte Zugabe von 3 mM Thymidin für 12 h. Die Zellen wurden gewaschen, mit Kulturmedium (ohne Thymidin) für weitere 10 h inkubiert und anschließend immunhistochemisch analysiert. Die meisten Zellen befinden sich in der M-Phase.

2.3.3.2 Synchronisierung der Zellen mittels Thymidin/Nocodazol-Block

Zur Synchronisierung der Zellen wurden diese zunächst mit 3 mM Thymidin für 24 h kultiviert. Nach einer vierstündigen Inkubation mit Thymidin-freiem Medium, wurden die Zellen mit 100 nM Nocodazol für weitere 12 h inkubiert. Aufgrund der fehlenden Ausbildung der mitotischen Spindel kommt es zu einem reversiblen Block in der Prometaphase der Mitose. Somit können Zellen am G2/M-Übergang angereichert werden. Nach dem Nocodazol-Block wurden die Zellen mit Kulturmedium für 45 min inkubiert und anschließend geerntet.

2.3.4 Induktion von Stress

Zur Erzeugung von oxidativem Stress, bei HaCaT oder HeLa Zellen, wurde das Kulturmedium mit einer Endkonzentration von 1 mM Natriumarsenat oder 3 mM Wasserstoffperoxid versetzt. Diese Lösung wurde anschließend auf die Zellen gegeben und für 1 h im Brutschrank inkubiert.

2.3.5 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzen wurden die Zellen in *6well*-Platten auf Deckgläschen kultiviert und ggf. transfiziert, synchronisiert und/oder Stress induziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte entweder mit 4% Formaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur oder mit Methanol für 15 min bei -20°C. Nach der Formaldehyd-Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, nach der Methanol-Fixierung wurden sie getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und dreimal mit PBS gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungen erfolgte eine Inkubation mit 1% (v/v) Magermilchpulver in PBS für mind. 30 min. Die Deckgläschen wurden nach dem Blocken mit 20 µl Primärantikörper-Lösung, welche mit 1% Magermilchpulver/PBS angesetzt wurde (Verdünnung siehe Tab. 2.1), für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit den entsprechenden Sekundärantikörpern, an welche Fluorophore gekoppelt waren und in 1% Milchpulver verdünnt wurden (siehe Tab. 2.1), für erneut 1 h dunkel inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (Molecular Probes) angefärbt, bevor die Zellen in 96%igem Ethanol entwässert und die Deckgläschen auf einem Objektträger unter Verwendung von Mowiol befestigt wurden. Die Aushärtung und Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4 °C. F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC oder Phalloidin-FITC (Molecular Probes) gefärbt.

Die Fluoreszenzbilder wurden an einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop mit Hilfe einer Vosskühler CCD-1300-QLN-Kamera aufgenommen. Standardmäßig wurde ein Apo TIRF Objektiv verwendet (60x/1,49 in Öl). Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mittels der Software NIS-Elements AR 2.30 MuTech MV1500, Lucia G/F Version 4.71 und Adobe Photoshop CS2 Version 9.0.

Mowiol

5% Mowiol (w/v)
30% Glycerol (v/v)
0,25% DABCO (w/v)

2.3.6 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

BiFC ist eine Methode, die es erlaubt die Lokalisation von Protein-Protein-Assoziationen in lebenden Zellen zu visualisieren. Die Methode basiert auf der

Komplementation zweier nichtfluoreszierender Fragmente des EYFP (*Enhanced yellow Fluorescent Protein*) zu dem funktionsfähigen Fluorophor, wenn die Fragmente in räumliche Nähe gebracht werden. Zur Durchführung von BiFC-Experimenten wurden HeLa Zellen mit den entsprechenden pYFP1-Flag- und pYFP2-HA-Fusionsplasmiden transfiziert und die Fluoreszenzintensitäten nach 24 h mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert.

2.3.7 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen der Zellen erfolgten mit dem FACScan (BD Bioscience). Für jede Messung wurden mit Hilfe der Auswertesoftware CellQuest™ (BD Bioscience) Vorwärtsstreuung (*forward scatter*) und Seitwärtsstreuung (*sideward scatter*) in einem Punktediagramm dargestellt und die Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen bei einer Emissionswellenlänge von 488 nm bestimmt. Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitäten prozentual ermittelt.

2.3.8 Zellproliferationstest über BrdU-Einbau

BrdU (5'-Brom-2'-Desoxyuridin) ist ein Pyrimidin-Analogon, welches anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der DNA-Synthese in proliferierenden Zellen eingebaut wird. Das inkorporierte BrdU wurde mit einem Peroxidase-konjugierten BrdU-Antikörper detektiert und dieses über eine kolorimetrische Reaktion am *ELISA-Reader* bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm quantifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *Cell Proliferation ELISA Kit, BrdU colorimetrisch* (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. HaCaT Zellen wurden mit spezifischen siRNAs gegen Plakophilin1, eIF4A1 bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert und jeweils 10^4 Zellen als Triplikat in *96well*-Platten eingesät. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurde die BrdU-Einbaurate gemessen. Als Negativ-Kontrollen wurden systembedingte Hintergrundwerte (Zellen ohne BrdU-Zugabe bzw. nur Medium mit BrdU-Zugabe) von den Werten der BrdU-markierten Zellen abgezogen. Um leichte Unterschiede der Zellzahlen beim Aussähen auszuschließen, wurde die Proliferationsrate für alle Zellen nach 24 h auf eine gleiche Absorption gesetzt und diente somit der Normalisierung.

2.3.9 Zellviabilitätstest mittels Kristallviolett-Färbung

Der Kristallviolett-Test ist ein spektralphotometrisches Verfahren, das auf der Anfärbbarkeit von Zellen mit dem Farbstoff Kristallviolett (Gentianaviolett) beruht. Die Plakophilin1-, eIF4A1- und Kontroll-siRNA transfizierten HaCaT Zellen wurden in 24well-Platten mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen/well als Triplikat ausgesät. Die Anzahl der Zellen wurde nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 4% Formaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,05% Kristallviolett in PBS für 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Als Leerwert wurde ein well ohne Zellen ebenfalls mit Kristallviolett-Lösung versetzt. Danach wurden die Zellen mehrmals mit Wasser gewaschen und für eine Stunde an der Luft getrocknet. Der aufgenommene Farbstoff wurde mit 1% SDS in PBS aus den Zellen gelöst und die Absorption bei 550 nm vermessen. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde prozentual anhand dieser Werte berechnet. Die 24 h Werte dienten der Normalisierung der Zellzahl und wurden auf 100% gesetzt.

2.3.10 Caspaseaktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Aktivitäten von Caspase 3 und Caspase 7 wurde der *Caspase-Glo*[®] 3/7-Assay (Promega) verwendet. Dieser Assay beinhaltet ein luminogenes Substrat dieser beiden Caspasen. Nach einer Lyse der Zellen spalten Caspase 3 und 7 dieses Substrat und das entstehende Signal kann im Luminometer gemessen werden. Die Biolumineszenz verhält sich hierbei proportional zur Aktivität der Caspasen. HaCaT Zellen wurden mit spezifischen siRNAs gegen Plakophilin1, eIF4A1 bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert und jeweils $3,5 \times 10^3$ Zellen als Triplikat in 96well-Platten eingesät. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurde die Caspase-3/7 Aktivität nach Herstellerangaben im GloMax[™] 96 Luminometer (Promega) vermessen. Die Caspase-3/7 Aktivität wurde prozentual anhand dieser Werte berechnet. Die 24 h Werte wurden auf 100% gesetzt und dienten der Normalisierung.

2.4 Mikrobiologische Methoden

Allgemeine mikrobiologische Methoden, wie die Sterilisierung von Lösungen und Gegenständen, die Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae* in Medien bzw. auf selektiven Agarplatten, die Herstellung chemokompetenter *E. coli*- bzw. kompetenter Hefezellen sowie

deren Transformation wurden anhand von Standardprotokollen bzw. entsprechend dem *Yeast Protocols Handbook* von Clontech durchgeführt.

2.4.1 Expression von Plakophilin1, eIF4A1 und GST

pRSET-Plakophilin1 wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, pRSET-eIF4A1, pGEX-eIF4A1 und pGEX wurden in *E. coli* BL21 (DE3) durch Hitzeschock transformiert. Positive Klone wurden durch Ausstreichen auf ampicillinhaltigen Agarplatten selektiert. Aus Einzelkolonien wurden neun 1 l Erlenmeyerkolben mit jeweils 800 ml YT-Medium (für Plakophilin1) und neun 1 l Erlenmeyerkolben mit jeweils 200 ml YT-Medium (für eIF4A1 und GST), dem 150 µg/ml Ampicillin zugegeben wurde, angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Induktion der Expression für Plakophilin1 erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,6 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Die Expression erfolgte für 4 h bei 20°C. Die Expression von eIF4A1 und GST wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,4 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für 4 h bei 30°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation von 10 min bei 4000 x g geerntet und die Zellpellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) verwendet. Zunächst wurden die Zellen in RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor-Mix (Roche) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde anschließend zur Abtrennung der Zelltrümmer und unlöslicher Bestandteile für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* der Firma Pierce bestimmt. Es wurden jeweils 10 µg Protein, welches mit SDS-PAGE-Puffer versetzt wurde und für 5 min bei 95°C denaturiert wurde, auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Brilliant-Blue R250 angefärbt oder mittels einer *Semi-dry*-Blotapparatur (VWR) unter Verwendung eines Drei-Puffer-Systems auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer wurde durch Ponceau S-Färbung überprüft. Nach dem Entfärben der Membran durch mehrmaliges Waschen mit TBST wurden unspezifische Bindungen durch 1 h Blocken mit 4% (w/v) Magermilchpulver/TBST abgesättigt. Primärantikörper wurden in 4% Magermilchpulver/

TBST verdünnt (Verdünnung siehe Tab. 2.1) und für 1 h bei Raumtemperatur mit der Membran unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit TBST gewaschen und mit HRP-(*horse raddish peroxidase*) gekoppelten Sekundärantikörper, welcher in 4% Magermilchpulver/TBST verdünnt wurde (Verdünnung siehe Tab. 2.1), für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion unter Verwendung des *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) entsprechend den Herstellerangaben. Die entstandene Chemilumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm detektiert.

RIPA-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4
200 mM NaCl
1 mM EGTA
1 mM EDTA
0,25% Desoxycholsäure
1% (v/v) Triton

4x PAGE-Puffer

250 mM Tris-HCl, pH 6.8
8% SDS (v/v)
30% Glycerin (v/v)
10% (v/v) β -Mercaptoethanol
0,2% (v/v) Bromphenolblau

10x Ponceaus S

2% (w/v) Ponceau S
30% (v/v) Sulfosalizylsäure
30% (v/v) Trichloressig-
säure

Färbelösung

0,075% Coomassie Brilliant
Blue G250 (w/v) in Methanol

Entfärbelösung

40% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8.8
132 mM Glycin
0,1% (v/v) SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8.8
0,4% SDS

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6.8
0,4% SDS

10x TBST

100 mM Tris-HCl, pH 7.6
1 mM NaCl
1% (v/v) Tween20

SDS-Sammelgel

2,6 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8
200 μ l 10% SDS
400 μ l 10% APS
20 μ l TEMED
11,8 ml H₂O

10% SDS-Trenngel

10 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
7,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8.8
300 μ l 10% SDS
200 μ l 10% APS
20 μ l TEMED
12 ml H₂O

Transferpuffer 1

300 mM Tris-HCl, pH 10.4
20% (v/v) MeOH

Transferpuffer 2

25 mM Tris-HCl, pH 10.4
20% (v/v) MeOH

Transferpuffer 3

25 mM Tris-HCl, pH 9.4
40 mM γ -Aminocaprinsäure
20% (v/v) MeOH

2.5.2 Metabolische Markierung von Zellen mit L-(³⁵S)-Methionin

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Proteinsyntheserate kultivierter Zellen wurden Proteine durch Einbau von radioaktivem L-(³⁵S)-Methionin markiert. HaCaT bzw. HeLa Zellen wurden mit spezifischen siRNAs gegen Plakophilin1, Plakophilin2, Plakophilin3, eIF4A1 bzw. Kontroll-siRNAs, wie unter 2.4.2 beschrieben, transfiziert. Für Überexpressionsstudien wurden HEK 293 bzw. HeLa Zellen mit Plakophilin1-, eIF4A1- und Kontroll-Konstrukten transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen einer 2 cm Schale zweimal mit Methionin-freiem Medium (Invitrogen) gewaschen und mit 1 ml Medium ohne Methionin für 15 min im Brutschrank inkubiert. Zur Inhibierung der Polymerase II-vermittelten Transkription wurden 5 µM Aktinomycin D zum Methionin-freien Medium zugegeben und ebenfalls für 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Vorinkubation wurde dem Medium 50 µCi L-(³⁵S)-Methionin zugesetzt und die Zellen für 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, Proteinextrakte hergestellt und die Proteinkonzentration mit dem *BCA Protein Assay Kit* der Firma Pierce bestimmt. Jeweils 10 µg Proteinextrakt wurden elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blue R250 angefärbt. Die Gele wurden für 30 min fixiert und anschließend für weitere 30 min in AmplifyTM (Amersham) inkubiert. Anschließend wurden sie auf Whatman-Papier überführt, mit Haushaltsfolie bedeckt und auf einem Gelrockner unter Vakuum bei ca. 80°C für mind. 1 h getrocknet. Die getrockneten Gele wurden bei -80°C für 4 h auf Röntgenfilmen exponiert.

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.5
1% SDS

Fixierer-Lösung

50% Methanol
10% Essigsäure
40% Wasser

2.5.3 Proteinreinigung

2.5.3.1 Reinigung von Plakophilin1

Der Zellaufschluss sowie alle anschließenden Reinigungsschritte erfolgten bei 4°C oder auf Eis. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels Absorption bei 280 nm, 260 nm sowie 215 nm verfolgt. Das *E. coli*-Zellpellet (ca. 14 g) wurde in 80 ml Aufschlusspuffer, welcher eine Tablette Protease-Inhibitor-Mix enthielt, mit Hilfe des Ultra-Turrax resuspendiert. Der

Zellaufschluss erfolgte durch Hochdruckdispersion mittels Gaulin MicronLab 40 bei einem Druck von 1000 bar. Das Lysat wurde anschließend zur Abtrennung von unlöslichen Zellbestandteilen 30 min bei 35000 x g zentrifugiert. Die Ni-NTA-Sepharose Säule (10 ml) wurde in Puffer A + 5% Puffer B äquilibriert und anschließend mit dem Zellextrakt bei einer Flussrate von 2,5 ml/min beladen. Nachfolgend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Puffer A + 10% Puffer B gewaschen. Die Elution von Plakophilin1 erfolgte in einem Stufengradienten von 50-150 mM und 150-500 mM Imidazol über 10 Säulenvolumen. Es wurden 5 ml Fraktionen gesammelt. Da Plakophilin1 zur Aggregation neigte und verschiedene Reagenzien z.B. NaCl oder Detergenzien die Löslichkeit nicht verbesserten, wurden die Elutionsfraktionen mit 250 mM Arginin versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Alle Plakophilin1 Fraktionen wurden vereinigt und unter Verwendung von Amicons (Millipore) entsprechend der Herstellerangaben aufkonzentriert. Im Anschluss wurde das Konzentrat für 30 min bei 35000 x g zentrifugiert und verbliebene Verunreinigungen mittels Gelfiltration in Puffer C an einer HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule bei einer Flussrate von 0,2 ml/min abgetrennt. Das gereinigte Plakophilin1 wurde mittels SDS-PAGE analysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Aufschlusspuffer	Puffer A	Puffer B	Puffer C
Puffer A	25 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0	Puffer A	50 mM Tris, pH 8.0
5% Puffer B	500 mM NaCl	500 mM Imidazol	100 mM NaCl
	2 mM DTT		250 mM Arginin
	1 mM EDTA		2 mM DTT
			1 mM EDTA

2.5.3.2 Reinigung von eIF4A1

Die Reinigung von eIF4A1 erfolgte wie beschrieben (Lindqvist *et al.*, 2008b). eIF4A1 wurde an eine Ni-NTA-Sepharose Säule gebunden, mit Hilfe eines Salzgradienten von Nukleinsäuren getrennt und anschließend mittels Imidazolgradienten eluiert. Das eluierte Protein wurde gegen Niedrigsalzpuffer dialysiert und abschließend über einen Anionenaustauscher endgereinigt.

2.5.3.3 Reinigung von transient exprimierten Flag-Fusionsproteinen

Die Zellyse sowie die Reinigung von Flag-p0071 wt, Flag-Ect2b wt und Flag-Ect2 (414-883) erfolgten bei 4°C oder auf Eis. Synchronisierte Zellen einer 10 cm Schale wurden 48 h nach Transfektion der entsprechenden Expressionsplasmide zweimal in 10 ml PBS gewaschen, in 1 ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor-Mix resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde anschließend zur Abtrennung der Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 30 µl in RIPA-Puffer äquilibrierter Flag-Agarose vereinigt und für 1 h unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Affinitäts-Gel durch Zentrifugieren (2 min, 6000 rpm, 4°C) vom Überstand abgetrennt und noch fünfmal mit jeweils 1 ml RIPA-Puffer gewaschen. Da die kompetitive Elution des Flag-Fusionsproteins in gegenwart von 200 µg/ml Flag-Peptid nicht den gewünschten Erfolg zeigte, wurde die immobilisierte Flag-Agarose für weitere Untersuchungen verwendet. 5% der gekoppelten Flag-Agarose wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretische aufgetrennt und mit dem entsprechenden Antikörper mittels Western Blot analysiert.

2.5.4 GST pull-down

Der GST pull-down dient zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*. Dabei wird ein Protein X über einen GST-(Glutathion-S-Transferase) Tag in einer Enzym-Substrat-Reaktion an Glutathion-Sepharose (Amersham) gekoppelt und anschließend mit einem Protein Y aus *E. coli*-Zellextrakten inkubiert. Kommt es zu einer Interaktion, so kann Protein Y auf diese Weise isoliert und mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden. Die Bakterienpellets einer 200 ml-Kultur von GST-eIF4A1 und GST wurden in 10 ml Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung. Die Zellsuspension wurde dafür dreimal für 30 s mit jeweils 1 min Pause beschallt (Einstellung: 50% *duty cycle*, Stufe 7). Dem Lysat wurde anschließend Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% (v/v) zugegeben und es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen wurde das Lysat für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Extrakt wurde mit 100 µl in Lysepuffer äquilibrierter Glutathion-Sepharose für 1 h bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Lysepuffer erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der

Protein-Glutathion-Sepharose. Die Protein-Glutathion-Sepharose wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml mit Glutathion-Sepharose verdünnt. Anschließend wurden 30 μ l GST-, eIF4A1-GST-Sepharose und Glutathion-Sepharose mit 3 μ g rekombinant aufgereinigtem Plakophilin1 mit und ohne 10 μ g/ μ l RNase A (Roche) für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde mehrmals mit Lysepuffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit SDS-PAGE-Puffer eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot.

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.5
150 mM NaCl
1 mM EDTA

2.5.5 Hefe-Dihybrid System

Die Hefe-Dihybrid Methode basiert auf der Eigenschaft des *GAL4*-Hefeproteins, welches aus separaten Domänen für die DNA-Bindung sowie der Transkriptionsaktivität besteht. Für die Identifizierung einer Protein-Protein-Interaktion wurden Fusionsplasmide mit jeweils einer der beiden Domänen konstruiert, in den Hefestamm YRG2 transformiert und auf Histidin-Auxotrophie selektioniert. Alle Konstrukte mit der DNA-Bindedomäne (pGBKT7) wurden auf Autoaktivierung getestet. Die Transformation und Selektion der Hefen wurden nach dem *Yeast Protocols Handbook* von Clontech durchgeführt.

2.5.6 Messung des Guaninnukleotid-Austauschs von RhoA

Die Bestimmung der Guaninnukleotid-Austauschaktivität von gereinigtem Flag-p0071 wt, Flag-Ect2b wt und Flag-Ect2b (414-883) wurde unter Verwendung des *RhoGEF Exchange Assay Biochem Kit* (Cytoskeleton) durchgeführt. Dieser Test beruht auf dem spektroskopischen Unterschied zwischen gebundenen und nicht gebundenen fluoreszierenden mant-(N-Methylantraniloyl) GTP an RhoA. Im gebundenen Zustand weist mant-GTP eine höhere Fluoreszenzintensität auf.

Die Messung des Guaninnukleotid-Austauschs von RhoA wurde unter folgenden Standardbedingungen in einer 96well-Mikrotiterplatte durchgeführt:

50 μ l 2xExchange Reaktion buffer (enthält mant-GTP)
4 μ l RhoA (50 μ M)
6 μ l Wasser

Nach 5 Messungen (Messung alle 30 s) bei einer Anregung des Fluorophors bei 360 nm und einer Emission bei 460 nm wurden 30 μ l immobilisierte Flag-Agarose zugesetzt und die Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 1800 s verfolgt. Als negative Kontrolle wurden 30 μ l äquilibrierte Flag-Agarose vermessen.

2.5.7 ATPase Aktivitätstest

Die Messung der ATPase Aktivität wurde nach der Methode von (Chan *et al.*, 1986) durchgeführt. Das anorganische Phosphat, welches bei der ATP Hydrolyse freigesetzt wird, wurde unter Verwendung des *SensoLyteTM MG Phosphate Assay Kit colorimetric* (MoBiTec) bei einer Wellenlänge von 620 nm vermessen. Jede ATPase Aktivitätsmessung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei kamen folgende Standardbedingungen zur Anwendung:

40 μ l 2xATPase-Puffer
0-2 μ l eIF4A1 (1,5 μ g/ μ l)
0-20 μ lPlakophilin1 (0,2 μ g/ μ l)
1 μ l poly(A) (1 μ g/ μ l)
x μ l BSA (2 μ g/ μ l)
x μ l Arginin (250 mM)
auf ein Endvolumen von 80 μ l mit RNase/DNase-freies Wasser aufgefüllt

2xATPase-Puffer

30 mM HEPES, pH 7.5
160 mM KCl
5 mM MgAcetat
2 mM DTT

Die Arginin und Gesamtproteinkonzentration war in allen Ansätzen gleich. Die ATPase Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ M ATP gestartet und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die ATP Hydrolyse wurde durch Zugabe von EDTA (30 mM Endkonzentration) gestoppt. Anschließend wurden 20 μ l Malachit-Grün/Molybdat Farbstofflösung (MoBiTec) zugesetzt und nach 5 min die Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm vermessen. Alle Messwerte wurden in Bezug auf die spontane Hydrolyse von ATP korrigiert. Die freigesetzte Phosphatkonzentration wurde anhand einer Phosphateichgerade bestimmt.

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit dieser Messmethode wurden zusätzlich radioaktive ATPase Messungen mit 5 μ Ci (γ^{32} P)-ATP durchgeführt. Die Durchführung des Experiments bis zum Abstoppen der ATP Hydrolyse verlief nach dem oben beschriebenen

Protokoll. 4 μl des gestoppten Ansatzes wurden auf eine TLC-Cellulose Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Chromatographie wurde in 0,75 M KH_2PO_4 durchgeführt. Nach Trocknung der Platte wurde diese in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf *PhosphoImager-Screens* exponiert.

2.5.8 Reporter-gen-Analysen

2.5.8.1 Translationsanalysen *in vivo*

Zur Bestimmung der Translationsaktivität *in vivo* wurde das Luziferase-Reportergensystem benutzt. HEK 293 Zellen wurden in 6well-Platten mit 2 μg des entsprechenden GFP-Fusionsplasmids, 250 ng pcDNA3-FL und 250 ng pRL-CMV kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen zu gleichen Teilen partagiert und nach weiteren 24 h die Luziferase-Aktivität der *firefly* und *renilla* Luziferase und die mRNA-Mengen der Reporter mittels qRT-PCR (siehe 2.2.5) bestimmt. Die Messungen der Aktivitäten der *firefly* und *renilla* Luziferasen erfolgten mit dem *Dual-GloTM Luciferase Assay System* (Promega) nach Angaben des Herstellers. Die Isolierung der Gesamt-RNA mittels TRIZOL und anschließendem DNase-Verdau erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Die reverse Transkription wurde wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Luziferase-Aktivität wurde auf die Luziferase mRNA normalisiert.

2.5.8.2 Translationsanalysen *in vitro*

Für die Untersuchung der *cap*-abhängigen Translation *in vitro* wurde die $\text{m}^7\text{G-cap-CAT-poly(A)}$ mRNA durch *in vitro*-Transkription mit dem MEGAscript T7 Kit der Firma Ambion nach Herstellerangaben synthetisiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transkription wurde die mRNA mittels Agarosegel analysiert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *NucleoSpin RNA clean-up Kit* von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben. Die RNA wurde bis zur *in vitro* Translation bei -80°C gelagert.

Die Translation der *in vitro* transkribierten $\text{m}^7\text{G-cap-CAT-poly(A)}$ mRNA erfolgte in einem mit Mikrokokken-Nuklease behandelten Kaninchen-Retikulozytenlysat der Firma Promega. Pro Reaktionsansatz (12 μl) kamen folgende Standardbedingungen zur Anwendung:

Master-Mix1: 8,75 μl Kaninchen-Retikulozytenlysat
1 μl Aminosäuren ohne Methionin (1mM)
0,5 μl (^{35}S)-Methionin (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

Master-Mix 2:9 μ l Master-Mix1
x μ l Plakophilin1 (0,2 μ g/ μ l)

Inkubation des Reaktionsansatzes für 5 min bei 30°C. Zugabe von 10 ng m⁷G-cap-CAT-poly(A) mRNA und weitere Inkubation für 1 h bei 30°C. Anschließend erfolgte die Inaktivierung durch Zugabe von 12 μ l RNase Stop für 15 min bei 30°C. Die Proben wurden mit 4x PAGE-Puffer versetzt, aufgeköcht und 10 μ l Proben in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der *in vitro* translatierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie bei –80°C.

Das Plasmid pGEM-CAT wurde von A. Ostareck-Lederer zur Verfügung gestellt. Es enthält die CAT-Sequenz und einen Plasmidkodierenden poly(A)-Schwanz. Das Plasmid wurde zur Transkription mit dem Restriktionsenzym Hind III geschnitten. Das Transkript hatte eine Länge von ca. 700 Nukleotiden.

2.5.9 Statistische Auswertungen

Soweit nicht besonders erwähnt wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungen anhand mind. drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken in den einzelnen Diagrammen dargestellt. Der zweiseitige heteroskedastische Student's t-Test wurde zur Bestimmung der statistischen Signifikanz zwischen zwei Populationen genutzt (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.0005$).

3 Ergebnisse

3.1 Funktion des Plakophilin1 im Zytoplasma

In vorangegangenen Arbeiten waren mittels eines Hefe-Dihybrid *screens* neue putative Interaktionspartner, u.a. der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor (eIF) 4A1, eIF3S8, eIF3S5, eIF3S6 IP (*interacting protein*) und die p70 S6 Kinase für Plakophilin1 identifiziert worden. Alle haben Funktionen in der Translationskontrolle. Dieser Befund war zunächst sehr überraschend, da bisherige Hinweise bezüglich der zytoplasmatischen Funktion von Plakophilin1 nur eine Rolle im Rho-Signalweg vermuten lassen (siehe 1.3.3.2). Um weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion von Plakophilin1 bei der Translationskontrolle zu erhalten, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisierung von Plakophilin1 nach Stressinduktion untersucht.

3.1.1 Lokalisierung der Plakophiline unter zellulärem Stress

Unter zellulärem Stress kommt es zu einer Reorganisation der Translationsmaschinerie. Dabei werden ein Großteil der mRNAs, die von Polysomen freigesetzt werden, zusammen mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (RBPs) in zytoplasmatische granuläre Strukturen so genannte *stress granules* sortiert (Anderson and Kedersha, 2002a, b; Kedersha and Anderson, 2002). Um den Einfluss von verschiedenen Stress-Stimuli auf die subzelluläre Verteilung von Plakophilin1 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzstudien angefertigt. HaCaT Zellen wurden dazu auf Deckgläschen ausgesät und nach 24 h mit Arsenat behandelt. Anschließend wurden die unbehandelten als auch die behandelten Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen Plakophilin1 und TIAR, ein *stress granule* Markerprotein (Kedersha *et al.*, 1999), gefärbt. In ungestressten Zellen zeigte Plakophilin1 eine desmosomale und eine diffuse zytoplasmatische Verteilung. TIAR lokalisierte vorwiegend im Zellkern und im Zytoplasma (Abb. 3.1 A). Nach oxidativem Stress kolokalisierte endogenes Plakophilin1 mit TIAR (Abb. 3.1 B) in *stress granules*. Da *stress granules* nicht nur durch verschiedene Stress-Stimuli induziert werden können, sondern auch durch Überexpression von G3BP (RasGAP-assoziierte Endoribonuklease (Tourriere *et al.*, 2003)), wurde dieses als GFP-Fusionsprotein in HaCaT Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden

die Zellen mit einem Antikörper gegen Plakophilin1 gefärbt. Abb. 3.1 C zeigt, dass endogenes Plakophilin1 auch in G3BP-induzierte *stress granules* rekrutiert wurde. Anhand der Kolokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass endogenes Plakophilin1 sowohl nach oxidativem Stress als auch nach Überexpression von G3BP in *stress granules* lokalisiert.

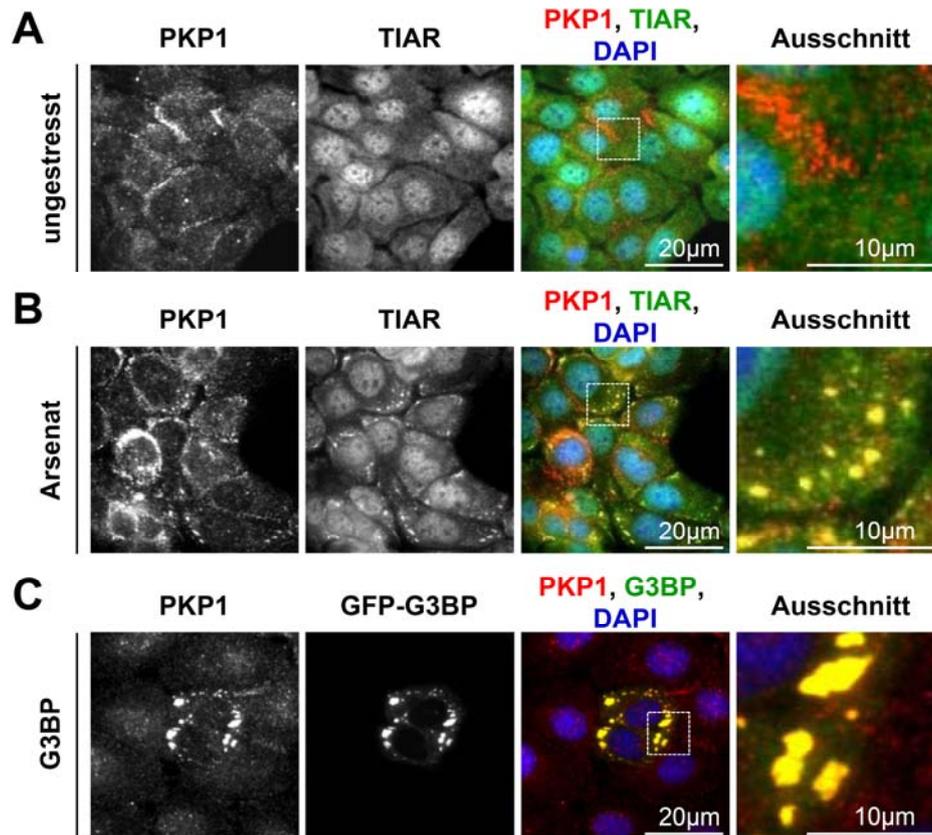
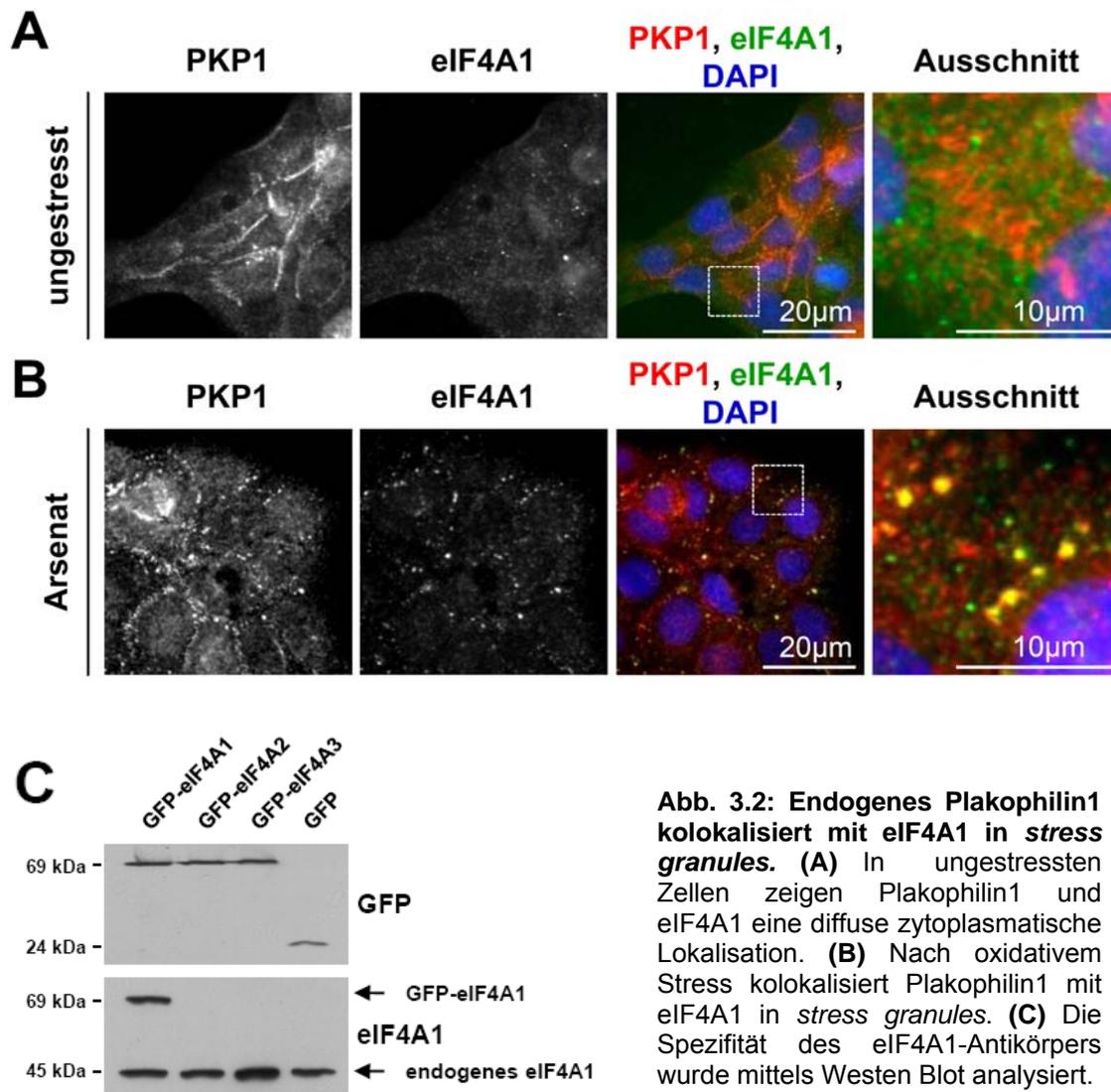


Abb. 3.1: Endogenes Plakophilin1 lokalisiert in *stress granules* unter verschiedenen Stress-Stimuli. (A) In ungestressten Zellen lokalisiert endogenes Plakophilin1 an Desmosomen und im Zytoplasma. TIAR zeigt eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation. **(B)** Nach oxidativem Stress kolokalisiert endogenes Plakophilin1 mit TIAR in *stress granules*. **(C)** Endogenes Plakophilin1 kolokalisiert mit GFP-G3BP in G3BP-induzierten *stress granules*.

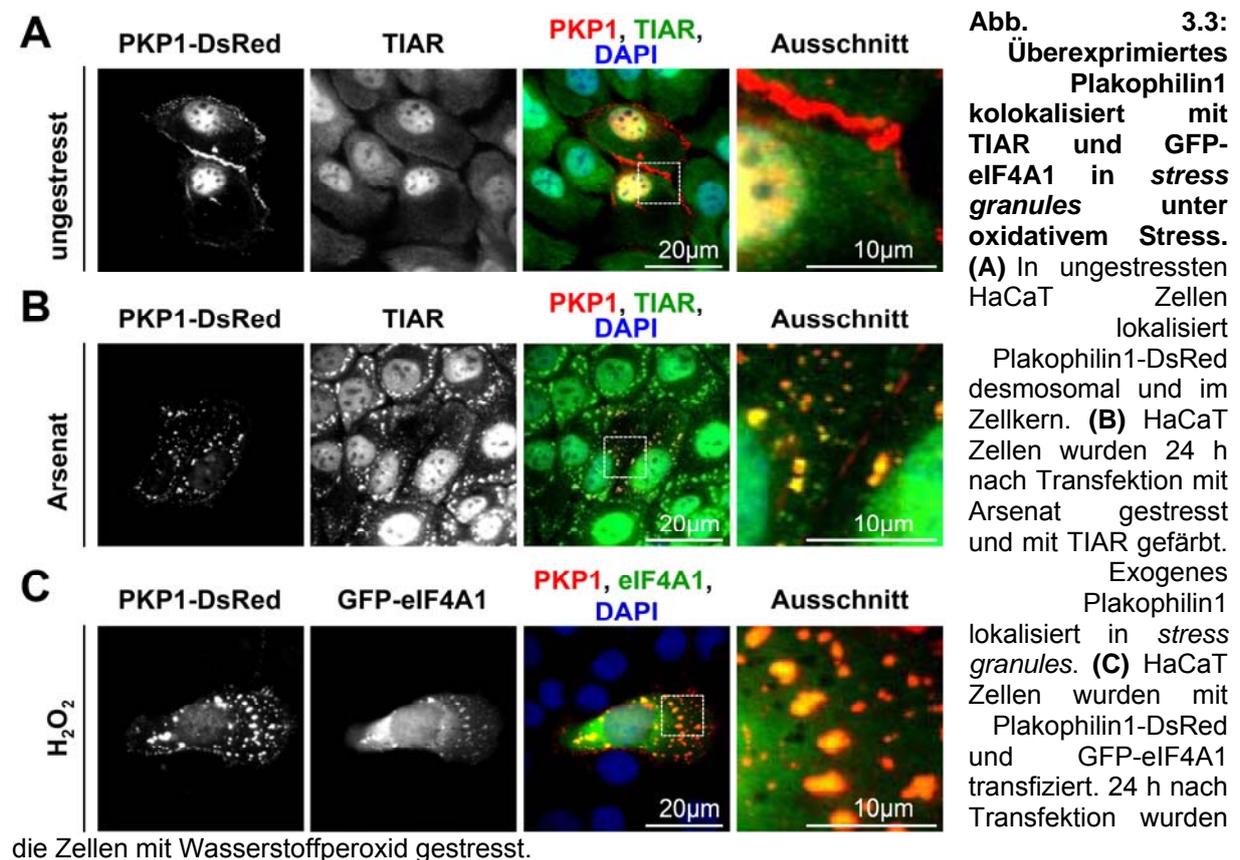
Da Plakophilin1 eine *stress granule* Komponente darstellt, wurde die subzelluläre Verteilung von Plakophilin1 und seinen putativen Interaktionspartnern unter oxidativem Stress untersucht. Dazu wurden HaCaT Zellen mit Arsenat gestresst und mit Antikörpern gegen Plakophilin1 und eIF4A1 gefärbt. Die Lokalisation der eIF3-Untereinheiten wurde mittels Überexpression entsprechender GFP-Fusionsproteine in HaCaT Zellen untersucht, da keine Antikörper erhältlich sind. 24 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress induziert und die Zellen anschließend mit Plakophilin1-Antikörper gefärbt. In ungestressten Zellen lokalisierte Plakophilin1 an Desmosomen und im Zytoplasma. eIF4A1 zeigte eine diffuse

zytoplasmatische Verteilung (Abb. 3.2 A). Unter oxidativem Stress kolokalisierten endogenes Plakophilin1 mit eIF4A1 (Abb. 3.2 B) in *stress granules*. Diese Daten implizieren, dass vermutlich alle Komponenten des 48S Initiationskomplexes nach Stressinduktion in *stress granules* rekrutiert werden.



Um zu überprüfen, ob der eIF4A1 Antikörper spezifisch eIF4A1 und nicht die anderen zwei Isoformen (eIF4A2 und eIF4A3) erkennt, wurden alle drei Isoformen als GFP-Fusionsproteine in HEK 293 Zellen überexprimiert und mittels Western Blot gegen eIF4A1 und GFP analysiert. Abb. 3.2 C zeigt, dass der Antikörper spezifisch die erste Isoform erkennt (Abb. 3.2 C).

Zur Bestätigung der spezifischen Lokalisation von endogenem Plakophilin1 in *stress granules*, wurde zusätzlich die subzelluläre Verteilung von überexprimiertem Plakophilin1 in HaCaT Zellen nach oxidativem Stress untersucht. Dazu wurden HaCaT Zellen mit Plakophilin1-DsRed bzw. in Kombination mit GFP-eIF4A1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress durch Zugabe von Arsenat bzw. Wasserstoffperoxid induziert. Die Plakophilin1-DsRed transfizierten Zellen wurden anschließend mit TIAR-Antikörper gefärbt. In unbehandelten Zellen lokalisierte exogenes Plakophilin1 desmosomal und im Zellkern (Abb. 3.3 A). Nach Stress-Induktion kolokalisierten Plakophilin1-DsRed sowohl mit TIAR (Abb. 3.3 B) als auch mit GFP-eIF4A1 (Abb. 3.3 C) in *stress granules*. Die Daten belegen, dass sowohl endogenes als überexprimiertes Plakophilin1 nach oxidativem Stress in *stress granules* rekrutiert wurden.



Um zu untersuchen, ob die *stress granule* Lokalisation unter zellulärem Stress eine spezifische Eigenschaft für Plakophilin1 ist bzw. auch Plakophilin2 und 3 in diese Strukturen rekrutiert werden, wurde deren endogene Lokalisation unter oxidativem Stress in HaCaT Zellen untersucht. Die *stress granule* Bildung wurde durch eine Antikörperfärbung gegen

TIAR überprüft. Abb. 3.4 zeigt, dass Plakophilin2 nach Arsenat-Behandlung nicht in TIAR positive *stress granules* rekrutiert wurde. Endogenes Plakophilin3 kolokalisierte mit TIAR in *stress granules*. Diese Ergebnisse wurden von Hofmann und Kollegen bestätigt, die eine Lokalisation von Plakophilin1 und 3 nach verschiedenen Stress-Stimuli in *stress granules* beschrieben (Hofmann *et al.*, 2006).

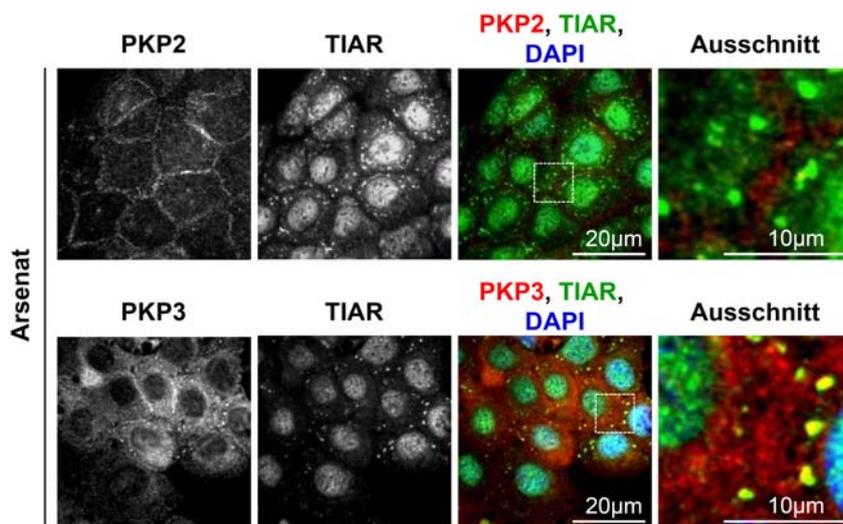


Abb. 3.4: Plakophilin3 kolokalisiert mit TIAR in *stress granules* unter Stress. HaCaT Zellen wurden mit Arsenat behandelt und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Plakophilin2, Plakophilin3 und TIAR gefärbt. Endogenes Plakophilin3 kolokalisiert mit TIAR in *stress granules*, jedoch nicht Plakophilin2.

3.1.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen Plakophilin1 und eIF4A1

eIF4A1 ist, im Vergleich zu den eIF3-Untereinheiten, ein funktionell sehr gut charakterisiertes Protein. Daher beschränken sich die nachfolgenden Untersuchungen auf eIF4A1. Um auszuschließen, dass eIF4A1 ein „falsch positiver“ Klon ist, sollte die Interaktion zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 näher untersucht werden. Zur Verifizierung der Interaktion wurden Hefe-Dihybrid Analysen, GST pull-down Experimente und Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementationsanalysen (BiFC) verwendet.

3.1.2.1 Nachweis der Interaktion im Hefe-Dihybrid System

Um die Interaktion zwischen Plakophilin1 und dem möglichen Interaktionspartner eIF4A1 zu verifizieren wurden Hefe-Dihybrid Experimente durchgeführt. Gleichzeitig wurde untersucht ob die Interaktion spezifisch für Plakophilin1 ist oder ob auch die verwandten Proteine, Plakophilin2 und 3, mit eIF4A1 interagieren können. Um die Interaktion der Plakophiline genauer einzugrenzen wurden pGBKT7-Fusionsplasmide generiert, welche für

die „Kopf“- und *Armadillo-repeat* Domäne des jeweiligen Plakophilins kodieren (Abb. 3.5 A). Alle Köderkonstrukte, in diesem Fall die Plakophilin-Fragmente, wurden auf Autoaktivierung im YRG2 Hefestamm überprüft. In Abb. 3.5 B ist zu sehen, dass keines der untersuchten Fragmente eine transaktivierende Funktion zeigte. Für eIF4A1 wurde ein Fusionsprotein mit dem gesamten kodierenden Bereich von eIF4A1 und der GAL4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne generiert. Die verschiedenen Plakophilin-Fragmente wurden mit eIF4A1 in den Hefestamm YRG2 kotransformiert und auf Selektionsplatten ohne Tryptophan und Leucin (-WL) ausplattiert. Eine Selektion auf Proteininteraktion erfolgte auf Reporterplatten (-WLH). Abb. 3.5 C zeigt, dass Plakophilin1 mit eIF4A1 im Hefe-Dihybrid System interagiert. Diese Interaktion war spezifisch für die Plakophilin1 „Kopf“-Domäne und konnte nicht für die N- und C-terminalen Fragmente von Plakophilin2 und 3 detektiert werden.

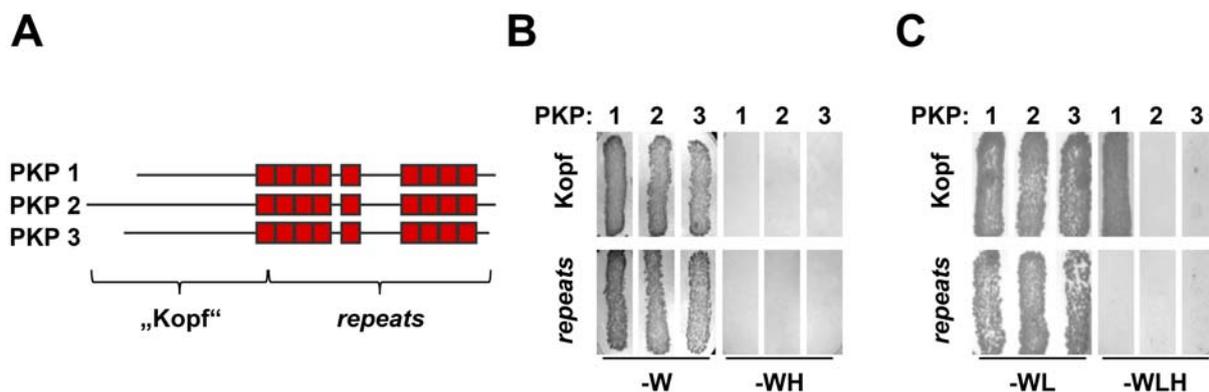


Abb. 3.5: Hefe-Dihybrid Analysen der Plakophiline mit eIF4A1. (A) Schematische Darstellung der Plakophilin-Konstrukte. (B) YRG2 Hefezellen wurden mit den entsprechenden Plakophilin-Fragmenten in pGBKT7 transformiert. Anschließend erfolgte die Selektion auf Platten ohne Tryptophan (-W) als auch auf Platten ohne Tryptophan und Histidin (-WH). Keines der untersuchten Fragmente zeigte eine autonome Aktivierung des *His 3* Reportergens. (C) YRG2 Hefezellen wurden mit den Plakophilin-Fragmenten in pGBKT7 und eIF4A1 in pGADT7 kotransformiert. Alle Zellen wurden auf Selektionsplatten ohne Tryptophan und Leucin (-WL) ausplattiert. Die Interaktionen wurden durch Selektion auf Histidin-Auxotrophie (-WLH) nachgewiesen.

3.1.2.2 Nachweis der Interaktion mittels GST pull-down

Um die Interaktion zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 in einem unabhängigen System zu bestätigen, wurden GST pull-down Experimente durchgeführt. Dazu wurde eIF4A1 als GST-(Glutathion-S-Transferase) Fusionsprotein und als Kontrolle GST im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Anschließend wurde die GST- und eIF4A1-GST-Sepharose mit rekombinant aufgereinigtem Plakophilin1 für 2 h

inkubiert. Um unspezifische Bindungen von Plakophilin1 an die Glutathion-Sepharose auszuschließen, wurde Glutathion-Sepharose mit Plakophilin1 inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels Western Blot analysiert. Wie aus Abb. 3.6 A ersichtlich ist, präzipitiert Plakophilin1 mit eIF4A1. Da in den Kontrollen kein Plakophilin1 weder mit GST, noch mit der Glutathion-Sepharose detektiert wurde, kann eine unspezifische Bindung von Plakophilin1 an GST und die Glutathion-Sepharose ausgeschlossen werden.

Um auszuschließen, dass die Proteine indirekt über Bindung an eine gemeinsame RNA interagieren, wurde zusätzlich ein RNase Verdau durchgeführt. In Gegenwart von RNase A wurde eine vergleichbare Menge an Plakophilin1 präzipitiert (Abb. 3.6 B). Diese Daten zeigen, dass eIF4A1 direkt mit Plakophilin1 interagiert.

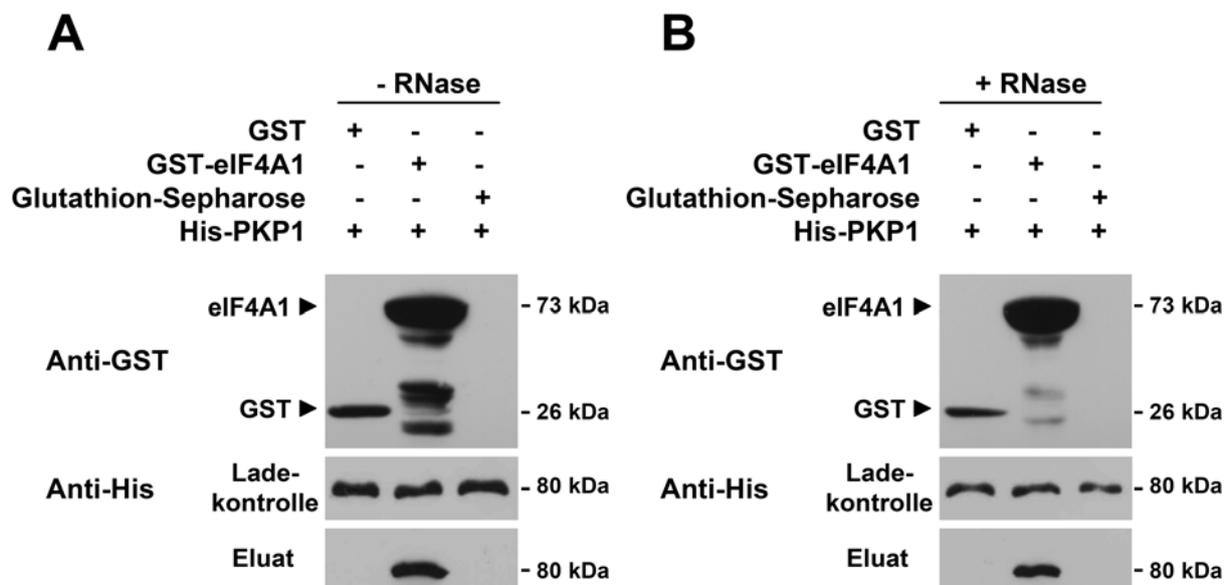


Abb. 3.6: Nachweis der Interaktion zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 mittels GST pull-down. (A) Im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) exprimiertes GST-eIF4A1 und GST wurde an Glutathion-Sepharose gekoppelt und zur Sedimentation von rekombinant hergestellten und aufgereinigten Plakophilin1 verwendet. Präzipitiertes Plakophilin1 wurde mittels Antikörperfärbung gegen den His-Tag nachgewiesen. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen an die Glutathion-Sepharose wurde Plakophilin1 mit Glutathion-Sepharose inkubiert. Als Ladekontrolle wurde 20% aufgereinigtes Plakophilin1 eingesetzt. (B) Zur Vermeidung RNA-bedingter Interaktionen wurde der GST pull-down in Gegenwart von 10 µg/ml RNase A durchgeführt.

3.1.2.3 Nachweis der Assoziation zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementationsanalyse (BiFC)

Wie in den Abschnitten 3.1.2.1 und 3.1.2.2 beschrieben, konnten durch 2 unabhängige Testsysteme die Interaktion zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 *in vitro* gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob diese auch *in vivo* möglich ist, wurde die Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementationsanalyse (BiFC) verwendet. Grundlage des BiFC-Prinzip ist das EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), welches in zwei Teilfragmente (YFP1 und YFP2) separiert wurde (Hu *et al.*, 2002; Hu and Kerppola, 2003). Die N-terminale Hälfte des EYFP (YFP1) wurde mit verschiedenen Plakophilin1 Fragmenten und der C-Terminus (YFP2) mit eIF4A1 fusioniert. Assoziieren die Proteine miteinander, können die beiden YFP-Hälften in die notwendige räumliche Nähe kommen (wenn die Fusion in der „richtigen“ Orientierung vorliegt). Der aktive Fluorophor kann sich ausbilden und als YFP-Signal detektiert werden. Eine schematische Darstellung dieses Systems ist in Abb. 3.7 A gezeigt. Zusätzlich enthielten die Plakophilin1-Konstrukte einen Flag-Tag (YFP1-Flag-PKP1) und das eIF4A1-Konstrukt einen HA-Tag (YFP2-HA-eIF4A1), wodurch mittels Antikörperfärbung die Transfektionseffizienz überprüft wurde. Alle Plakophilin1-Konstrukte wurden in Kombination mit eIF4A1 in HeLa Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen das Flag- und HA-Tag gefärbt sowie das YFP-Signal detektiert. In Abb. 3.7 B ist zu sehen, dass für eIF4A1 + Plakophilin1 „Kopf“-Domäne und eIF4A1 + Plakophilin1 Wildtyp (wt) ein zytoplasmatisches YFP-Signal beobachtet wurde, jedoch nicht für die Plakophilin1 *Armadillo-repeat* Domäne. Antikörperfärbungen gegen das Flag- und HA-Tag verdeutlichen, dass sowohl YFP1-Flag-PKP1 *repeats* als auch YFP2-HA-eIF4A1 überexprimiert wurden. Diese Daten zeigen, dass sowohl Plakophilin1 „Kopf“ als auch Plakophilin1 wt mit eIF4A1 *in vivo* assoziieren. In Übereinstimmung mit den Hefe-Dihybriddaten wurde mittels BiFC-Analyse keine bzw. nur eine schwache Assoziation zwischen der Plakophilin1 *Armadillo-repeat* Domäne und eIF4A1 detektiert. Um Hinweise über die Interaktionsstärke zu erhalten, wurde die YFP-Fluoreszenzintensität mittels FACS-Analyse quantifiziert. Für Plakophilin1 „Kopf“ wurde eine 4-fach höhere und für Plakophilin1 wt eine 3-fach höhere mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Plakophilin1 *Armadillo-repeat* Domäne gemessen (Abb. 3.7 C). Die BiFC-Daten bestätigen,

dass die Interaktion zwischen eIF4A1 und Plakophilin1 über die „Kopf“-Domäne vermittelt wird.

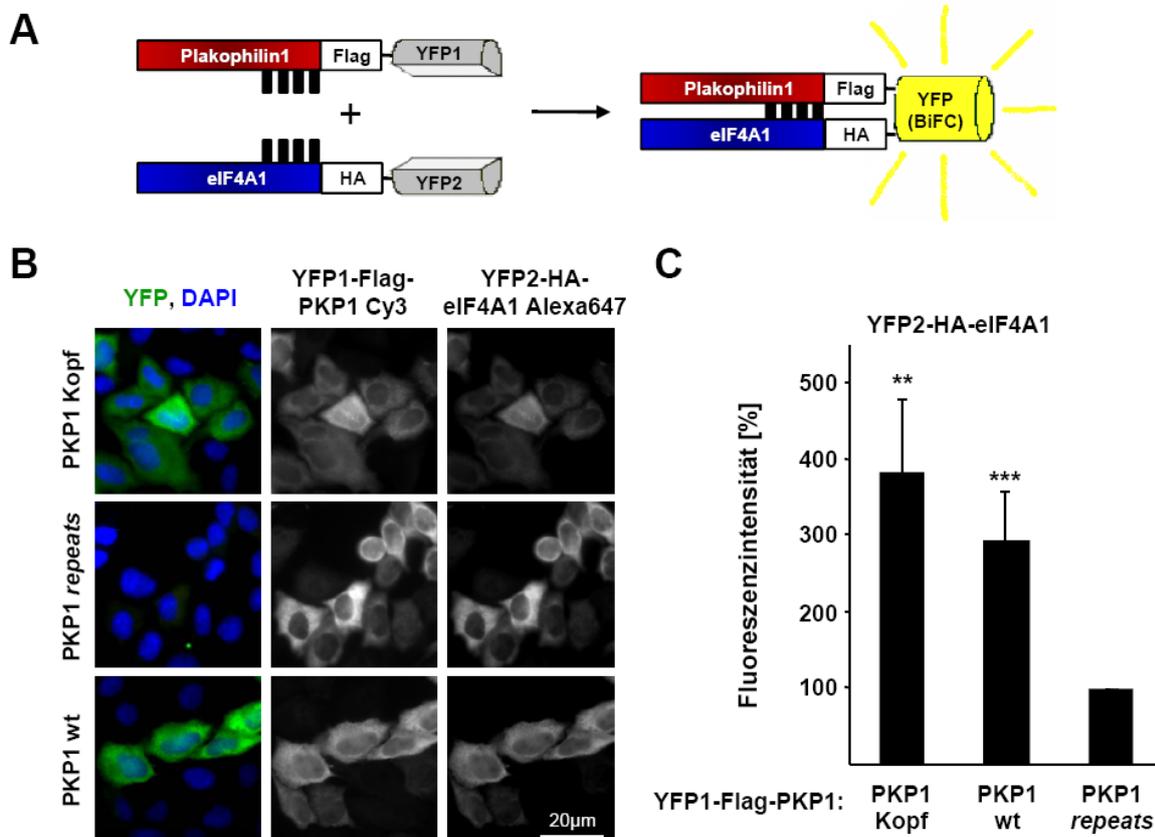


Abb. 3.7: Nachweis der Assoziation zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 *in vivo* mittels BiFC. (A) Schematische Darstellung des BiFC-Prinzips. **(B)** HeLa Zellen wurden mit den YFP1-Flag-Plakophilin1 Fragmenten und YFP2-HA-eIF4A1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen das Flag- und HA-Tag gefärbt. Plakophilin1 „Kopf“ und wt assoziieren mit eIF4A1 *in vivo*. **(C)** Quantifizierung der YFP-Fluoreszenzintensität von jeweils 20000 Zellen mittels FACS-Analyse. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. **, $p \geq 0.005$; ***, $p \geq 0.0005$.

Da Plakophilin1 direkt mit eIF4A1 interagiert und beide Proteine in *stress granules* lokalisierten, stellte sich die Frage, ob eine Assoziation zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 in *stress granules* beobachtet werden kann. Um dieses zu untersuchen, wurde die Lokalisation des YFP-Signals nach Stressinduktion verfolgt. HeLa Zellen wurden wie beschrieben transfiziert und nach 24 h wurde Stress durch Zugabe von Arsenat appliziert. Die Überexpression und Lokalisation der einzelnen Proteine wurde mittels Antikörperfärbung gegen den Flag- und HA-Tag und die *stress granule* Bildung mittels Antikörperfärbung gegen TIAR überprüft. In Abb. 3.8 A ist zu sehen, dass alle Plakophilin1-Konstrukte und eIF4A1 in zytoplasmatische granulären Strukturen lokalisierten. In Übereinstimmung mit den zuvor

gezeigten Daten wurde ebenso nach Stressinduktion ein positives YFP-Signal für eIF4A1 + Plakophilin1 „Kopf“ und eIF4A1 + Plakophilin1 wt in *stress granules* detektiert (Abb. 3.8 A und B).

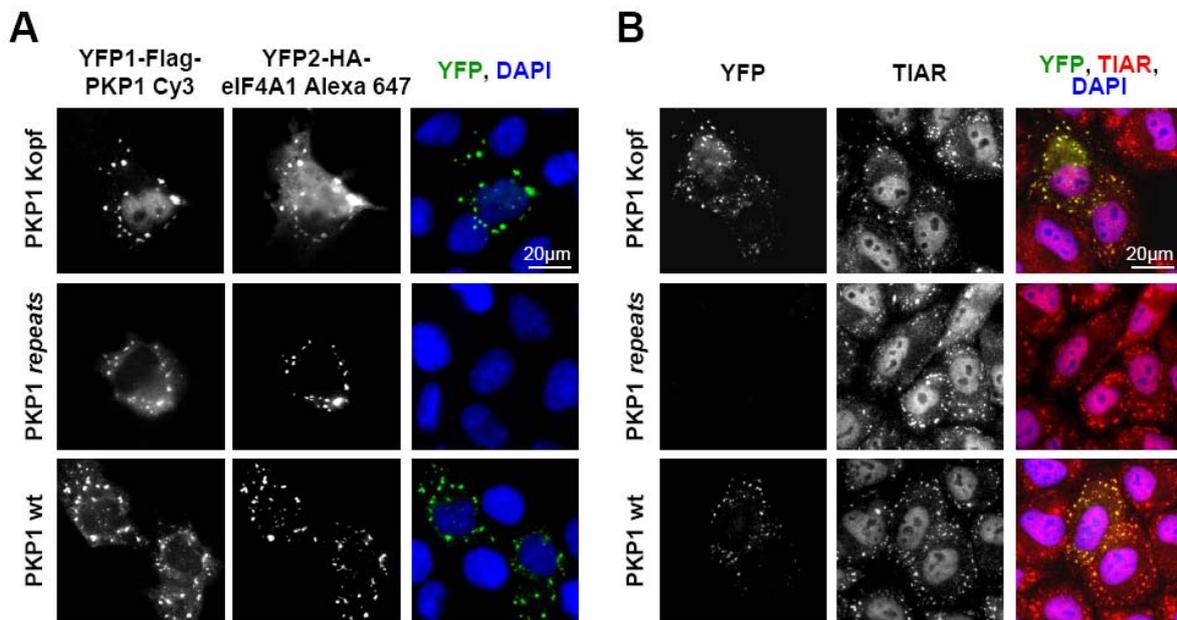


Abb. 3.8: Assoziation von Plakophilin1 und eIF4A1 in *stress granules*. HeLa Zellen wurden mit den entsprechenden YFP1-Flag-Plakophilin1 Konstrukten und YFP2-HA-eIF4A1 kotransfiziert und nach 24 h mit Arsenat behandelt. **(A)** Die Flag- und HA-Tag Färbungen zeigen eine Lokalisation von Plakophilin1 und eIF4A1 in zytoplasmatischen granulären Strukturen. In diesen Strukturen wurde ein BiFC-Signal für Plakophilin1 „Kopf“ und wt detektiert. **(B)** Plakophilin1 „Kopf“ und wt assoziieren mit eIF4A1 in TIAR-positiven *stress granules*.

3.1.3 Plakophilin1 und eIF4A1 haben keinen Einfluss auf die *stress granule*

Bildung

Aus den zuvor dargestellten Daten geht hervor, dass Plakophilin1 direkt mit eIF4A1 interagiert und beide Proteine in *stress granules* assoziieren. Daraus lassen sich verschiedene mögliche Funktionen für Plakophilin1 ableiten. Zum einen könnte Plakophilin1 als Gerüstprotein an der *stress granule* Bildung beteiligt sein und zum anderen könnte es, vermutlich über eIF4A1, Funktionen bei der Regulation der Translation ausüben. Um die erste Frage zu klären wurde untersucht, ob der *Knockdown* von Plakophilin1 bzw. von eIF4A1 einen Einfluss auf die *stress granule* Bildung und Lokalisation von eIF4A1 bzw. Plakophilin1 unter zellulärem Stress haben.

Um putative Funktionen von Plakophilin1 zu untersuchen, wurde der *Knockdown* für Plakophilin1 und eIF4A1 etabliert. HaCaT Zellen wurden mit Plakophilin1- und eIF4A1-

spezifischen siRNAs und Kontroll-siRNAs mittels Elektroporation transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Menge an mRNA für Plakophilin1 im Vergleich zu den verwandten Proteinen Plakophilin2 und 3 und ebenso die Menge an eIF4A1 mRNA im Vergleich zu eIF4A2 und 3 mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Reduktion der Proteinmenge wurde mittels Western Blot untersucht. Abb. 3.9 A zeigt eine Reduktion der Plakophilin1 mRNA auf ca. 15%. Diese Reduktion korrelierte mit einer schwachen Induktion der Plakophilin2 mRNA, wobei der mRNA-Level für Plakophilin3 unbeeinflusst war. Auf Proteinebene wurde nach *Knockdown* von Plakophilin1 eine starke Reduktion der Plakophilin1 Proteinmenge beobachtet, wobei hier kein Effekt für Plakophilin2 und 3 detektiert wurde (Abb. 3.9 C). Demzufolge könnte es sich bei der gesteigerten mRNA Menge für Plakophilin2 nach *Knockdown* von Plakophilin1 auch um einen Artefakt handeln, da sich dieser Effekt nicht auf Proteinebene widerspiegelte und der *Knockdown* von Plakophilin2 keinen Effekt auf die Plakophilin1 mRNA zeigte (Abb. 3.12 A). Der siRNA-vermittelte *Knockdown* von eIF4A1 resultierte nach 48 h in einer Reduktion der eIF4A1 mRNA auf ca. 15%, welcher mit einer leichten Steigerung der mRNA-Menge für die homologe Isoform eIF4A2 korrelierte (Abb. 3.9 B). Der mRNA-Level für eIF4A3 blieb unbeeinflusst. Die Reduktion der Proteinmenge von eIF4A1 wurde im Western Blot überprüft (Abb. 3.10 C).

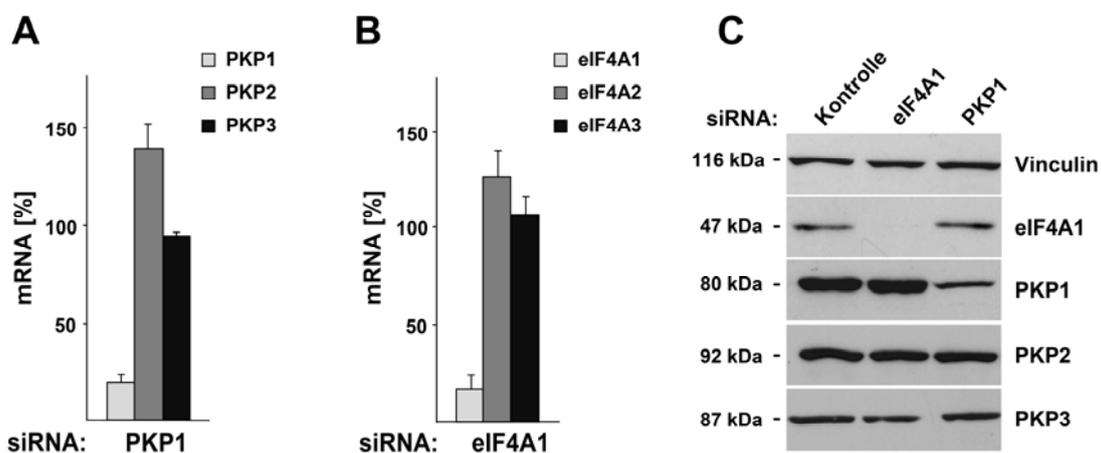


Abb. 3.9: Reduktion der mRNA- und Proteinmenge nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 in HaCaT Zellen. HaCaT Zellen wurden mit Plakophilin1-spezifischen, eIF4A1-spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert und nach 48 h auf mRNA- und Proteinebene quantifiziert. **(A)** Quantifizierung der mRNA-Mengen für Plakophilin1, 2 und 3 nach *Knockdown* von Plakophilin1. Die mRNA-Menge der Kontroll-siRNA wurde als 100% definiert (in Diagramm nicht gezeigt) und die relativen mRNA-Level für Plakophilin1, 2 und 3 dazu ins Verhältnis gesetzt. Die cDNA-Menge wurde auf Cyclophilin A und RPLP0 normalisiert. **(B)** Quantifizierung der mRNA-Mengen für eIF4A1, 2 und 3 nach *Knockdown* von eIF4A1. Die Normalisierung erfolgte wie unter (A) beschrieben. Standardabweichungen repräsentieren 3 unabhängige Experimente. **(C)** Western Blot Analyse nach *Knockdown* von eIF4A1 und Plakophilin1 gegen Vinculin (Ladekontrolle), eIF4A1, Plakophilin1, 2 und 3.

Um zu untersuchen, ob die verminderte Expression von Plakophilin1 einen Einfluss auf die Lokalisation von eIF4A1 bzw. der *Knockdown* von eIF4A1 einen Einfluss auf die Lokalisation von Plakophilin1 in *stress granules* hat, wurden HaCaT Zellen mit Plakophilin1-, eIF4A1- und Kontroll-siRNAs transfiziert und nach 48 h mit Arsenat behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen eIF4A1 und Plakophilin1 gefärbt. Die mikroskopischen Analysen, dargestellt in Abb. 3.10 A, zeigen, dass nach *Knockdown* von eIF4A1, endogenes Plakophilin1 in *stress granules* lokalisiert und ebenso endogenes eIF4A1 nach *Knockdown* von Plakophilin1. Das bedeutet, dass Plakophilin1 unter Stress nicht essentiell ist als „*Scaffold*“-Protein. Desweiteren wird die Rekrutierung von Plakophilin1 in *stress granules* unter oxidativem Stress nicht alleine über eIF4A1 vermittelt. Um zu bestätigen, dass eIF4A1 und Plakophilin1 keinen Einfluss auf die *stress granule* Bildung haben, wurden die Plakophilin1- und eIF4A1-siRNA transfizierten Zellen mit anti-TIAR gefärbt. Abb. 3.10 B zeigt, dass sowohl nach Reduktion von eIF4A1, als auch von Plakophilin1 TIAR-positive *stress granules* detektiert werden konnten. Somit scheint eine verringerte eIF4A1-Expression und auch eine Reduktion von Plakophilin1 keinen ersichtlichen Einfluss auf die Formation von *stress granules* auszuüben.

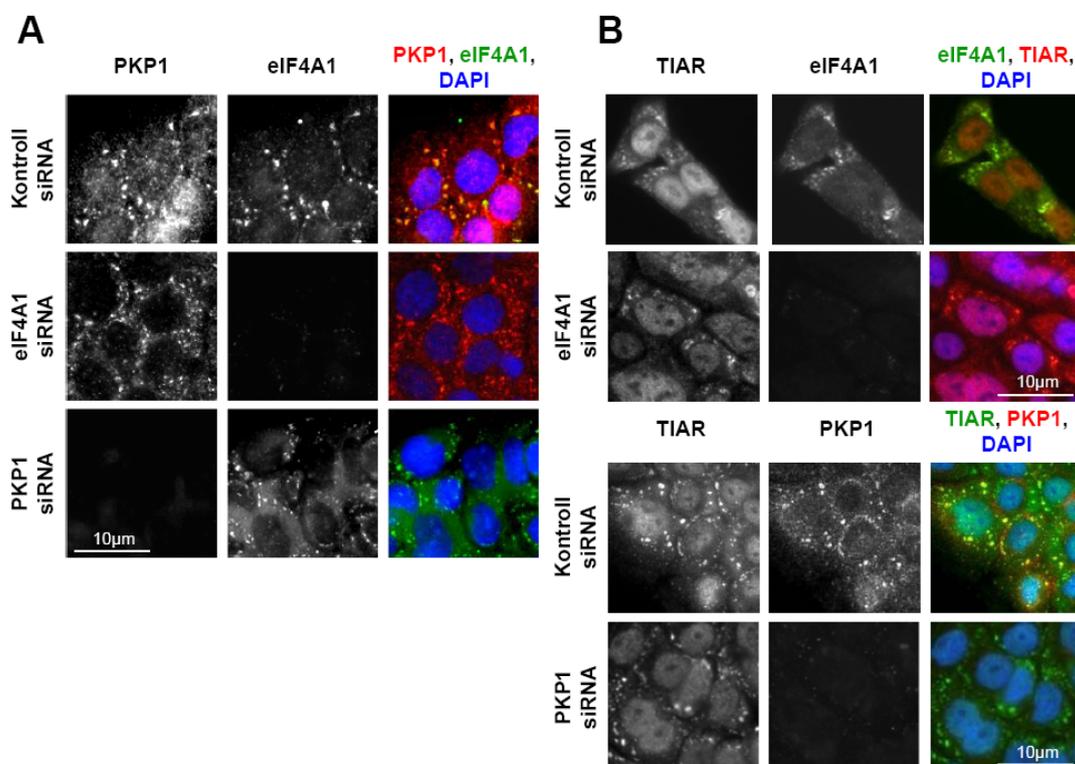


Abb. 3.10: Knockdown von Plakophilin1 und eIF4A1 haben keinen Einfluss auf die Formation von stress granules. (A, B) HaCaT Zellen wurden mit Plakophilin1 und eIF4A1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress durch Zugabe von Arsenat für 1 h appliziert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen eIF4A1, Plakophilin1 und TIAR gefärbt.

3.1.4 Funktionen von Plakophilin1 und eIF4A1 bei der Kontrolle der Translation *in vivo*

Da Plakophilin1 als direkter Interaktionspartner von eIF4A1 identifiziert wurde (siehe 3.1.2), jedoch diese Proteine keine essentielle Funktion in der *stress granule* Bildung hatten, wurde im folgendem die Funktionen von Plakophilin1 und eIF4A1 in der Regulation der Translation analysiert. Dazu wurde untersucht, wie die Expression von eIF4A1 und Plakophilin1 die Proteinsynthese in der Zelle beeinflusst.

3.1.4.1 Knockdown von Plakophilin1, Plakophilin3 und eIF4A1 inhibieren die Proteinsynthese

Um zu untersuchen, ob die Reduktion von Plakophilin1 und eIF4A1 mittels siRNAs die globale Proteinsynthese *in vivo* beeinflussen, wurden (³⁵S)-Methionin-Markierungsexperimente durchgeführt. HaCaT Zellen wurden mit Plakophilin1-, eIF4A1- und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 15 min mit Medium ohne Methionin inkubiert und anschließend für 1 h mit (³⁵S)-Methionin (50 µCi/ml) markiert. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte aus Konzentrationsunterschieden zwischen den einzelnen Lysat-Proben resultierten, wurde das SDS-Gel mit Coomassie angefärbt. Abb. 3.11 A zeigt, dass sowohl nach *Knockdown* von Plakophilin1 als auch von eIF4A1 die globale Proteinsynthese im Vergleich zur Kontrolle reduziert war. Dieser Effekt beruhte nicht auf Proteinkonzentrationsunterschieden der aufgetragenen Proben, was durch die Coomassie-Färbung bestätigt wurde. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten der Autoradiographie, normalisiert auf die totale Proteinmenge (Coomassie-Färbung), zeigte, dass die Proteinsyntheserate nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 signifikant auf ca. 70% reduziert war (Abb. 3.11 B). Diese Reduktion konnte zusätzlich mittels Szintillationsmessung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten korrelierten mit denen von Mazroui und Kollegen, welche in HeLa Zellen eine Inhibierung der zellulären Translation um 40% nach Reduktion der endogenen

eIF4A1-Menge mittels (^{35}S)-Methionin-Markierung beschrieben (Mazroui *et al.*, 2006).

Um auszuschließen, dass es sich bei der Reduktion der Proteinsynthese nach Plakophilin1 *Knockdown* um einen Transkriptionseffekt handelt, wurde das Experiment unter Inhibierung der Polymerase II-vermittelten Transkription wiederholt. Auch mit Aktinomycin D konnte eine ähnliche signifikante Reduktion der Proteinsyntheserate auf ca. 70% für Plakophilin1 und eIF4A1 *Knockdown* beobachtet werden (Abb. 3.11 C und D). Dies bedeutet, dass der Effekt nicht auf eine putative nukleäre Funktion von Plakophilin1 zurückzuführen ist, sondern auf Translationsebene beruht.

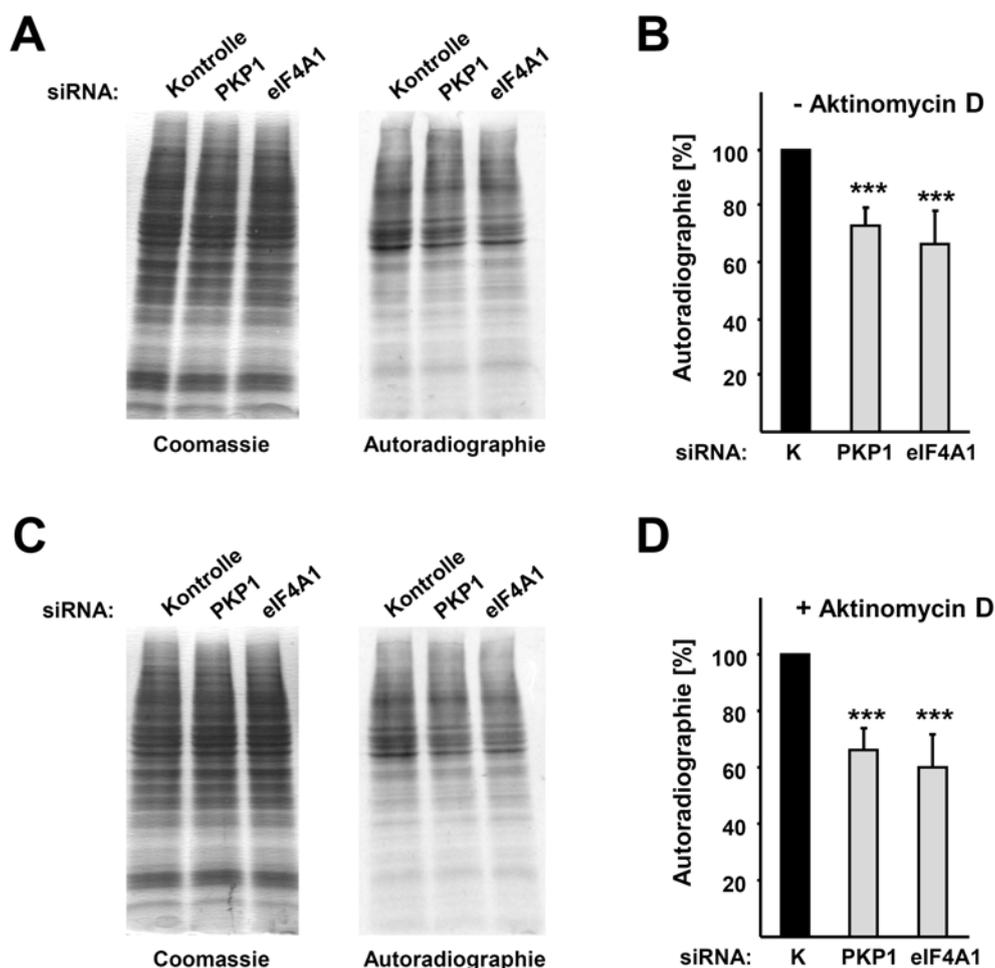


Abb. 3.11: Knockdown von Plakophilin1 und eIF4A1 inhibieren die Proteinsynthese. (A) HaCaT Zellen wurden mit spezifischen-Plakophilin1-, eIF4A1- und Kontroll-siRNAs transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für 15 min mit Medium ohne Methionin inkubiert und für 1 h mit (^{35}S)-Methionin markiert. Die Quantifizierung der neu synthetisierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie. (B) Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Coomassie-Färbung). (C und D) Inhibierung der Transkription durch Aktinomycin D zeigte keinen Effekt auf die reduzierte Proteinmenge nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1. HaCaT Zellen wurden wie in (A) beschrieben transfiziert, jedoch wurde zusätzlich 15 min vor der (^{35}S)-Methionin-Markierung die Polymerase II-Transkription inhibiert. Die

Auswertung und Quantifizierung der (^{35}S)-Methionin markierten Proteine erfolgte wie oben beschrieben. K = Kontrolle, PKP = Plakophilin. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. ***, $p \geq 0.0005$.

Desweiteren wurde untersucht, ob die verwandten Proteine Plakophilin2 und 3 auch einen Einfluss auf die Translation haben. Um dieses zu analysieren wurde der *Knockdown* von Plakophilin2 und 3 in HeLa Zellen etabliert, da diese Zellen eine hohe Expression von Plakophilin2 und 3 zeigten. Dazu wurden HeLa Zellen mit Plakophilin2 und 3 spezifischen und Kontroll-siRNAs mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Die Plakophilin2 und 3 mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR und die Proteinmenge mittels Western Blot Analyse 48 h nach Transfektion quantifiziert. Spezifische siRNAs für Plakophilin2 und 3 zeigten eine signifikante Reduktion der Menge an endogener Plakophilin2 und 3 mRNA und endogenem Protein, ohne Effekt auf die verwandten Proteine (Abb. 3.12 A-C).

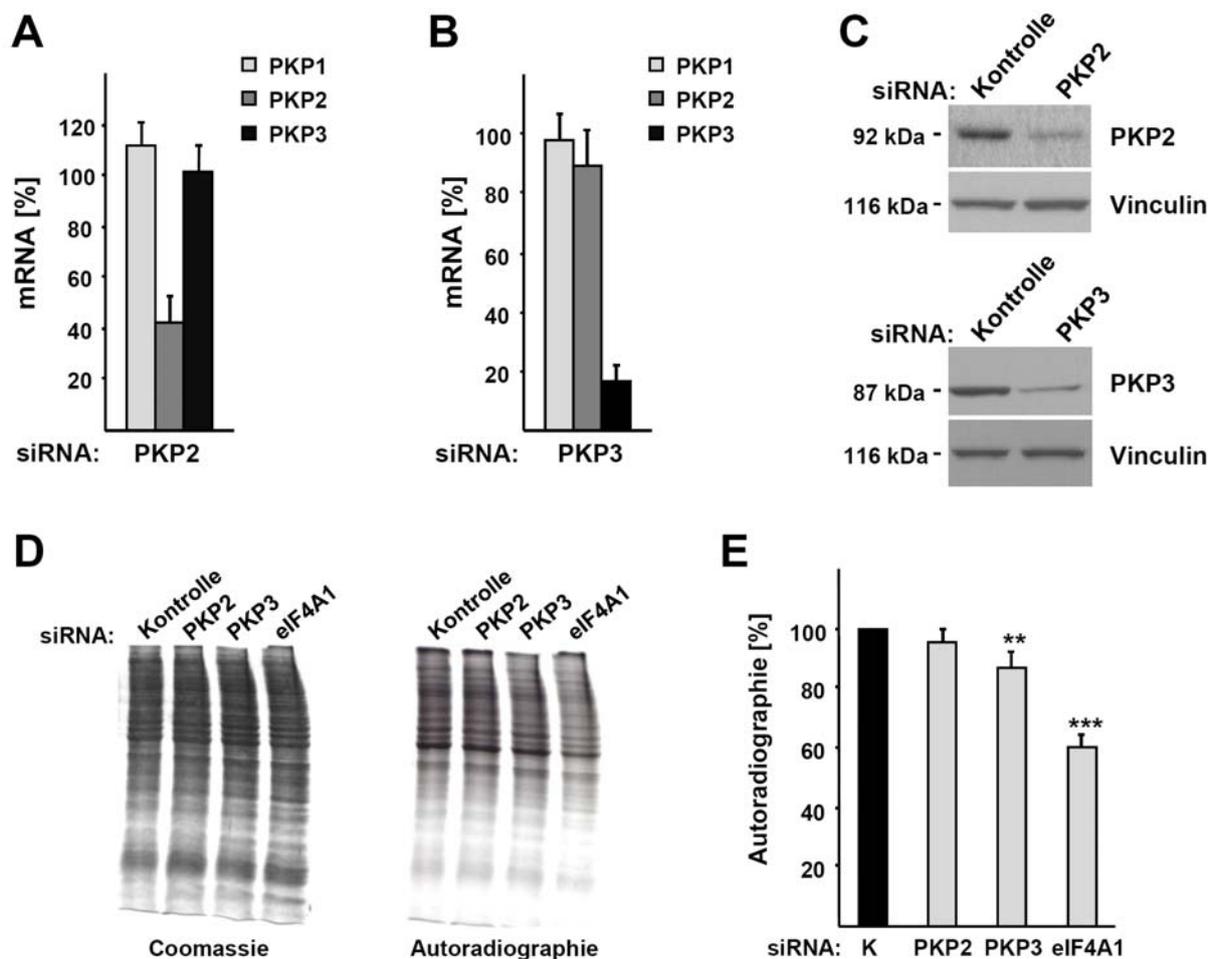


Abb. 3.12: Knockdown von Plakophilin3 und eIF4A1 inhibieren die Proteinsynthese. (A, B, C) HeLa Zellen wurden mit Plakophilin2 und 3 spezifischen und Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde die Menge an endogener Plakophilin1, 2 und 3 mRNA und endogenem Plakophilin2 und 3

Protein analysiert. **(A, B)** Quantifizierung der mRNA-Mengen für Plakophilin1, 2 und 3 nach *Knockdown* von Plakophilin2 (A) und 3 (B). Die mRNA-Menge der Kontroll-siRNA wurde als 100% definiert (in Diagramm nicht gezeigt) und die relativen mRNA-Level für Plakophilin1, 2 und 3 dazu ins Verhältnis gesetzt. Cyclophilin A und RPLP0 dienten der Normalisierung. Standardabweichungen repräsentieren 3 unabhängige Experimente. **(C)** Western Blot Analyse nach *Knockdown* von Plakophilin2 und 3 gegen Vinculin (Ladekontrolle), Plakophilin2 und 3. **(D, E)** HeLa Zellen wurden mit Plakophilin2, 3 und eIF4A1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit (³⁵S)-Methionin markiert. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert und quantifiziert. K = Kontrolle, PKP = Plakophilin. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. **, p ≥ 0.005; ***, p ≥ 0.0005.

Mittels (³⁵S)-Methionin-Markierungsexperimenten konnte in HeLa Zellen gezeigt werden, dass der *Knockdown* von Plakophilin2 keinen Effekt und der *Knockdown* von Plakophilin3 nur einen geringen inhibierenden Einfluss auf die Proteinsynthese hatten (Abb. 3.12 D und E). Nach *Knockdown* von eIF4A1 konnte eine Reduktion der Translation auf ca. 60% beobachtet werden. Somit scheint die Reduktion der Proteinsyntheserate ein spezifischer Effekt für den *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 zu sein, welcher nicht für Plakophilin2 bzw. nur in einem geringem Maß für Plakophilin3 detektiert wurde.

3.1.4.2 Überexpression von Plakophilin1 und eIF4A1 stimulieren die Proteinsynthese

Um die Spezifität des *Knockdown*-Effektes von Plakophilin1 und eIF4A1 auf die Translation zu validieren, wurde untersucht ob die Überexpression von Plakophilin1 und eIF4A1 einen komplementären Effekt auf die Proteinsynthese haben. Für diese Experimente wurden HEK 293 Zellen verwendet, da diese eine sehr hohe Transfektionseffizienz zeigen, während HaCaT Zellen, die für den *Knockdown* verwendet wurden, sich nur schlecht mit Plasmiden transfizieren lassen. HEK 293 Zellen wurden mit YFP1-Plakophilin1 Konstrukten, YFP2-eIF4A1 und den Kontroll-Plasmiden, YFP1-C und YFP2-C, transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit (³⁵S)-Methionin markiert. Plakophilin1 erhöhte die Translation um ca. 40% und eIF4A1 um ca. 50% (Abb. 3.13 A). Die Überexpression von Plakophilin1 und eIF4A1 wurde mittels Western Blot kontrolliert. Um diese Daten in einem zusätzlichen Zellsystem zu bestätigen wurde Plakophilin1 in HeLa Zellen für 48 h überexprimiert und auch hier konnte eine signifikante Erhöhung der Proteinsynthese um ca. 50% beobachtet werden (Abb. 3.13 B).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Plakophilin1 und eIF4A1 miteinander interagieren und dass Plakophilin1 ebenso wie eIF4A1 die Proteinsynthese stimuliert. Daher stellte sich die Frage, ob der Effekt von Plakophilin1 auf die Translation von eIF4A1 abhängt

oder ob Plakophilin1 die Translation unabhängig von eIF4A1 stimulieren kann. Um diese Frage zu beantworten, wurden Kotransfektionsexperimente nach *Knockdown* von eIF4A1 und gleichzeitiger Überexpression von Plakophilin1 mittels (³⁵S)-Methionin-Markierung analysiert. HeLa Zellen wurden mit eIF4A1-siRNA, eIF4A1-siRNA in Kombination mit YFP1-Plakophilin1 und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit (³⁵S)-Methionin markiert und die neu synthetisierten Proteinmengen mittels Autoradiographie quantifiziert. Abb. 3.13 C zeigt, dass die Inhibierung der Translation nach *Knockdown* von eIF4A1 nicht durch exogenes Plakophilin1 aufgehoben wurde. Demnach könnte man vermuten, dass Plakophilin1 über eIF4A1 die Translation stimuliert. Jedoch ist hierbei zu bedenken, dass eIF4A1 eine essentielle Komponente des Translationsinitiationskomplexes ist und der Verlust dieses Faktors die Translation stark inhibiert und demzufolge Plakophilin1 auch unabhängig von eIF4A1 vermutlich keinen translationsstimulierenden Effekt zeigen würde. Demzufolge kann aufgrund dieses Experimentes nicht entschieden werden, ob Plakophilin1 die Translation über eIF4A1 oder über den eIF3-Komplex stimuliert.

Um zu untersuchen, inwieweit eIF4A1 die Plakophilin1 vermittelte Translation beeinflusst, wurde die Proteinsynthese nach *Knockdown* von Plakophilin1 und gleichzeitiger Überexpression von eIF4A1 mittels (³⁵S)-Methionin-Markierung untersucht. Aufgrund der geringen endogenen Expression von Plakophilin1 in HeLa und HEK 293 Zellen, konnten der *Knockdown* von Plakophilin1 und die Überexpression von eIF4A1 nur in HaCaT Zellen durchgeführt werden. Da die Überexpression von Proteinen in HaCaT Zellen problematisch war und die sehr schlechte Transfektionseffizienz auch nicht mit verschiedenen Transfektionsreagenzien optimiert werden konnte, konnte dieser Versuch nicht ausgewertet werden.

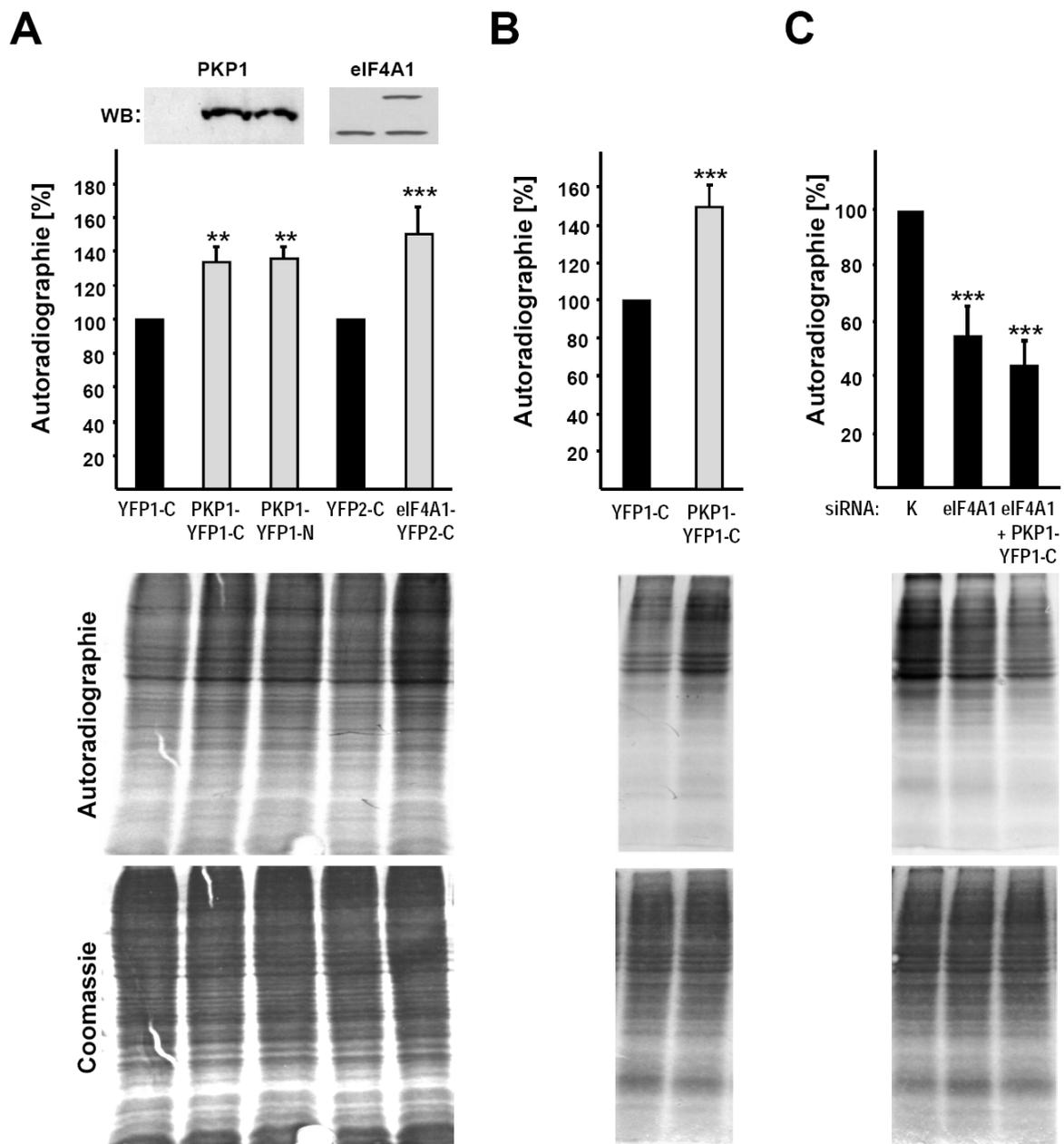


Abb. 3.13: Überexpression von Plakophilin1 und eIF4A1 stimulieren die Proteinsynthese. (A) HEK 293 Zellen wurden mit YFP1-Plakophilin1-C; YFP1-Plakophilin 1-N; YFP2-eIF4A1-C und den entsprechenden Leervektoren, YFP1-C und YFP2-C, transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit (^{35}S) -Methionin markiert. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert und quantifiziert. Die Überexpression von Plakophilin1 und eIF4A1 wurde mittels Western Blot kontrolliert. **(B)** HeLa Zellen wurden mit YFP1-Plakophilin1-C und YFP1-C transfiziert. Nach 48 h wurde die globale Proteinsynthese mittels (^{35}S) -Methionin-Markierung analysiert. **(C)** Die Inhibierung der Translation nach *Knockdown* von eIF4A1 konnte nicht durch exogenes Plakophilin1 aufgehoben werden. HeLa Zellen wurden mit Kontroll-siRNA, eIF4A1-siRNA und eIF4A1-siRNA in Kombination mit YFP1-Plakophilin1 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit (^{35}S) -Methionin markiert und die neu synthetisierten Proteine mittels Autoradiographie analysiert und quantifiziert. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. ***, $p \geq 0.0005$.

3.1.4.3 Plakophilin1, Plakophilin3 und eIF4A1 stimulieren die Translation

Um zu überprüfen, ob Plakophilin1 die Translation direkt bzw. indirekt über eine Stabilisierung der mRNA beeinflusst, wurde das Luziferase-Reporter-System verwendet, wobei die Luziferase-Aktivität auf die Luziferase mRNA normalisiert wurde. Bei einer direkten Stimulierung der Translation sollte die Luziferase-Aktivität nach Normalisierung auf die Luziferase mRNA erhöht sein. Bei einer indirekten Stimulierung der Translation, über eine Stabilisierung der mRNA, sollte die Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle unbeeinflusst bleiben, da sich dieser Effekt nach Normalisierung auf die Luziferase mRNA aufhebt. Als Reportergerätenkonstrukte wurden pcDNA3-FL und pRL-CMV verwendet. pcDNA3-FL enthält einen CMV-Promotor, gefolgt von einem 119 Nukleotide langem 5'UTR und das Gen für *firefly* Luziferase. pRL-CMV enthält einen CMV-Promotor, gefolgt von einem 207 Nukleotide langem 5'UTR und das Gen für *renilla* Luziferase. Die Reportergerätenkonstrukte sind in Abb. 3.14 A schematisch dargestellt.

HEK 293 Zellen wurden mit Plakophilin1, 2 und 3 als GFP-Fusionsproteine in Kombination mit dem *firefly* und *renilla* Luziferase-Reporter transfiziert. Als Kontrollen wurden GFP-eIF4A1 und eine GFP-eIF4A1-Mutante, welche keine RNA-Helikase Aktivität besitzt, verwendet. Nach 48 h wurden sowohl die Luziferase-Aktivitäten als auch die Luziferase mRNA quantifiziert. Für Plakophilin1, 3 und eIF4A1 wurde eine signifikante Erhöhung sowohl für die *firefly* Luziferase Aktivität (Abb. 3.14 B) als auch für die *renilla* Luziferase Aktivität (Abb. 3.14 C) detektiert. In Übereinstimmung mit den vorhergehenden Ergebnissen konnte für Plakophilin2 kein Effekt auf Translationsebene beobachtet werden. Wie bereits von Pause und Kollegen *in vitro* beschrieben, konnte auch in dieser Arbeit für die eIF4A1-Mutante eine Inhibierung der Translation *in vivo* gezeigt werden (Abb. 3.14 B und C, (Pause *et al.*, 1994b)). Die Daten belegen, dass Plakophilin1 und eIF4A1 und zu einem geringeren Maß Plakophilin3 die Translation direkt *in vivo* stimulieren.

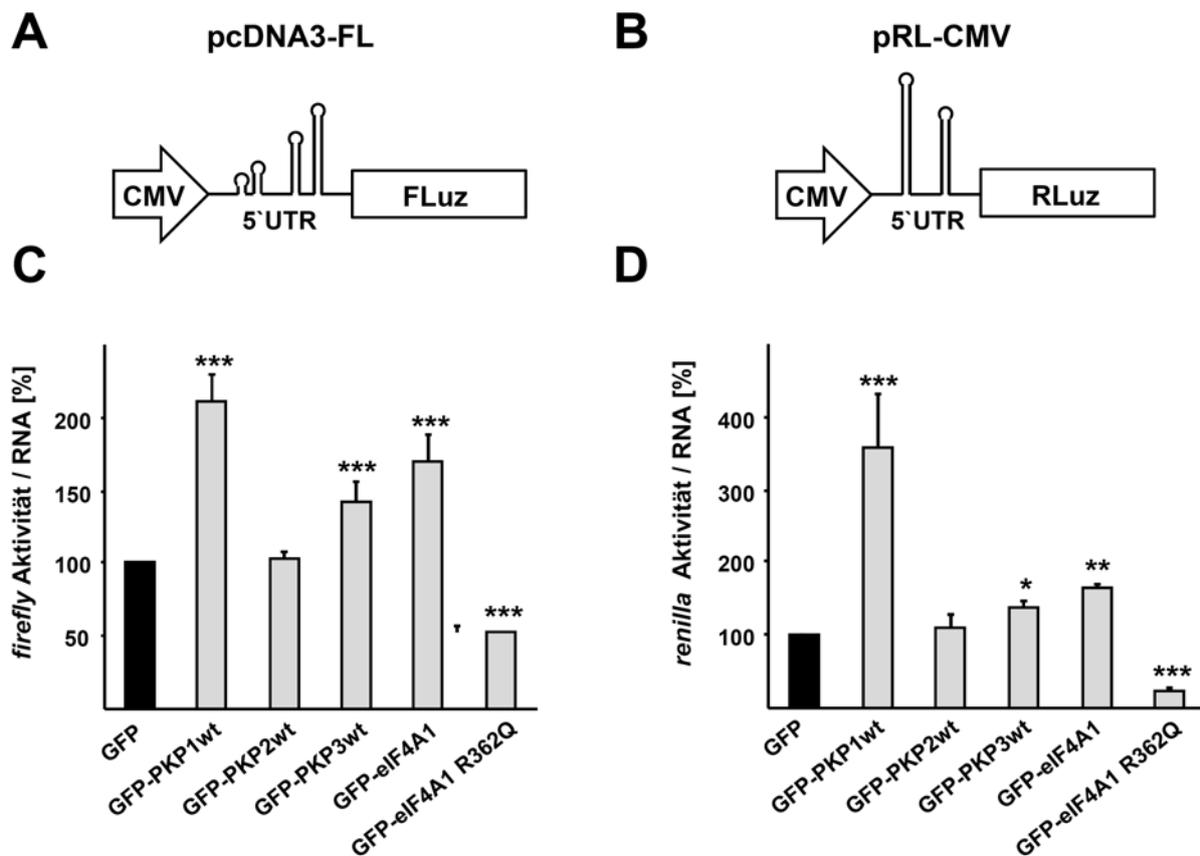


Abb. 3.14: Überexpression von Plakophilin1, Plakophilin3 und eIF4A1 stimulieren die Translation. (A, B) Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte. (A) pcDNA3-FL: Dem CMV-Promotor folgt ein 119 Nukleotide langer 5'UTR ($\Delta G = -36,25$ kcal/mol) und das Reportergen *firefly* Luziferase. (B) pRL-CMV: Dem CMV-Promotor folgt ein 207 Nukleotide langer 5'UTR ($\Delta G = -48,35$ kcal/mol) und das Reportergen *renilla* Luziferase. (C, D) HEK 293 Zellen wurden mit Plakophilin1, 2, 3, eIF4A1 und eIF4A1 R362Q als GFP-Fusionsproteine in Kombination mit *firefly* und *renilla* Reportern transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen zu gleichen Teilen passagiert und nach weiteren 24 h die Luziferase-Aktivität sowie die Luziferase mRNA-Menge mittels qRT-PCR bestimmt. Die Luziferase-Aktivität wurde auf die Luziferase mRNA normalisiert. Plakophilin1, Plakophilin3 zu einem geringeren Maß, und eIF4A1 stimulieren die *firefly* als auch die *renilla* Luziferase-Aktivität. eIF4A1 R362Q reduziert die Luziferase-Aktivität. Plakophilin2 zeigt keinen Effekt auf die Translation. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. *, $p \geq 0.05$; ***, $p \geq 0.0005$.

3.1.5 Funktionen von Plakophilin1 und eIF4A1 bei der Kontrolle der Translation *in vitro*

Zur Bestätigung des stimulierenden Effektes von Plakophilin1 auf die Translation, wurde der Einfluss auch *in vitro* untersucht werden. Hierzu wurde rekombinantes Plakophilin1 unter nativen Bedingungen aus *E. coli* aufgereinigt (siehe 2.5.3.1). Da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass ein Großteil des Proteins während der sukzessiven Reinigungsschritte präzipitierte, wurde nach der Ni-NTA-Agarose Affinitätschromatographie

den Elutionsfraktionen 250 mM Arginin zugesetzt, welche anschließend über eine Gelfiltrationschromatographie zur Homogenität aufgereinigt wurden. Zur Kontrolle der Reinigung wurde das finale Eluat mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.15).

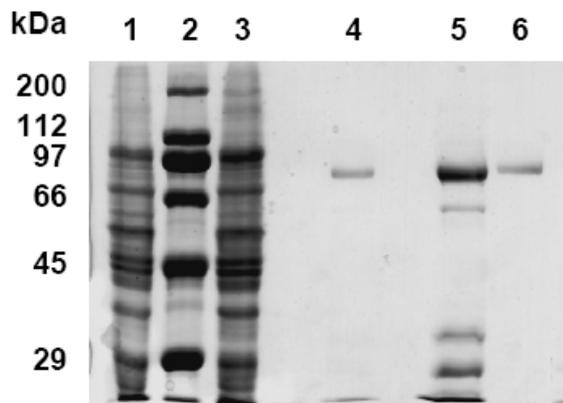


Abb. 3.15: Reinigung von Plakophilin1. Plakophilin1 wurde im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS als His-tag-Fusionsprotein synthetisiert und über sukzessive Chromatographiestritte an Ni-NTA-Agarose und Superdex 200 zur Homogenität gereinigt. Das SDS-PAGE zeigt folgende Fraktionen: 1 input; 2 Marker; 3 Durchlauf Ni-NTA-Agarose; 4 Elutionsfraktion von Ni-NTA-Agarose; 5 Aufkonzentrierung nach Ni-NTA-Agarose; 6 Gelfiltration. Das Molekulargewicht der Markerproteine (2) ist links angegeben.

3.1.5.1 Plakophilin1 stimuliert die *cap*-abhängige Translation *in vitro*

Der Einfluss von Plakophilin1 auf die *cap*-abhängige Translation wurde zusätzlich *in vitro* analysiert. Dazu wurde die m^7G -*cap*-CAT-poly(A) mRNA in Retikulozytenlysaten mit verschiedenen Mengen des gereinigten Plakophilin1 in Gegenwart von (^{35}S)-Methionin translatiert. Dabei zeigte sich, dass Arginin die Translation inhibiert. Aus diesem Grund wurde nicht Wasser sondern Puffer als Kontrolle verwendet. Die Quantifizierung der Autoradiogramme zeigte, dass mit steigender Plakophilin1 Konzentration die *cap*-abhängige Translation stimuliert wurde (Abb. 3.16). Diese *in vitro* Ergebnisse bestätigen, dass Plakophilin1 einen stimulierenden Einfluss auf die *cap*-abhängige Translation hat.

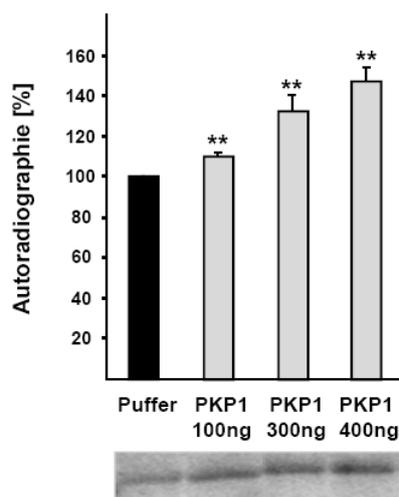


Abb. 3.16: Stimulierung der *cap*-abhängigen Translation durch Plakophilin1. Als Matrize für die *in vitro*-Transkription diente das mit Hind III linearisierte Plasmid pGEM-CAT. Dieser Vektor trägt ein Reportergen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Die Translation der *in vitro* transkribierten m^7G -*cap*-CAT-poly(A) mRNA erfolgte in Kaninchen-Retikulozytenlysate mit steigenden Mengen rekombinant exprimierten Plakophilin1 für 1 h bei 30°C. Die verschiedenen Ansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten. **, $p \geq 0.005$.

3.1.5.2 Einfluss von Plakophilin1 auf die ATPase Aktivität von eIF4A1

Im Abschnitt 3.1.4 und 3.1.5.1 wurde gezeigt, dass Plakophilin1 die Translation stimuliert. Um Hinweise darüber zu erhalten, wie Plakophilin1 die Translation stimulieren kann, sollte im folgendem der direkte Einfluss von Plakophilin1 auf die ATPase Aktivität von eIF4A1 untersucht werden. Bisher wurde gezeigt, dass die Translationsinitiationsfaktoren eIF4B, eIF4F, eIF4G und eIF4H die ATPase Aktivität von eIF4A1 stimulieren (Richter-Cook et al., 1998; Grifo et al., 1984; Bi et al., 2000; Korneeva et al., 2005). Um den Einfluss dieser Proteine auszuschließen, wurden die Untersuchungen zur ATPase Aktivität mit rekombinant hergestelltem gereinigtem eIF4A1 und Plakophilin1 durchgeführt.

Für diese Studien wurde rekombinantes eIF4A1 wie beschrieben aus *E. coli* aufgereinigt (Lindqvist et al., 2008b). Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.17 A). Zur Untersuchung der ATPase Aktivität von eIF4A1 wurden Aktivitätsstudien in Kombination mit rekombinanten Plakophilin1 und poly(A) als Substrat durchgeführt. Es ist beschrieben, dass in Abwesenheit von mRNAs bzw. poly(A) eIF4A1 keine bzw. nur eine geringe ATPase Aktivität besitzt und diese am effizientesten durch poly(A) stimuliert wurde (Grifo et al., 1984; Korneeva et al., 2005; Richter-Cook et al., 1998). Die ATPase Aktivität wurde sowohl mit einem kolorimetrischen Test basierend auf der Bildung eines grünen Phospho-Molybdat-Malachit Komplexes als auch radioaktiv mit markiertem (γ - ^{32}P)-ATP analysiert. Da die Ergebnisse grundsätzlich überein stimmten, der kolorimetrische Test aber eine höhere Sensitivität zeigte, beschränken sich die gezeigten Ergebnisse auf dieses Testsystem. Zu Beginn des Versuches wurde die biologische Aktivität des gereinigten eIF4A1 in An- und Abwesenheit von poly(A) überprüft. Poly(A) stimulierte die ATPase Aktivität von eIF4A1 um den Faktor 2 bis 2.5 (Daten nicht gezeigt). Diese Daten korrelierten mit denen von Richter-Cook und Kollegen, welche eine Stimulation der ATPase Aktivität von eIF4A1 um den Faktor 2.3 beschrieben (Richter-Cook et al., 1998). Anschließend wurde der Einfluss von Plakophilin1 auf die ATPase Aktivität von eIF4A1 untersucht. Um den inhibierenden Effekt von Arginin in allen Ansätzen gleich zu halten, wurden diese mit einer einheitlichen Arginin-Konzentration versetzt. Abb. 3.17 B zeigt die RNA-abhängige ATPase Aktivität von eIF4A1 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Plakophilin1 Konzentrationen. Dabei wurde festgestellt, dass auch Plakophilin1 allein eine ATPase Aktivität besitzt. Um auszuschließen dass die Aktivitätssteigerung von eIF4A1 in

Kombination mit Plakophilin1 auf einem additiven Effekt beruht, wurde die relative ATPase Aktivität von eIF4A1 und Plakophilin1 im Vergleich zu eIF4A1 + Plakophilin1 aufgetragen. Abb. 3.17 C verdeutlicht, dass Plakophilin1 die ATPase Aktivität von eIF4A1 stimuliert und dass es sich hierbei um einen konzentrationsabhängigen Effekt handelt. Auch ohne poly(A) konnte eine geringe Erhöhung der ATPase Aktivität für eIF4A1 mit Plakophilin1 detektiert werden. Jedoch wurde keine zusätzliche Stimulierung mit steigenden Plakophilin1 Konzentrationen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass neben den bereits bekannten Translationsinitiationsfaktoren auch Plakophilin1 einen Einfluss auf die RNA-abhängige ATPase Aktivität von eIF4A1 hat. Der *in vitro* Test legt nahe, dass der Effekt durch die direkte Assoziation hervorgerufen wurde.

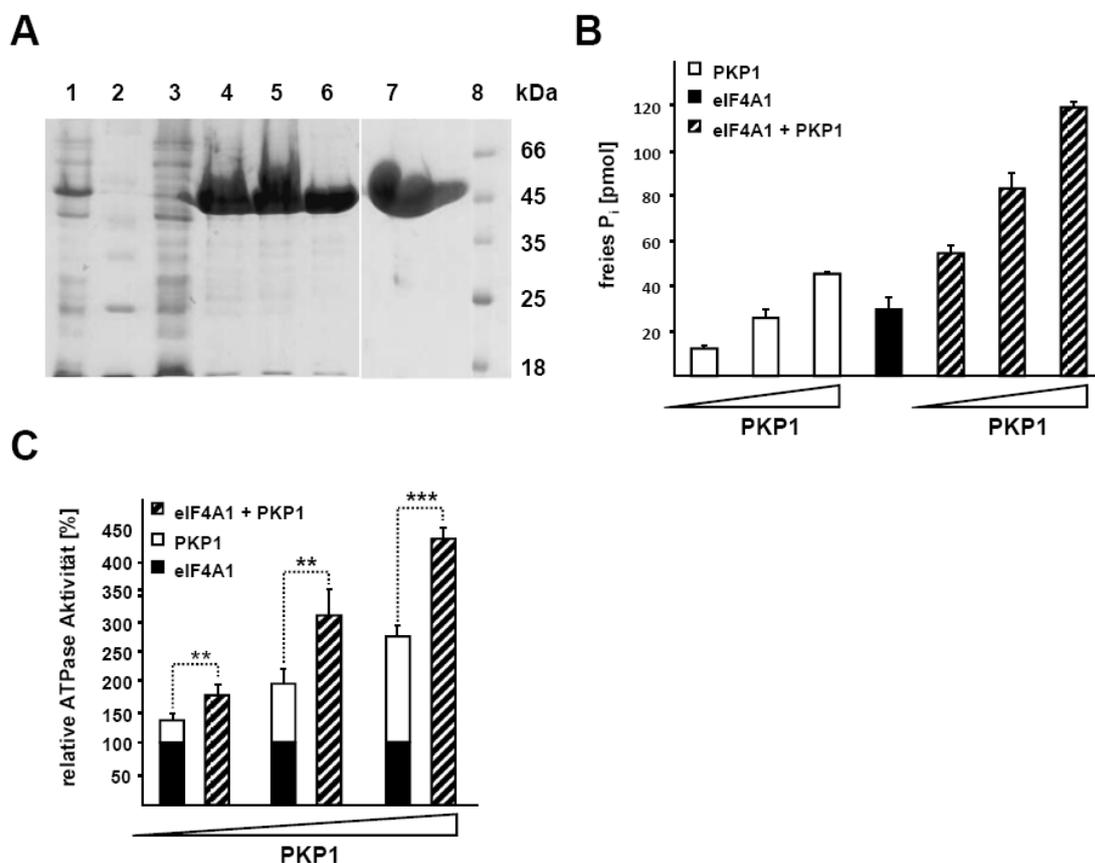


Abb. 3.17: Plakophilin1 stimuliert die RNA-abhängige ATPase Aktivität von eIF4A1. (A) Proteinaufreinigung von eIF4A1. EIF4A1 wurde im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) als His-tag-Fusionsprotein synthetisiert und über sukzessive Chromatographieschritte an Ni-NTA-Agarose und MonoQ zur Homogenität gereinigt. Die SDS-PAGE zeigt folgende Fraktionen: 1 input; 2 Marker; 3 Durchlauf Ni-NTA-Agarose; 4, 5, 6 Elutionsfraktionen von Ni-NTA-Agarose; 7 Elutionsfraktion MonoQ; 8 Marker. Das Molekulargewicht der Markerproteine (2, 7) ist rechts angegeben. (B, C) Plakophilin1 stimuliert die RNA-abhängige ATPase Aktivität von eIF4A1. Der ATPase Aktivitätstest wurde in Gegenwart von 500 μ M ATP, 1 μ g poly(A), 3 μ g eIF4A1 (konstant in allen Experimenten) und

unterschiedlichen Konzentration an Plakophilin1 (1 µg, 3 µg und 4 µg) durchgeführt. Alle Messwerte wurden in Bezug auf die spontane Hydrolyse von ATP korrigiert. **(B)** Effekt der ansteigenden Konzentrationen von Plakophilin1 auf die RNA-abhängige ATPase Aktivität von eIF4A1. **(C)** ATPase Aktivität von eIF4A1 + Plakophilin1 bezogen auf die Summe der Einzelaktivitäten von eIF4A1 und Plakophilin1. ATPase Aktivität von eIF4A1 wurde als 100% definiert. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. **, $p \geq 0.005$; ***, $p \geq 0.0005$.

3.1.6 Plakophilin1 und eIF4A1 beeinflussen die Proliferation und Zellgröße

Die Regulation der Translation ist mit der Regulation des Zellwachstums und der Zellgröße gekoppelt (Fingar *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000). Eine Deregulation der Translation ist somit ein wichtiger Mechanismus bei der Tumorentstehung. Es konnte gezeigt werden, dass Plakophilin1 die Translation reguliert und außerdem in verschiedenen Tumoren hochreguliert war (Cheung *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2007; Villaret *et al.*, 2000). Auf Basis dieser Ergebnisse wurde der Einfluss von Plakophilin1 und eIF4A1 auf das Zellwachstum untersucht. Nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 war eine Reduktion der Proteinmenge im Zelllysate aufgefallen (Abb. 3.18 A). Um die Reduktion der Proteinmenge genauer zu analysieren, wurde der Einfluss auf die Zellzahl nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 untersucht. Dazu wurden HaCaT Zellen mit spezifischen Plakophilin1-, eIF4A1- und Kontroll-siRNAs transfiziert. Die Quantifizierung der Zellzahl 72 h und 96 h nach Transfektion bestätigte eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.18 B). Diese Daten legen nahe, dass der *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 die Proliferation bzw. Zellviabilität beeinflusst. Um dieses zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten der HaCaT Zellen nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 im Kristallviolett *Assay* bestimmt. Abb. 3.18 C zeigt, dass das Zellwachstum 96 h nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 im Vergleich zu den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen reduziert war.

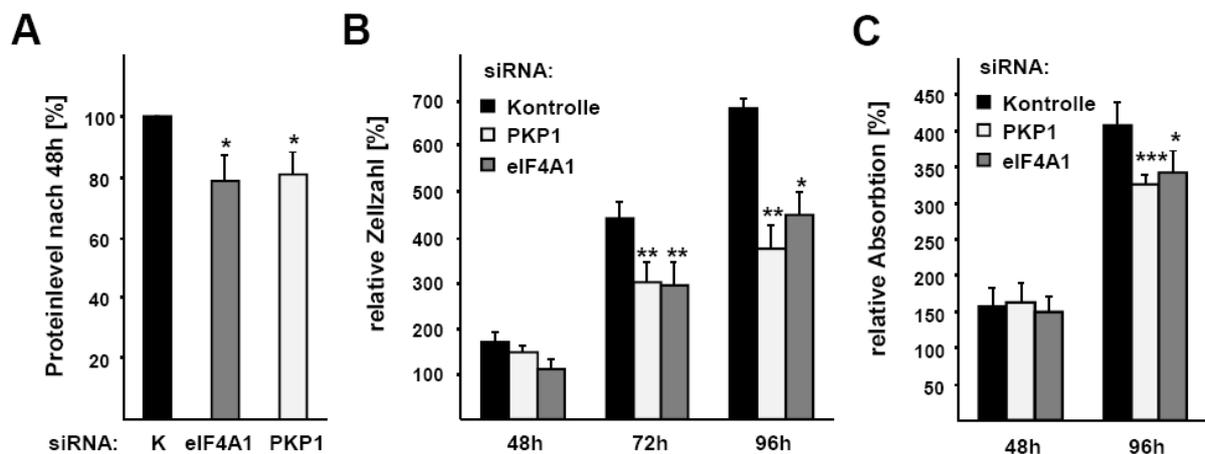


Abb. 3.18: Reduktion der Zellzahl und der Zellmasse nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1. HaCaT Zellen wurden mit spezifischen siRNAs gegen Plakophilin1, eIF4A1 und Kontroll-siRNAs transfiziert. **(A)** Nach 48 h konnte eine Reduktion der Proteinmenge für den *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 beobachtet werden. **(B, C)** Der Einfluss des *Knockdowns* von Plakophilin1 und eIF4A1 auf die Zellzahl **(B)** und Zellmasse **(C)** wurde nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h analysiert. Um Artefakte aufgrund unterschiedlich ausplattierter Zellen auszuschließen, wurden die 24 h Werte auf 100% gesetzt. **(B)** Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärben mit Trypanblau bestimmt. **(C)** Die Zellmasse wurde über den Kristallviolett Assay bei einer Absorption von 550 nm photometrisch bestimmt. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. *, $p \geq 0.05$; **, $p \geq 0.005$; ***, $p \geq 0.0005$.

Die Reduktion der Zellzahl könnte zum einen aus einer verringerten Proliferationsrate oder zum anderen aus einer erhöhten Apoptoserate resultieren. Um dieses zu überprüfen, wurden zu verschiedenen Zeiten (24 h, 48 h, 72 h und 96 h) nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 die proliferierenden Zellen durch den Einbau des Thymidinanalogs BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) markiert. Mit Hilfe eines Peroxidase-konjugierten BrdU-Antikörpers konnte der BrdU-Einbau kolorimetrisch quantifiziert werden. Als Negativ-Kontrolle wurden systembedingte Hintergrundwerte (Zellen ohne BrdU-Zugabe) von den Werten der BrdU markierten Zellen abgezogen. Um auszuschließen, dass leichte Unterschiede beim Aussäen der Zellen das Ergebnis verfälschen, wurde 24 h nach Transfektion die Absorption für alle Zellen gleich gesetzt. Abb. 3.19 A zeigt, dass nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 ein ähnlicher reduzierender Effekt auf die Replikationsrate beobachtet werden konnte, wie schon zuvor für die Zellzahl beschrieben wurde. Somit liegt es nahe, dass die Reduktion der Zellzahl aus einem Proliferationseffekt resultiert. Um dieses zu bestätigen wurde mittels eines *Caspase 3/7 Assays* die Apoptoserate nach *Knockdown* von Plakophilin1, eIF4A1 und Kontrolle bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von Plakophilin1 die Apoptose leicht reduziert und der *Knockdown* von eIF4A1 keinen signifikanten bzw. einen

geringfügig stimulierenden Einfluss auf die Apoptose hatte (Abb. 3.19 B). Dies zeigt, dass der *Knockdown* von Plakophilin1 nicht über eine Stimulation der Apoptose zu verringerter Zellzahl führt sondern über eine Reduktion der Proliferation.

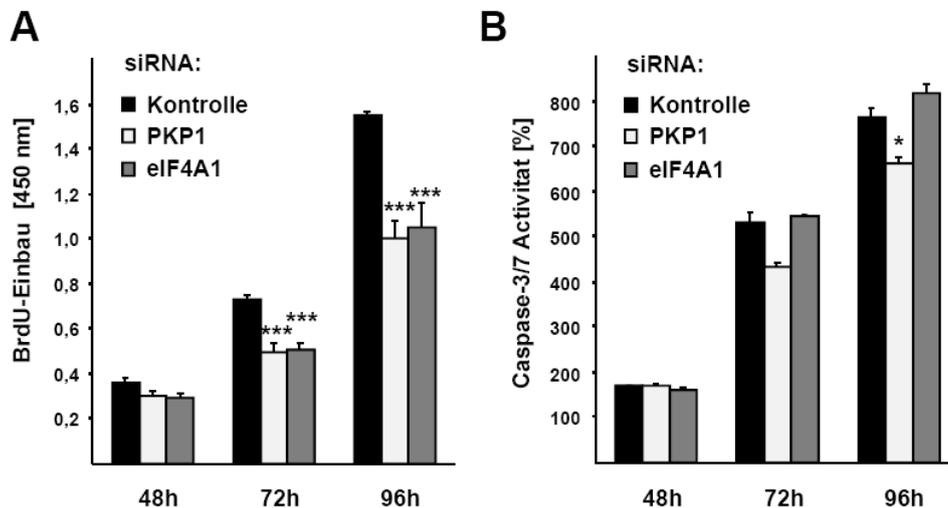


Abb. 3.19: Reduktion der Proliferation nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1. HaCaT Zellen wurden mit spezifischen Plakophilin1-, eIF4A1- und Kontroll-siRNAs transfiziert. Der Einfluss des *Knockdowns* von Plakophilin1 und eIF4A1 auf die Proliferation (A) und Apoptose (B) wurde nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h analysiert. Um leichte Unterschiede beim Aussäen der Zellen zu korrigieren, wurden für alle Quantifizierungen die 24 h Werte auf eine einheitliche OD bzw. 100% gesetzt. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. *, $p \geq 0.05$; ***, $p \geq 0.0005$.

Um zu zeigen, dass die Plakophilin1 RNAi-vermittelte Reduktion der Zellzahl und der Proliferation spezifisch ist, wurden die Experimente mit einer zweiten Plakophilin1 siRNA wiederholt. Auch mit dieser siRNA (PKP1 #2) wurde nach 48 h in HaCaT Zellen eine Reduktion der Plakophilin1 Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle detektiert, obwohl die bisher verwendete Plakophilin1-siRNA einen stärkeren Effekt zeigte (Abb. 3.20 A). Quantifizierung der Proliferation und der Zellzahl nach *Knockdown* von Plakophilin1 zeigten für beide Plakophilin1-siRNAs einen ähnlich starken Effekt (Abb. 3.20 B, C). Diese Daten verdeutlichen, dass Plakophilin1 spezifisch die Proliferation und Zellzahl beeinflusst.

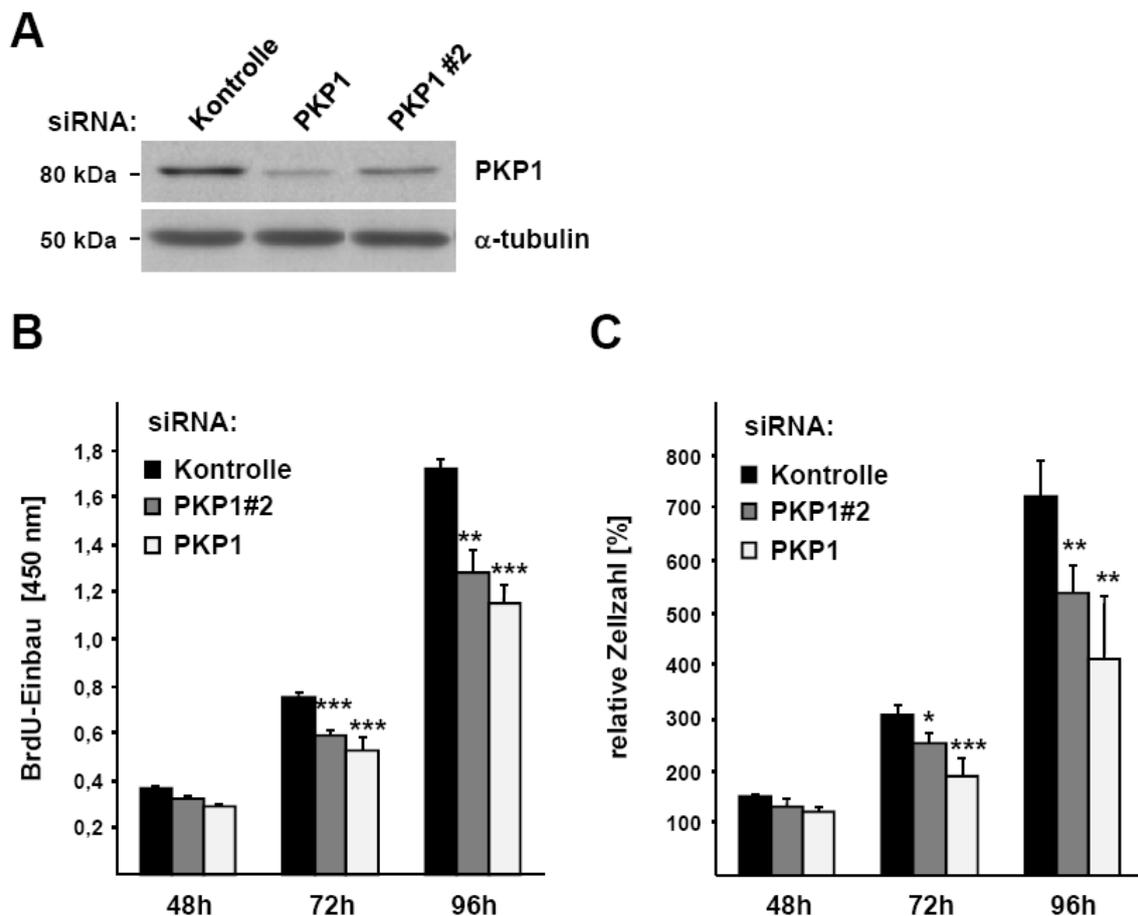


Abb. 3.20: Reduktion der Zellzahl und Proliferation nach *Knockdown* von Plakophilin1. HaCaT Zellen wurden mit zwei spezifischen siRNAs gegen Plakophilin1 und Kontroll-siRNAs transfiziert. (A) Die *Knockdown*-Effizienz wurde nach 48h mittels Western Blot überprüft. 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach *Knockdown* wurde die Proliferation (B) und Zellzahl (C) analysiert. Die 24 h Werte dienten der Normalisierung. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. *, $p \geq 0.05$; **, $p \geq 0.005$; ***, $p \geq 0.0005$.

Da die Regulation der Translation auch die Zellgröße beeinflusst (Fingar *et al.*, 2002), sollte dieses nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 analysiert werden. HaCaT Zellen wurden mit spezifischen siRNAs gegen Plakophilin1, eIF4A1 und Kontroll-siRNA transfiziert und nach 96 h gegen E-Cadherin gefärbt. E-Cadherin ist ein Membranprotein in *Adherens Junctions* und diente zur Darstellung der Zellmembran. Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass sowohl für Plakophilin1- als auch eIF4A1-siRNA transfizierte Zellen eine kleinere Zellgröße im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet werden konnte (Abb. 3.21 A). Nach Quantifizierung der Zellgröße mit der Software Lucia G/F Version 4.71, wurde nach *Knockdown* von Plakophilin1 und von eIF4A1 eine vergleichbare, statistisch signifikante

Reduktion der Zellgröße um ca. 20% detektiert (Abb. 3.21 B). Diese Daten belegen, dass Plakophilin1 und eIF4A1 das Zellwachstum regulieren.

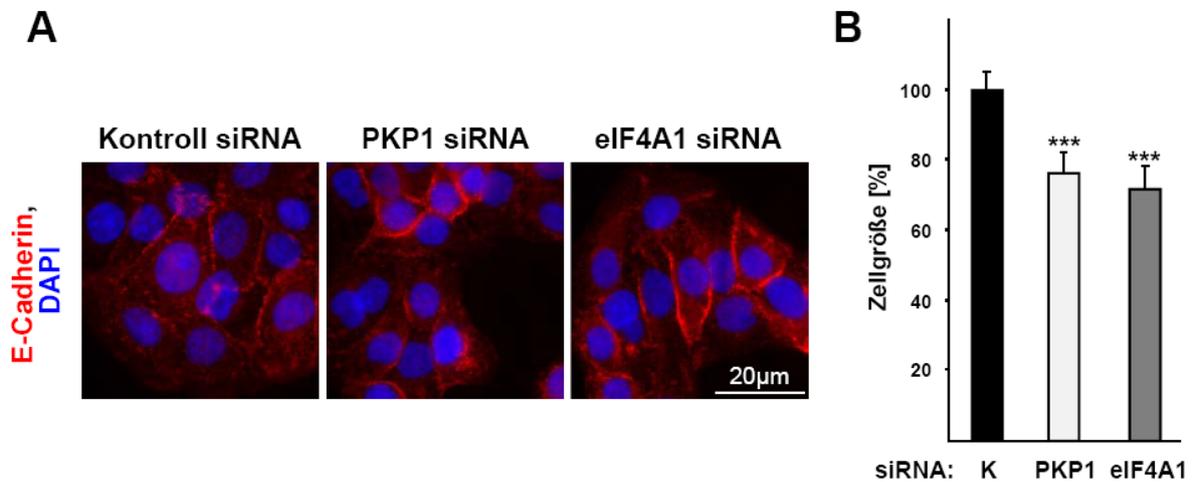


Abb. 3.21: Reduktion der Zellgröße nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1. (A) HaCaT Zellen wurden mit Plakophilin1-, eIF4A1- und Kontroll-siRNAs transfiziert. 96 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und gegen E-Cadherin gefärbt. (B) Quantifizierung der Zellgröße nach *Knockdown* von Plakophilin1 und eIF4A1 im Vergleich zur Kontrollpopulation (n=100). Die Zellgröße von Plakophilin1- und eIF4A1-siRNA transfizierten Zellen ist statistisch signifikant reduziert. K = Kontrolle, PKP1 = Plakophilin1. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Transfektionen. ***, $p \geq 0.0005$.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Plakophilin1 und eIF4A1 die Translation beeinflussen und daraus resultierend, die Proliferation und Zellgröße regulieren. Der Einfluss von Plakophilin1 auf die Translation wird vermutlich über eIF4A1 reguliert, da Plakophilin1 die enzymatische Aktivität von eIF4A1 stimulierte.

3.2 Funktion des p0071 im Zytoplasma

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die zytoplasmatische Funktion des p0071 charakterisiert. Basis für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen waren folgende Beobachtungen: (1) p0071 lokalisierte in der Zytokinese am Zentralkörper. (2) Die Überexpression von p0071 induzierte einen Mitosedefekt und führte zu Mehrkernigkeit.

3.2.1 Lokalisation von p0071 in der Mitose

Aufgrund erster Beobachtungen zu einer Mitose-spezifischen Lokalisation von p0071 wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation während der verschiedenen Mitosestadien analysiert. MCF-7 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 24 h mit Antikörpern gegen p0071 und α -Tubulin gefärbt. Dabei zeigte sich, dass p0071 mit α -Tubulin an den Zentrosomen in der Interphase und den Spindelpolen während der Metaphase kolokalisierten. In der Anaphase, während der Chromosomen Trennung, wurde p0071 zum zentralen Mikrotubulibündel rekrutiert und akkumulierte am Zentralkörper während der Zytokinese (Abb. 3.22).

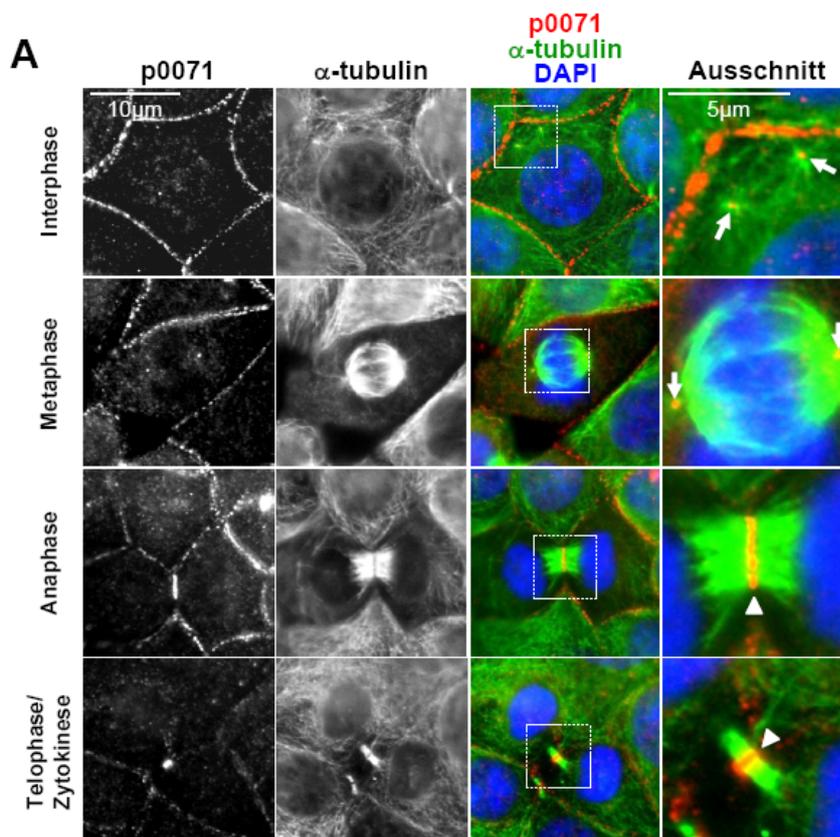


Abb. 3.22: Lokalisation von endogenem p0071 in der Mitose und Zytokinese. (A) MCF-7 Zellen wurden mit Antikörpern gegen p0071 und α -Tubulin gefärbt. In der Interphase und Metaphase lokalisiert p0071 vorwiegend an der Membran und kolokalisiert mit α -Tubulin an den Zentrosomen und Spindelpolen (siehe Pfeile). In der Anaphase lokalisiert p0071 an der Teilungsfurche und akkumuliert am Zentralkörper während der Zytokinese (siehe Pfeilspitze).

Zur Bestätigung der spezifischen Lokalisation von endogenem p0071 an den Zentrosomen, Spindelpolen und Zentralkörper während der Zellteilung wurde zusätzlich die subzelluläre Verteilung von überexprimierten p0071-DsRed in MCF-7 Zellen untersucht. Hier wurde ebenfalls eine Kolo­kalisierung von p0071-DsRed mit α -Tubulin an den Zentrosomen und an den Spindelpolen beobachtet (Wolf *et al.*, 2006). Die Zentrosomen und die zentrale Spindel sind wichtige Kontrollpunkte in der Zytokinese, und für viele Proteine, die an der Regulierung der Zellteilung beteiligt sind, wurde eine Lokalisation an diesen Stellen bzw. am Zentralkörper beschrieben (Glotzer, 2001). Diese Daten deuten darauf hin, dass p0071 an der Regulation der Zytokinese beteiligt sein könnte.

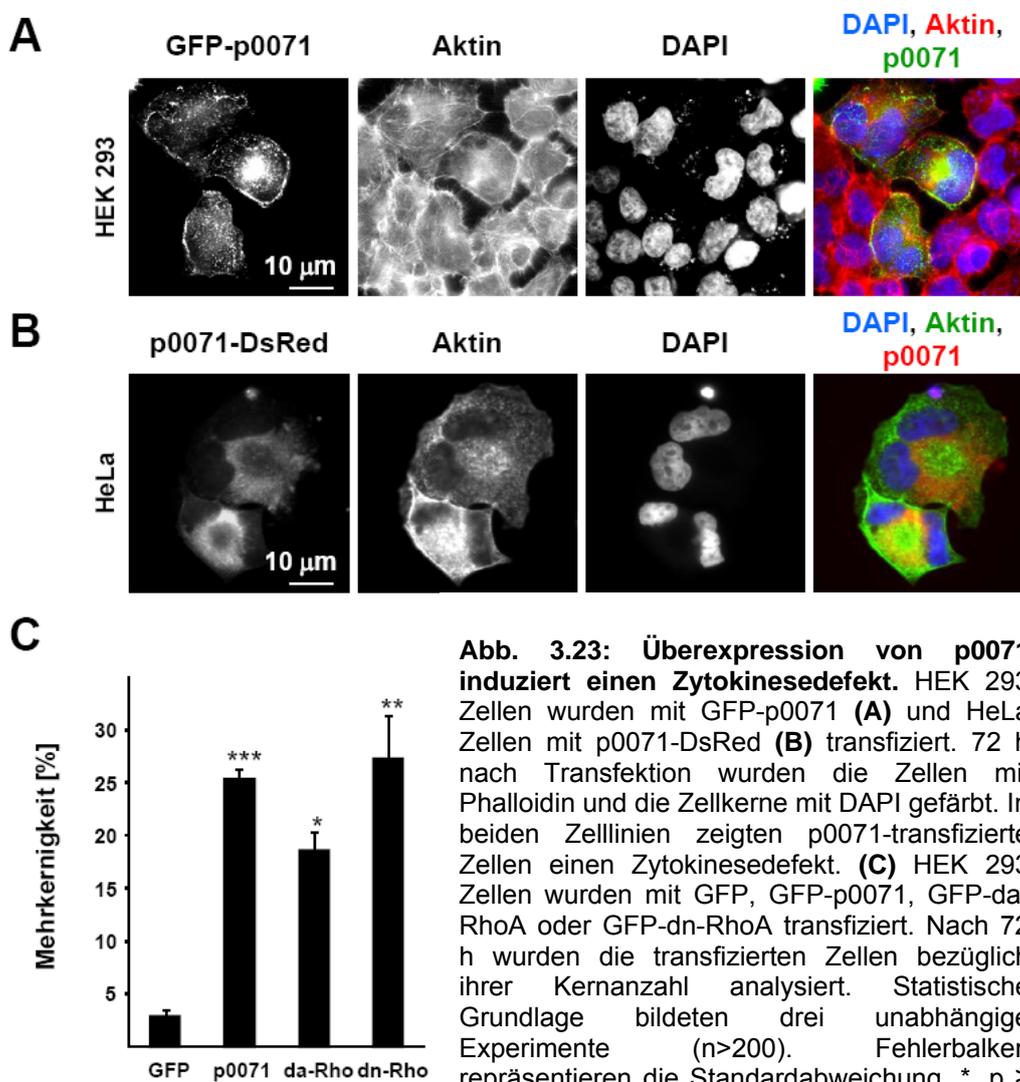
3.2.2 Funktion von p0071 im Rho-Signalweg

Die Zytokinese wird durch verschiedene regulatorische Proteine beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die kleine Rho-GTPase RhoA die Entstehung des Aktomyosinringes moduliert und eine lokale Aktivierung von RhoA über Ect2, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF), für die Kontraktion des Ringes benötigt wird (Drechsel *et al.*, 1997; O'Connell *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2000; Glotzer *et al.*, 2001). Für viele Proteine, welche die Zytokinese beeinflussen, ist bekannt, dass *Knockdown* oder funktionsinhibierende Mutationen zu Defekten in der Zellteilung führen, die sich oft in Mehrkernigkeit oder gestörter Trennung der Chromosomen äußern (Glotzer, 2001). Um weitere Anhaltspunkte für die Funktion von p0071 in der Mitose/Zytokinese zu erhalten wurde der p0071-Phänotyp nach Überexpression und *Knockdown* analysiert.

3.2.2.1 Ektopische Expression von p0071 induziert einen Zytokinesedefekt

HEK 293 und HeLa Zellen wurden mit GFP-p0071 und p0071-DsRed transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, F-Aktin mittels Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Nach Überexpression von p0071 wurde in beiden Zelllinien eine Störung in der Zellteilung und daraus resultierende Mehrkernigkeit beobachtet (Abb. 3.23 A, B). Es ist bekannt, dass Zytokinesedefekte durch eine Dere­gulation der RhoA-Aktivität induziert werden können. Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Expression von p0071 einen ähnlich starken Zytokinesedefekt im Vergleich zur dominant aktiven (da) und dominant negativen (dn) RhoA-Mutante zeigt, wurden HEK 293 Zellen mit dem entsprechenden GFP-Konstrukt

transfiziert. Nach 72 h wurden die transfizierten Zellen auf ihre Anzahl an Kernen analysiert. Im Vergleich zur Kontrolle konnte sowohl nach Überexpression von p0071, als auch nach Expression der RhoA-Mutanten eine signifikante Erhöhung von mehrkernigen Zellen detektiert werden (Abb. 3.23 C). Dabei zeigte exogenes p0071 und die dn-RhoA-Mutante eine etwa gleich starke Störung in der Zytokinese, welche sich in ca. 25% Mehrkernigkeit nach 72 h widerspiegelte. Diese Daten zeigen, dass die ektopische Expression von p0071 einen Zytokinesedefekt induziert und somit p0071 eine essentielle Funktion in der Zellteilung hat.



3.2.2.2 Knockdown von p0071 induziert einen Zytokinesedefekt

Es ist bekannt, dass Proteine, die eine essentielle Funktion in der Zytokinese haben, infolge einer Verschiebung der endogenen Proteinmenge, mittels Überexpression oder *Knockdown*, Zytokinesedefekte induzieren können. Um den p0071-Phänotyp nach *Knockdown* zu analysieren, wurde dieser zunächst in HEK 293 Zellen etabliert. Dazu wurden zwei p0071 spezifische *short hairpin* RNAs (shRNA #4 und #6), basierend auf einer 21mer langen Sequenz, und eine 30mer siRNA, basierend auf der shRNA #6 Sequenz, verwendet. HEK 293 wurden mit den p0071 spezifischen shRNAs in Kombination bzw. einzeln und einer spezifischen 30mer siRNA transfiziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische shRNA und eine 30mer GFP-siRNA verwendet. 72 h nach Transfektion wurde die *Knockdown* Effizienz von p0071 sowohl auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR als auch auf Protein-Ebene mittels Western Blot Analyse von Zelllysaten analysiert. Abb. 3.24 A zeigt eine signifikante Reduktion der p0071 mRNA auf ca. 60% für die p0071 shRNAs und für die 30mer p0071-siRNA eine Reduktion auf ca. 50%. Mittels Western Blot Analyse konnte eine Reduktion der p0071 Proteinmenge für alle p0071 shRNA-Konstrukte und siRNA detektiert werden (Abb. 3.24 B).

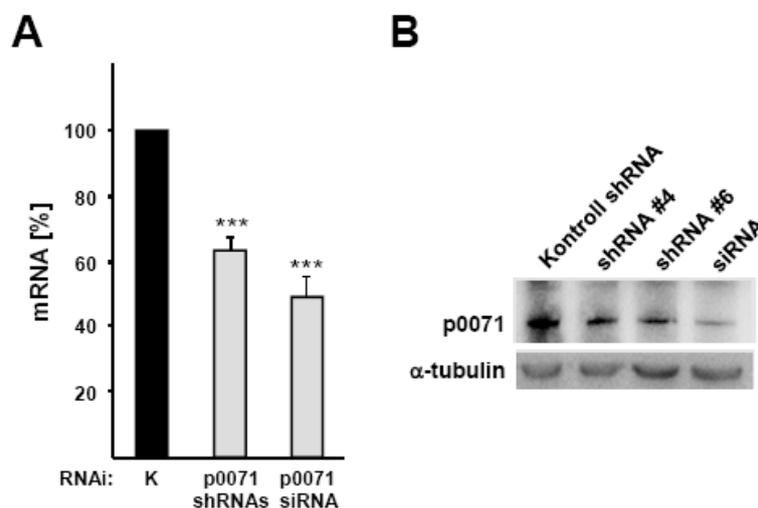


Abb. 3.24: Reduktion der endogenen p0071-Menge in HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden mit p0071 spezifischen shRNAs, einer 30mer siRNA sowie einer Kontroll-shRNA und -siRNA transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde die Menge an endogener p0071 mRNA und endogenem Protein analysiert. **(A)** Quantifizierung der mRNA mittels qRT-PCR. Der cDNA-Input der verschiedenen Proben wurde auf Cyclophilin A und RPLP0 normalisiert. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 6 unabhängigen Experimenten. ***, $p \geq 0.0005$. **(B)** Western Blot Analyse gegen p0071 und α -Tubulin als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen, ob der *Knockdown* von p0071 Defekte in der Zellteilung induziert, wurde endogenes p0071 in HEK 293 Zellen mittels RNAi reduziert. Als Transfektionskontrolle diente das RFP, welches mit dem shRNAs bzw. der siRNA kotransfiziert wurde. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert, Aktin gefärbt und die Zellkerne mit DAPI markiert. Auch nach *Knockdown* von p0071 konnte eine signifikante Erhöhung an mehrkernigen Zellen detektiert werden (Abb. 3.25 A, B). Dabei zeigte die p0071 siRNA einen stärkeren Zellteilungsdefekt im Vergleich zu p0071 shRNA transfizierten Zellen, was vermutlich auf eine höhere *Knockdown* Effizienz zurückzuführen war (Abb. 3.24, Abb. 3.25 B). Die Ausbildung von mehrkernigen Zellen nach *Knockdown* von p0071 ähnelt dem bereits beschriebenen Zytokinesedefekt nach Überexpression von p0071 und der dn-RhoA-Mutante, welche ca. 25% Mehrkernigkeit zeigten (Abb. 3.23 C).

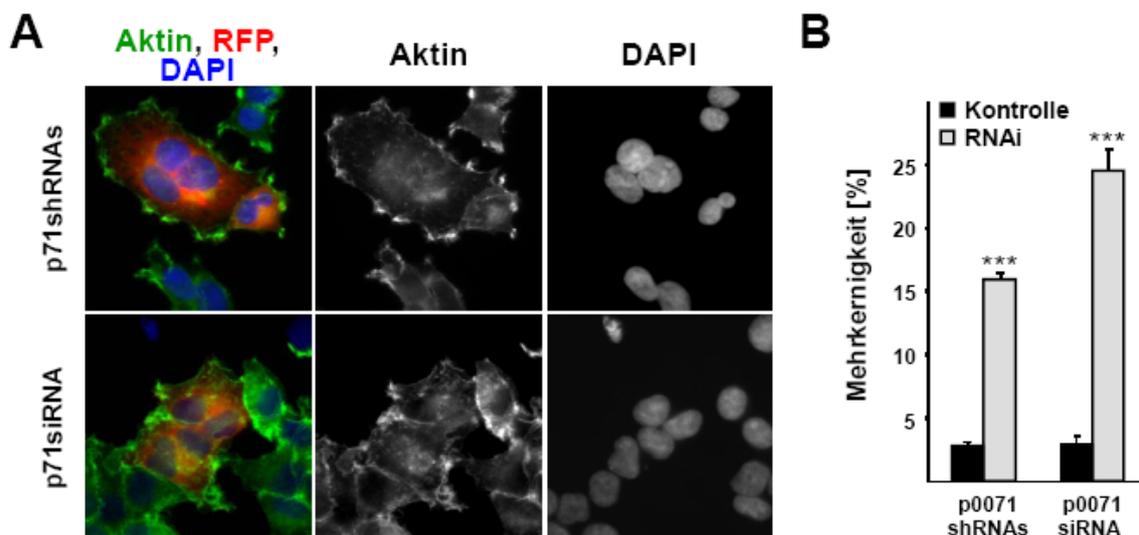


Abb. 3.25: Knockdown von p0071 induziert einen Zytokinesedefekt. (A, B) HEK 293 Zellen wurden mit p0071 spezifischen shRNAs bzw. siRNAs und RFP, als Transfektionskontrolle kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Phalloidin-FITC und die Kerne mit DAPI gefärbt. (A) *Knockdown* von p0071 induziert die Entstehung mehrkerniger Zellen. (B) Statistische Auswertung transfizierter HEK 293 Zellen bezüglich ihrer Kernanzahl (n>100). Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten. ***, p ≥ 0.0005.

3.2.2.3 Spezifitätskontrolle des RNAi-vermittelten Phänotyps

Um zu zeigen, dass der RNAi-vermittelte Phänotyp spezifisch und kein Artefakt aufgrund von Mismatch-Paarung ist, wurden *Rescue*-Experimente durchgeführt (Echeverri and Perrimon, 2006; Hannon and Rossi, 2004; 2003). Ziel dieses Versuches war die

Aufhebung des p0071 *Knockdown*-Phänotyps durch Überexpression eines homologen RNAi-resistenten Konstrukts. Um dieses zu analysieren, wurde Maus p0071 cDNA amplifiziert und als GFP-Fusionsprotein mit der humanen p0071 shRNA #4 in HEK 293 Zellen kotransfiziert. Nach 72 h wurde mittels qRT-PCR die Menge an humaner und Maus p0071 mRNA quantifiziert. Abb. 3.26 A zeigt, dass das Maus-p0071-Konstrukt *Knockdown*-resistent war und nur die humane p0071 mRNA reduziert wurde. Auf Basis dieser Daten wurden parallel zum eigentlichen RNAi-Ansatz Titrationsanalysen mit dem Maus-p0071-Konstrukt in HEK 293 Zellen durchgeführt und 72 h nach Transfektion die Anzahl mehrkerniger Zellen bestimmt. In der Tat konnte nach Maus-p0071-Überexpression der *Knockdown*-Phänotyp stark reduziert werden, jedoch wurde dieser, im Vergleich zur Kontrolle, nicht komplett behoben (Abb. 3.26 B). Ein Grund ist vermutlich, dass die ektopische Expression von p0071 ebenso einen Zytokinesedefekt induziert und die Störung des endogenen Gleichgewichts mit der Bildung von mehrkernigen Zellen einhergeht. Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass der RNAi-vermittelte Phänotyp spezifisch ist und somit p0071 eine essentielle Funktion in der Mitose/Zytokinese hat.

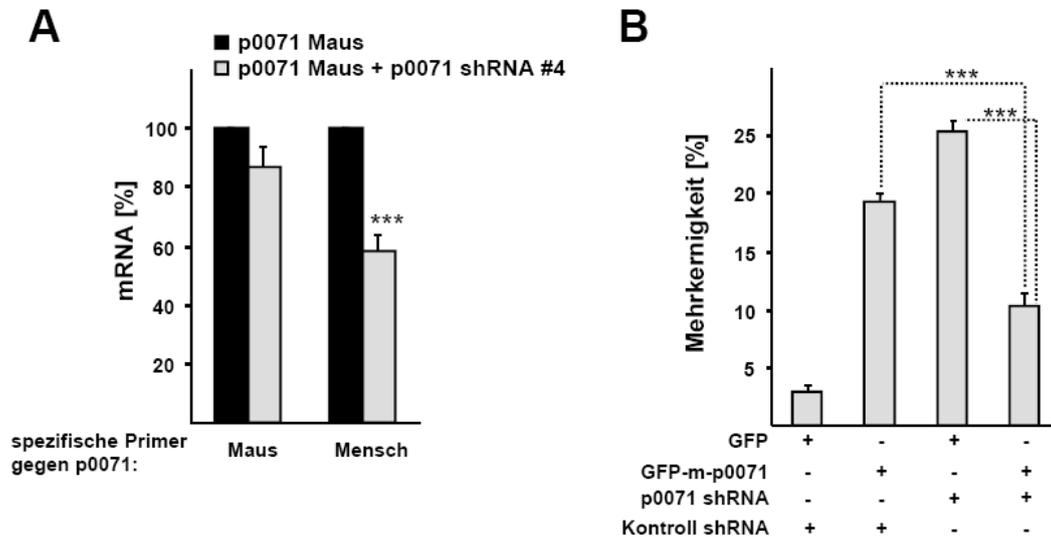
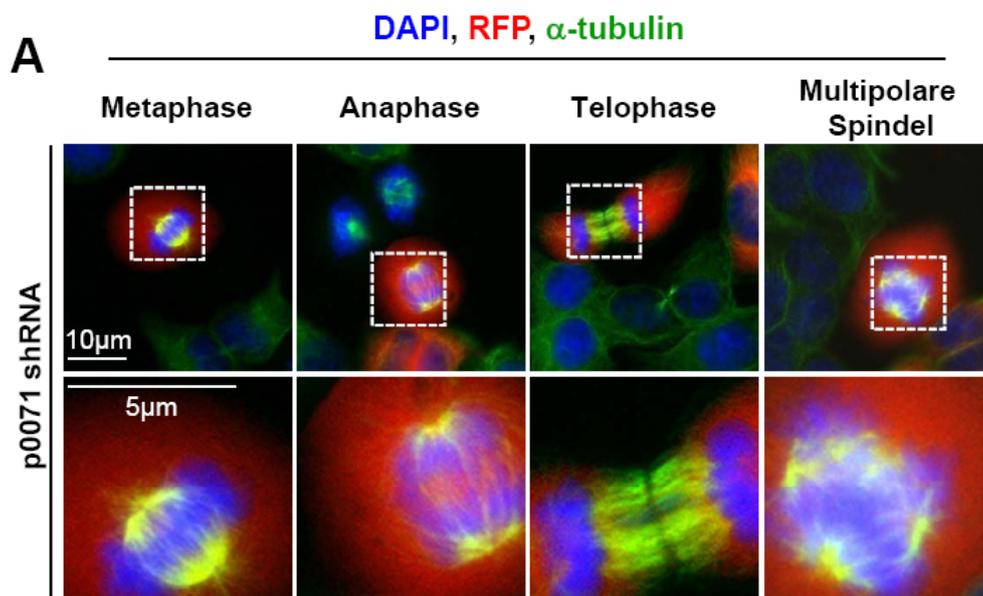


Abb. 3.26: Spezifitätskontrolle des RNAi-vermittelten Phänotyps. (A) HEK 293 Zellen wurden mit GFP-Maus-p0071 bzw. in Kombination mit der p0071 shRNA #4 transfiziert. Nach 72 h wurde die Menge an endogener p0071 mRNA und Maus p0071 mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Cyclophilin A und RPLP0 dienten als Normalisierungskontrollen. Das Maus-p0071-Konstrukt ist RNAi-resistent. (B) Mehrkernigkeit, resultierend durch *Knockdown* von p0071, wird durch Überexpression von GFP-Maus-p0071 vermindert. HEK 293 Zellen wurden mit den aufgelisteten Expressionsplasmiden transfiziert und nach 72 h auf Mehrkernigkeit analysiert (n>100). Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten. ***, p ≥ 0.0005.

Um Hinweise darüber zu erhalten, wie und in welchem Stadium der *Knockdown* von p0071 die Zellteilung beeinflusst und die Generierung von mehrkernigen Zellen induziert, wurden die einzelnen Mitosestadien näher analysiert. HEK 293 Zellen wurden mit p0071 spezifischen shRNAs und RFP als Transfektionskontrolle kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen in der frühen S-Phase mittels Doppel-Thymidin-Block synchronisiert und 72 h bzw. 96 h nach Transfektion mit anti- α -Tubulin gefärbt. In den RFP transfizierten Zellen konnten keine offensichtlichen Veränderungen während der Metaphase, Anaphase und Telophase beobachtet werden (Abb. 3.27 A). Jedoch konnte nach 72 h in ca. 4% und nach 96 h in ca. 17% RFP transfizierter Zellen multipolare Spindelpole detektiert werden (Abb. 3.27 A und C). Quantifizierung der Anzahl der Zellkerne nach 72 h und 96 h zeigte, dass die Entstehung von multipolaren Spindeln kein direkter Effekt, sondern ein Resultat mehrkerniger Zellen ist (Abb. 3.27 B und C). Diese Daten legen nahe, dass der *Knockdown* von p0071 die Zellteilung zu einem späteren Zeitpunkt, vermutlich während der Zytokinese, beeinflusst.



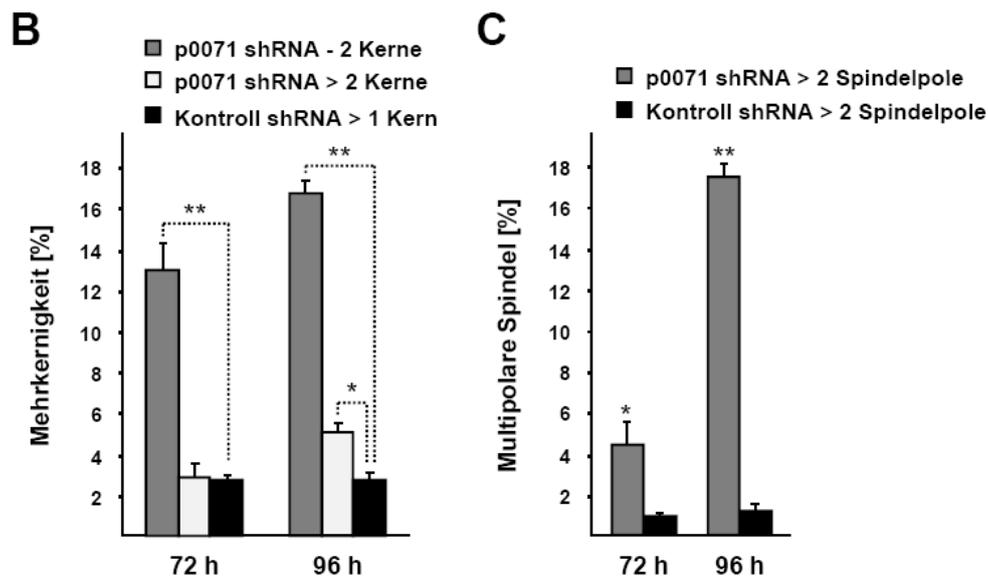


Abb. 3.27: Analyse der Mitosestadien nach *Knockdown* von p0071. HEK 293 Zellen wurden mit p0071 spezifischen shRNAs und RFP als Transfektionskontrolle kotransfiziert und mittels Doppel-Thymidin-Block synchronisiert. Nach 72 h und 96 h wurden die Zellen mit anti- α -Tubulin und die Kerne mit DAPI gefärbt. **(A)** Analyse der Mitosestadien nach 72 h. *Knockdown* von p0071 zeigt keine offensichtlichen Defekte während der Mitose. Zu einigem geringfügigen Anteil konnten Multipolare-Spindel beobachtet werden. **(B und C)** Quantifizierung der Mehrkernigkeit und Multipolare-Spindel 72 h und 96 h nach Transfektion ($n > 200$). Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. *, $p \geq 0.05$; **, $p \geq 0.005$.

3.2.2.4 *Knockdown* von p0071 hemmt die Akkumulation von Aktin am kontraktilem Ring

Ein entscheidender Schritt während der Zytokinese ist die Bildung des kontraktilem Ringes. Der kontraktile Ring ist ein dynamisches Gebilde aus Aktin und Myosin II Filamenten und ist essentiell für die Zellabschnürung. Unterbleibt die Ausbildung des kontraktilem Ringes, findet die Zellabschnürung nicht statt und der Zellzyklus endet mit der Bildung mehrkerniger Zellen. Um zu untersuchen, ob p0071 möglicherweise die Bildung des kontraktilem Ringes beeinflusst, wurde das Aktin-Zytoskelett nach *Knockdown* von p0071 im Vergleich zu einer Kontrollpopulation untersucht. Abb. 3.28 verdeutlicht, dass bedeutend weniger Aktinfilamente nach p0071 *Knockdown* am kontraktilem Ring detektiert wurden. Daher lag die Vermutung nahe, dass p0071 an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts während der Zytokinese beteiligt sein könnte. Es ist bekannt, dass RhoA die Entstehung des Aktomyosinringes moduliert und die lokale Aktivierung von RhoA für die Kontraktion des Ringes benötigt wird (Drechsel *et al.*, 1997; Glotzer, 2001; O'Connell *et al.*, 1999). Demnach ist RhoA ein potentieller Kandidat, auf den p0071 Einfluss haben könnte.

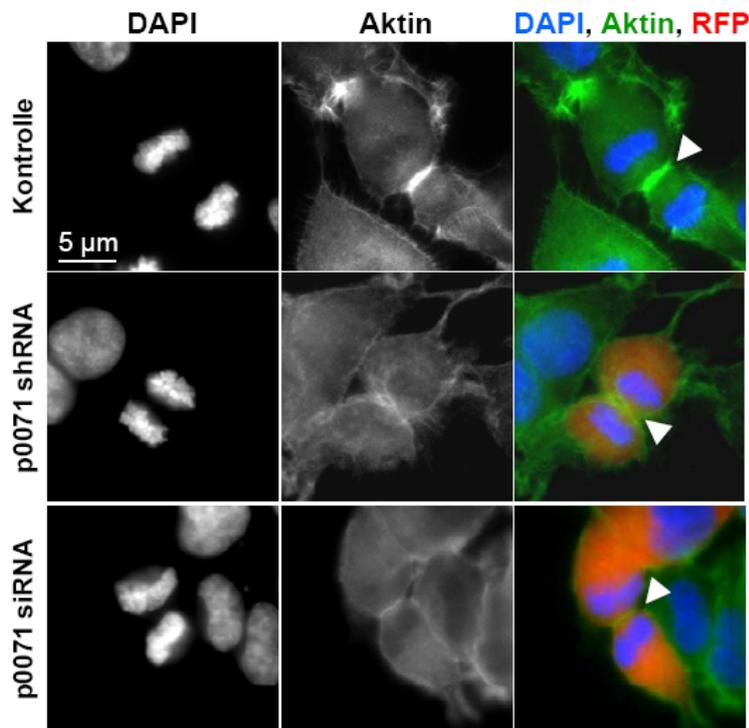


Abb. 3.28: Verminderte Aktin-Akkumulation am kontraktilen Ring nach *Knockdown* von p0071. HEK 293 Zellen wurden mit p0071 spezifischen shRNAs bzw. siRNAs und RFP als Transfektionskontrolle kotransfiziert und mittels Doppel-Thymidin-Block synchronisiert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen gegen F-Aktin mit Phalloidin-FITC gefärbt und die Kerne mit DAPI markiert. Pfeile zeigen die Akkumulation von Aktin am kontraktilen Ring während der Telophase.

3.2.2.5 p0071 beeinflusst die RhoA-Aktivität

Um zu untersuchen, ob p0071 die RhoA-Aktivität beeinflusst, wurden Komplementationsexperimente nach *Knockdown* von p0071 und Überexpression von da-RhoA, dn-RhoA oder wt-RhoA in HEK 293 Zellen durchgeführt. Interessanterweise wurde der Zytokinesedefekt 72 h nach *Knockdown* von p0071 durch überexprimiertes da-RhoA signifikant reduziert (von ca. 25% auf ca. 15%), wohingegen überexprimiertes dn-RhoA einen entgegengesetzten Effekt (von ca. 25% auf ca. 45%) zeigte. Die Mehrkernigkeit nach Überexpression von wt-RhoA war signifikant reduziert (Abb. 3.29 A).

Als Kontrolle für die beobachteten Effekte wurde zusätzlich der Einfluss von da-RhoA, dn-RhoA und wt-RhoA nach *Knockdown* von Ect2 untersucht. Ect2 ist ein GEF-Protein, welches den Austausch von gebundenem GDP zu GTP für RhoA, Rac1 und Cdc42 katalysiert (Tatsumoto *et al.*, 1999). Für die *Knockdown* Analysen von Ect2 wurde die von Kim und Kollegen publizierte Ect2 siRNA verwendet (Kim *et al.*, 2005). Der Ect2 *Knockdown* in HEK 293 Zellen resultierte nach 48 h in einer Reduktion der Ect2 mRNA auf ca. 35% (Abb. 3.29 C) und der Induktion von ca. 45% mehrkernigen Zellen (Abb. 3.29 D). Im Vergleich zum

p0071 *Knockdown*, welcher ca. 25% Mehrkernigkeit nach 48 h zeigte, war der Zytokinesedefekt nach *Knockdown* von Ect2 fast doppelt so hoch (Abb. 3.29 D).

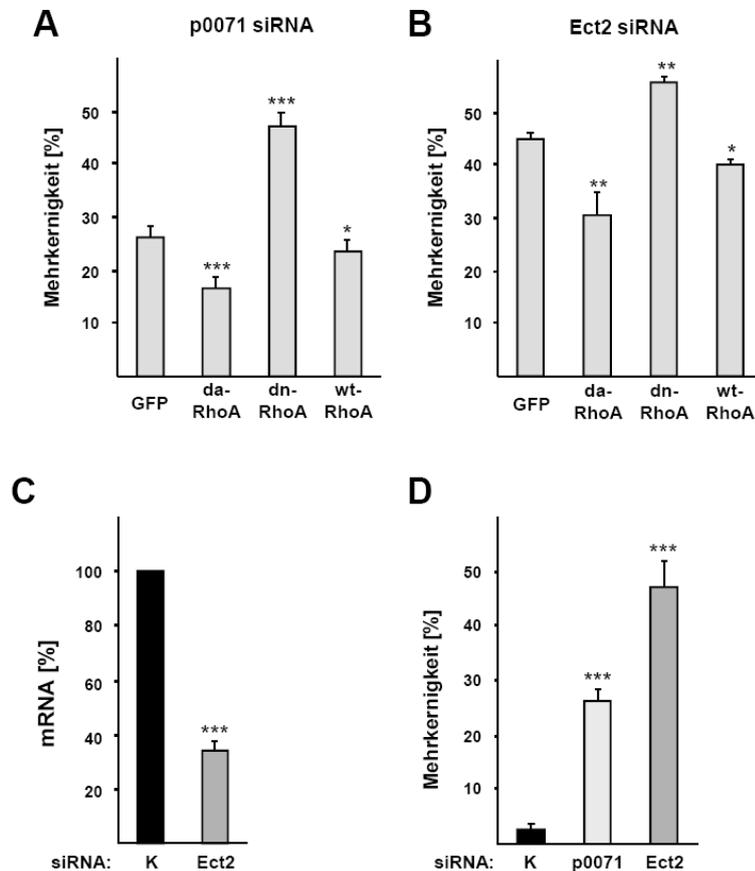


Abb. 3.29: *Knockdown* von p0071 und Ect2 reduzieren RhoA-Aktivität. (A und B) HEK 293 Zellen wurden mit p0071 (A) bzw. Ect2 (B) spezifischen siRNAs und GFP (Kontrolle), GFP-da-RhoA, GFP-dn-RhoA oder GFP-wt-RhoA kotransfiziert. Nach 48 h (für Ect2) bzw. 72 h (für p0071) wurde die Anzahl an mehrkernigen Zellen bestimmt. Überexpression von GFP-da-RhoA reduziert den p0071-siRNA und Ect2-siRNA vermittelten Zytokinesedefekt. (C) Quantifizierung der RNA mittels qRT-PCR, 48 h nach Transfektion von Ect2 spezifischen und Kontroll-siRNAs. Cyclophilin A und RPLP0 dienten der Normalisierung. (D) Statistische Auswertung p0071-, Ect2- und Kontroll-siRNA transfizierter HEK 293 Zellen bezüglich ihrer Kernanzahl nach 48 h (n>100). Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. *, p ≥ 0.05; **, p ≥ 0.005; ***, p ≥ 0.0005.

Um den Einfluss von da-RhoA, dn-RhoA und wt-RhoA nach *Knockdown* von Ect2 zu untersuchen, wurden HEK 293 Zellen mit Ect2-siRNA und den verschiedenen GFP-RhoA-Varianten kotransfiziert. Da Ect2 als GEF für RhoA fungiert, würde man erwarten, dass der Zytokinesedefekt nach Überexpression von da-RhoA reduziert und dn-RhoA erhöht werden kann. Diese Vermutungen konnten mittels Quantifizierung der mehrkernigen Zellen 48 h nach Transfektion bestätigt werden (Abb. 3.29 B). Die Daten belegen, dass neben dem bereits bekannten Ect2 auch p0071 die RhoA-Aktivität während der Mitose reguliert. Die Verminderung der Mehrkernigkeit nach Überexpression von da-RhoA weist darauf hin, dass der *Knockdown* von p0071 und Ect2 die RhoA-Aktivität hemmt. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde ein GST-rhotekin pull-down *Assay* durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Komplementationsexperimenten konnte Dipl. Biol. René Keil zeigen, dass der

Knockdown von p0071 die RhoA-Aktivität inhibiert und die Überexpression von p0071 die RhoA-Aktivität stimuliert (Daten nicht gezeigt, (Wolf *et al.*, 2006). Zusammenfassend demonstrieren die Daten eindeutig, dass p0071 die RhoA-Aktivität moduliert und daraus folgend einen Zytokinesedefekt induziert.

3.2.2.6 p0071 interagiert mit RhoA

Um Hinweise darüber zu erhalten, ob p0071 die RhoA-Aktivität direkt oder indirekt über GEFs reguliert, wurde die Interaktion zwischen p0071 und RhoA mittels Hefe-Dihybrid Systems analysiert. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Kopf-Region von p0071 (1-509 AS) aufgrund einer autonomen Aktivierung der Reportergene *His 3* und *Ade 2* nicht verwendet werden konnte. Die p0071 *Armadillo*-Region (510-988 AS) wurde als Fusion mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (pGBKT7) und die RhoA-Varianten (wt-RhoA, da-RhoA und dn-RhoA) wurden als Fusion mit der GAL4-Transaktivierungsdomäne (pGADT7) eingesetzt und in den Hefestamm YRG2 kotransformiert. Anschließend wurden die Hefen auf Selektionsplatten ohne Tryptophan und Leucin (-WL) ausplattiert. Eine Selektion auf Proteininteraktion erfolgte auf Reporterplatten (-WLH). In Abb. 3.30 ist zu sehen, dass nur wt-RhoA und da-RhoA mit der *Armadillo*-Region von p0071 interagierten, jedoch nicht dn-RhoA. BiFC Analysen bestätigten eine Assoziation von p0071 mit wt-RhoA in der Zytokinese am Zentralkörper (René Keil, siehe (Wolf *et al.*, 2006)). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass p0071 direkt mit RhoA interagiert und möglicherweise die aktive, GTP-gebundene Form von RhoA am Zentralkörper stabilisiert.

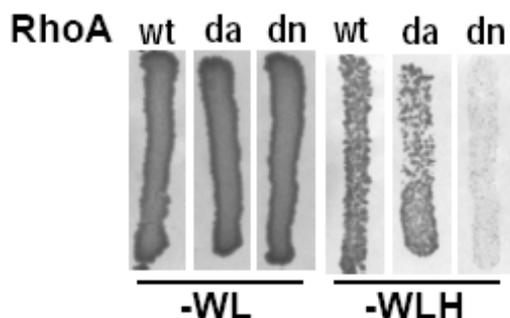


Abb. 3.30: p0071 interagiert mit RhoA im Hefe-Dihybrid System. YRG2 Hefezellen wurden mit dem p0071 *Armadillo*-Fragment in pGBKT7 und den RhoA-Varianten in pGADT7 kotransformiert und auf Selektionsplatten ohne Tryptophan und Leucin (-WL) ausplattiert. Die Interaktionen wurden durch Selektion auf Histidin-Auxotrophie (-WLH) nachgewiesen. Die p0071 *Armadillo*-Region interagiert mit wt-RhoA und da-RhoA, jedoch nicht mit dn-RhoA.

3.2.2.7 p0071 interagiert mit dem GEF-Protein Ect2

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass p0071 die RhoA-Aktivität moduliert, indem es direkt mit wt-RhoA und da-RhoA interagiert. Jedoch besitzt

p0071 keine GEF-Domäne um RhoA zu aktivieren. Daher stellte sich die Frage, ob p0071 als Gerüstprotein fungiert, indem es in Verbindung mit einem GEF-Protein die RhoA-Aktivität reguliert. Ect2 ist ein GEF-Protein für das eine essentielle Funktion in der Zytokinese nachgewiesen wurde (Garcia-Mata and Burrige, 2007; Kimura *et al.*, 2000; Tatsumoto *et al.*, 1999). Aufgrund dessen wurde untersucht, ob p0071 und Ect2 in einem Komplex, zusammen mit RhoA assoziieren. Für die Interaktionsstudien wurden verschiedene Ect2-Deletionsfragmente hergestellt (Abb. 3.31 A). Ect2 (1-333 AS) beinhaltet zwei BRCT- (Brustkrebs C-terminale) Domänen und Ect2 (1-414 AS) ein zusätzliches NLS (*nuclear localization signal*). Die C-terminalen Fragmente (415-884 AS und 334-884 AS) enthalten die charakteristische GEF-Domäne, eine PH-(Plekstrin homologe) Domäne und ein bzw. zwei NLS. Die cDNAs der verschiedenen Fragmente wurden aus HeLa Gesamt-RNA amplifiziert, in den Vektor pCR[®] 2.1. TOPO[®] subkloniert, sequenziert und mit publizierten Sequenzen verglichen. Sequenzanalysen zeigten, dass eine neue Splicevariante für Ect2, bezeichnet als Ect2b, mit einer Insertion von 31 Aminosäuren an Position 71, identifiziert werden konnte (*accession number*: DQ847274). Eine homologe Splicevariante wurde in *Mus musculus*, *Rat*, *Chicken*, *Bos taurus* und *Xenopus* beschrieben, jedoch bisher noch nicht im humanen System.

Um die Interaktion zwischen p0071 und Ect2 zu analysieren, wurde das Hefe-Dihybrid System verwendet. Dazu wurde die *Armadillo*-Region von p0071 (510-988 AS) als DNA-Bindungsdomänen-Fusionsprotein und die verschiedenen Ect2-Deletionsfragmente, welche mit dem transkriptionsaktivierenden Modul gekoppelt waren, in dem Hefestamm YRG2 transformiert. Die Interaktionen wurden durch Selektion auf Histidin-Auxotrophie nachgewiesen. In Abb. 3.31 A sind die Ergebnisse der Hefe-Dihybrid Untersuchungen zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass p0071 *repeats* mit allen untersuchten N-terminalen Fragmenten interagiert. Für die C-terminale katalytische Domäne wurde keine Interaktion mit p0071 *repeats* detektiert. Zur Verifizierung der p0071-Ect2-Interaktion *in vitro*, wurden GST pull-down Experimente durchgeführt. Dipl. Biologe Oliver Götzl konnte zeigen, dass beide N-terminalen Ect2b-Deletionsfragmente (Ect2b 1-333 AS und 1-414 AS) mit der *Armadillo*-Domäne von p0071 *in vitro* interagieren (Daten nicht gezeigt, (Wolf *et al.*, 2006)). Somit konnte in zwei unabhängigen Systemen (Hefe-Dihybrid und GST pull-down) gezeigt werden, dass p0071 und Ect2 spezifisch miteinander interagieren.

Da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass p0071 an den Zentrosomen, Spindelpolen und am Zentralkörper lokalisiert, wurde die subzelluläre

Verteilung von Ect2 im Zusammenhang mit p0071 untersucht. MCF-7 Zellen wurden mit Antikörpern gegen p0071 und Ect2 gefärbt. Abb. 3.31 B zeigt, dass beide Proteine an den Zentrosomen während der Interphase und am Zentralkörper während der Zytokinese kolokalisierten. Die Interaktions- und Lokalisationsstudien belegen, dass p0071 sowohl mit Ect2, als auch mit RhoA interagiert und daraus resultierend über Ect2 die RhoA-Aktivität modulieren könnte.

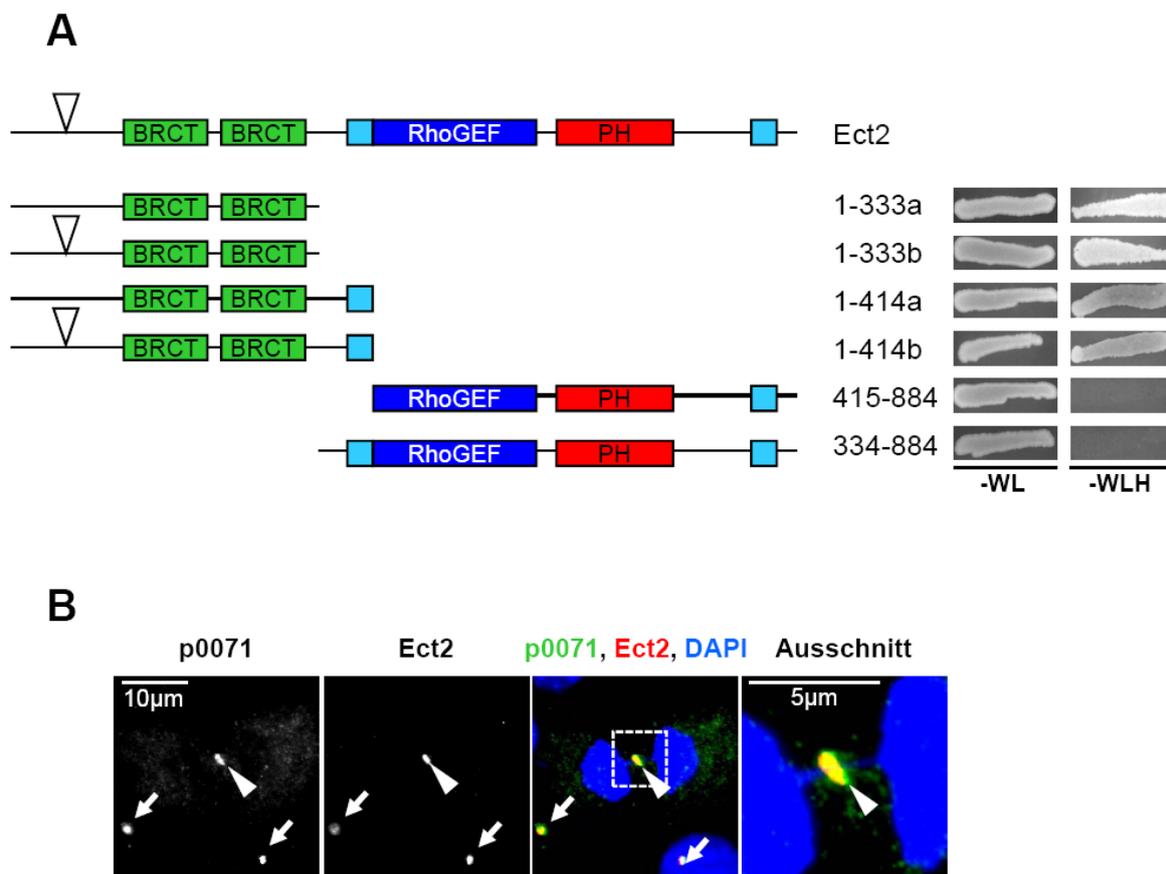


Abb. 3.31: p0071 interagiert mit dem Rho-GEF Ect2. (A) Schematische Darstellung der Domänen von Ect2 sowie der verwendeten Deletionsfragmente. ▽: Insertion von 31 AS an Position 70; BRCT: Brustkrebs C-terminale Domäne; RhoGEF: Rho Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Domäne; PH: Plekstrin homologe Domäne; NLS: *nuclear localization signal* sind hellblau markiert. Im Hefe-Dihybrid System interagiert das p0071 *Armadillo*-Fragment mit allen N-terminalen Ect2-Fragmenten, jedoch nicht mit den zwei C-terminalen Ect2-Fragmenten. **(B)** Endogenes p0071 und Ect2 kolokalisieren an den Zentrosomen (siehe Pfeil) und am Zentralkörper (siehe Pfeilspitze) in MCF-7 Zellen. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

3.2.3 Funktionelle Analyse der Interaktion zwischen p0071 und Ect2

Neben der bereits untersuchten Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen p0071 und Ect2, ist es von Bedeutung zu wissen, ob diese Proteine ebenso eine funktionelle Assoziation

zeigen. Weiterhin wurde untersucht, auf welcher Ebene (Regulator bzw. Effektor von Ect2) p0071 den Rho-Signalweg beeinflusst. Da p0071 sowohl mit RhoA als auch mit seinem Regulator, Ect2 interagiert, stellte sich die Frage, ob p0071 in die Aktivierung von RhoA involviert ist.

3.2.3.1 p0071 reduziert den dominant negativen Effekt der Ect2-N-terminalen Domäne

Ect2 besitzt eine regulatorische N-terminale Domäne (1-333 AS) und eine katalytische C-terminale Domäne (siehe Abb. 3.31 A). Das N-terminale Ect2-Fragment wirkt als dominant negativer und das katalytische C-terminale Fragment als dominant aktiver Regulator für die Rho-GTPasen. Überexpression der N-terminalen Domäne korreliert mit der Bildung von mehrkernigen Zellen (Kim *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2003; Tatsumoto *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, ob die verschiedenen N-terminalen Splicevarianten einen zusätzlichen Einfluss auf den Zytokinesedefekt zeigen, wurden diese als GFP-Fusionsproteine in HeLa Zellen überexprimiert. Nach 72 h wurde die Anzahl an mehrkernigen Zellen bestimmt. Für Ect2a (1-333 AS) wurden Zytokinesedefekte in ca. 70% der transfizierten Zellen beobachtet (Abb. 3.32 A). Diese Daten korrelierten mit denen von Tatsumoto und Kollegen, welche Zellteilungsdefekte in ca. 60% U2OS transfizierter Zellen nach 72 h beschrieben (Tatsumoto *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde für die längere Splicevariante, Ect2b (1-333 AS) ein stärker ausgeprägter Zytokinesedefekt von ca. 90% Mehrkernigkeit detektiert (Abb. 3.32 A).

Da p0071 direkt mit der N-terminalen Domäne von Ect2 interagiert, stellte sich die Frage, ob auch ein funktioneller Zusammenhang gezeigt werden kann. Um dieses näher zu charakterisieren wurden Komplementationsstudien durchgeführt. Dazu wurden HeLa Zellen mit GFP-Ect2b (1-333 AS) und p0071-DsRed kotransfiziert und nach 72 h die Mehrkernigkeit analysiert. Interessanterweise wurde der Ect2-Phänotyp durch Überexpression von p0071 stark vermindert, welcher auf der Ebene des p0071 induzierten Zytokinesedefekt verbleibt (Abb. 3.32 B). Abb. 3.32 C und D zeigen eine repräsentative Auswahl angefertigter Immunfluoreszenzen nach Überexpression von GFP-Ect2b (1-333 AS) und GFP-Ect2b (1-333 AS) mit p0071-DsRed in Kombination. Diese Daten bestätigen eine funktionelle Assoziation zwischen p0071 und Ect2 *in vivo*.

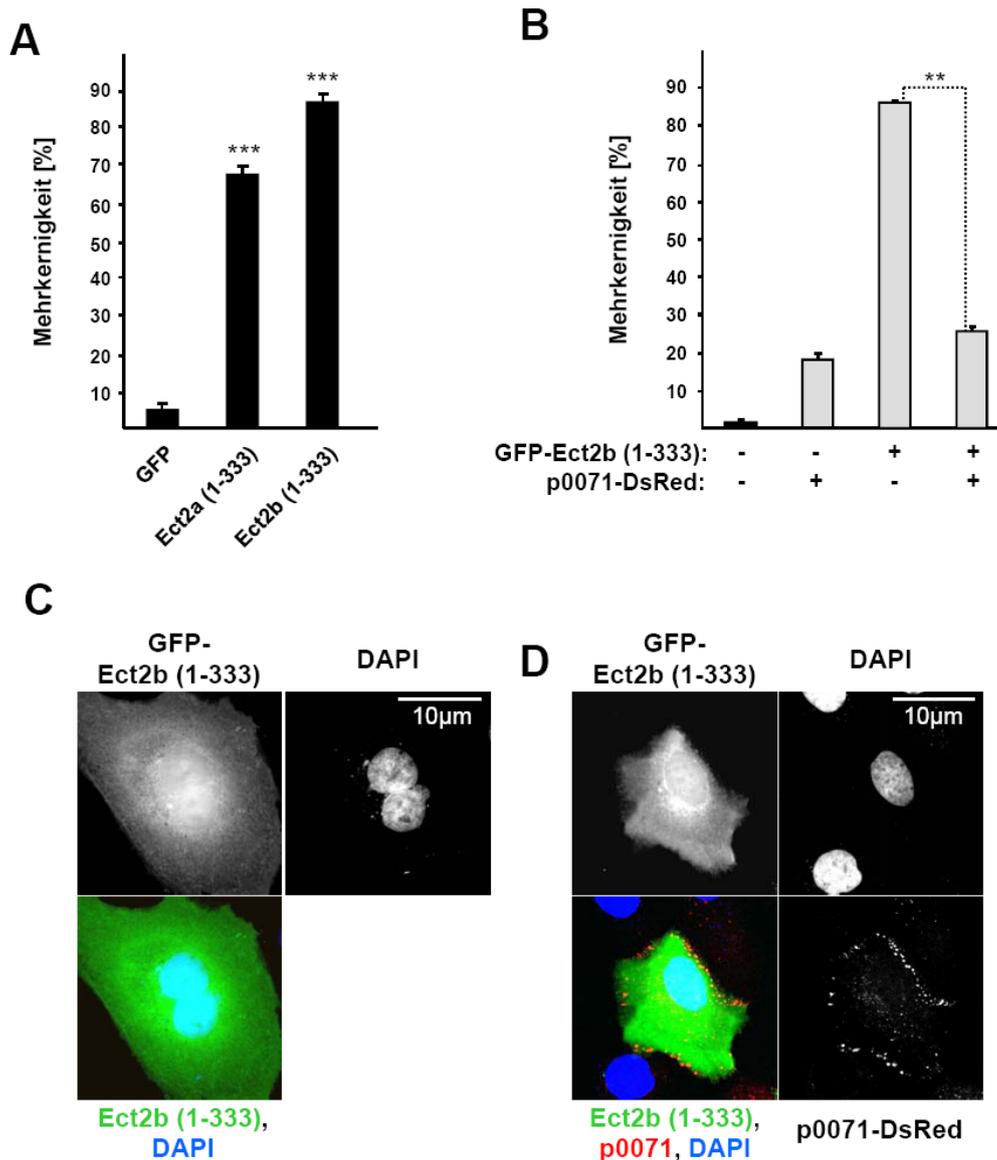


Abb. 3.32: p0071 vermindert den durch Ect2 N-Terminus induzierten Zytokinesedefekt. (A) Quantifizierung der Mehrernigkeit 72 h nach Transfektion von GFP-Ect2a (1-333 AS) und GFP-Ect2b (1-333 AS) in HeLa Zellen ($n > 100$). Ect2a steht für die kurze und Ect2b für die lange Splicevariante. **(B)** Zytokinesedefekt von Ect2b (1-333 AS) wird durch Überexpression von p0071 reduziert. HeLa Zellen wurden mit GFP-Ect2b 1-333, p0071-DsRed bzw. in Kombination transfiziert. Nach 72 h wurde die Anzahl mehrkerniger Zellen analysiert. **(C und D)** Immunfluoreszenzstudien von überexprimiertem GFP-Ect2b (1-333 AS) bzw. GFP-Ect2b (1-333 AS) und p0071-DsRed. Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. **, $p \geq 0.005$.

3.2.3.2 p0071 reduziert den durch *Knockdown* von Ect2 induzierten Zytokinesedefekt

Um Hinweise darüber zu erhalten auf welcher Ebene des Rho-Signalweges p0071 die RhoA-Aktivität kontrolliert, wurden weitere Komplementationsexperimente durchgeführt.

Zum einen könnte p0071 als Regulator von Ect2 und zum anderen als Effektor fungieren. Wenn p0071 ein Regulator von Ect2 ist, würde man erwarten, dass der Zytokinesedefekt nach *Knockdown* von Ect2 und simultaner Überexpression von p0071 unbeeinflusst bleibt. Wirkt p0071 als Effektor von Ect2, sollte der Ect2-siRNA vermittelte Phänotyp durch p0071 vermindert werden. In Abb. 3.33 ist zu sehen, dass überexprimiertes p0071 den Zytokinesedefekt nach *Knockdown* von Ect2 signifikant reduzierte. Aus diesen Analysen lässt sich schließen, dass p0071 eher als Effektor von Ect2 fungiert.

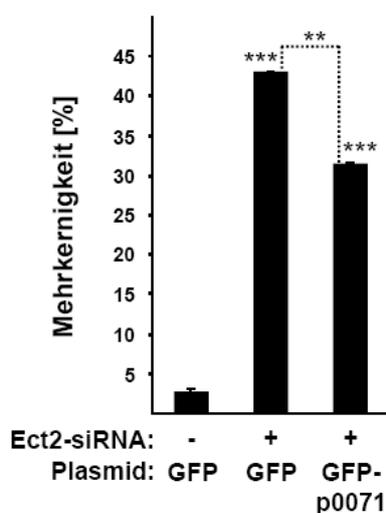


Abb. 3.33: Reduktion der Mehrkernigkeit nach *Knockdown* von Ect2 durch GFP-p0071. HEK 293 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen bezüglich ihrer Kernanzahl analysiert ($n > 100$). Statistische Grundlage bildeten drei unabhängige Experimente. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. **, $p \geq 0.005$; ***, $p \geq 0.0005$.

3.2.3.3 Ect2 reguliert die Lokalisation von p0071

Aus den zuvor dargestellten Daten geht hervor, dass p0071 funktionell mit Ect2 assoziiert. Für verschiedene RhoA regulierende Proteine (z.B. Ect2 und MgcRacGAP) wurde beschrieben, dass die Reduktion dieser Proteine mittels RNAi eine Deslokation von RhoA an der Spaltungsfurche und am Zentralkörper zeigen (Chalamalasetty *et al.*, 2006; Kamijo *et al.*, 2006; Nishimura and Yonemura, 2006; Zhao and Fang, 2005). Um zu untersuchen, ob der *Knockdown* von Ect2 einen Einfluss auf die Lokalisation von p0071 am Zentralkörper hat, wurden in HEK 293 Zellen endogenes Ect2 mittels siRNAs reduziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit anti-p0071 gefärbt. In Kontroll-siRNA transfizierten Zellen akkumuliert p0071 am Zentralkörper. Demgegenüber wurde in mehr als 50% der Ect2 siRNA transfizierten Zellen eine geringere Akkumulation von p0071 am Zentralkörper detektiert (Abb. 3.34 A). Im Gegensatz dazu war die Akkumulation von Ect2 am Zentralkörper nach *Knockdown* von p0071 unbeeinflusst (Abb. 3.34 B). Demnach könnte man vermuten, dass die spezifische

Lokalisation von p0071 über den Ect2-Signalweg reguliert wird. Jedoch ist hierbei zu bedenken, dass der Zentralspindlin-Komplex die zentralen Mikrotubuli stabilisiert und somit ein direkter Effekt aufgrund fehlender Mikrotubuli-Stabilisierung nicht ausgeschlossen werden kann.

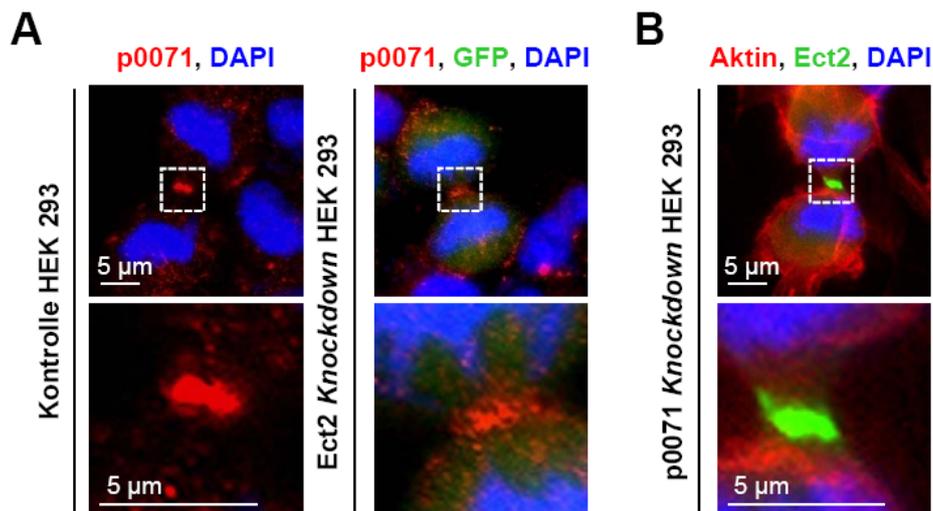


Abb. 3.34: Lokalisation von p0071 am Zentralkörper wird über Ect2 reguliert. (A) HEK 293 und MCF-7 Zellen wurden mit Ect2 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert. GFP diente als Transfektionskontrolle. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit anti-p0071 und Zellkerne mit DAPI gefärbt. (B) HEK 293 Zellen wurden mit p0071 spezifischen siRNAs und GFP-Ect2 transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mikroskopisch analysiert.

3.2.3.4 p0071 verstärkt die GEF-Aktivität von Ect2

In den bisher beschriebenen Experimenten konnte eindeutig gezeigt werden, dass p0071 sowohl mit RhoA als auch mit seinem Regulator, dem GEF-Protein Ect2 interagiert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass p0071 die RhoA-Aktivität moduliert. Um die Funktion von p0071 in der Aktivierung von RhoA näher zu charakterisieren wurde ein Guanin-Nukleotid-Austausch *Assay* durchgeführt. Dabei könnte zum einen p0071 direkt die Austauschrate von RhoA regulieren und zum anderen die Austauschaktivität von Ect2 erhöhen. Um dieses zu untersuchen wurde zunächst flag-p0071 wt, flag-Ect2 wt, flag-Ect2 (414-883 AS) in HEK 293 Zellen exprimiert und die Zellen mittels Thymidin-Nocodazol-Block synchronisiert, um posttranslationelle Modifikationen zu gewährleisten. Für Ect2 konnte gezeigt werden, dass dieses in der G2-Phase und während der Mitose phosphoryliert ist und die Phosphorylierung für dessen GEF-Aktivität erforderlich ist (Tatsumoto *et al.*,

1999). 48 h nach Transfektion wurden die überexprimierten Proteine mittels anti-Flag Agarose aufgereinigt und im Guanin-Nukleotid-Austausch *Assay* analysiert. Dieser Test beruht auf die spektroskopischen Unterschiede zwischen gebundenen und nicht gebundenen fluoreszierenden mant-(N-Methylantraniloyl) GTP an RhoA. Im gebundenen Zustand weist mant-GTP eine höhere Fluoreszenzintensität auf. Überraschenderweise konnte für p0071 eine GDP/GTP Austauschaktivität bestimmt werden, obwohl die Aminosäuresequenz von p0071 keine putative Domäne für eine mögliche GEF-Funktion aufweist (Abb. 3.35 A, B). Für Ect2 wt und die C-terminale katalytische Domäne (Ect2 414-883 AS) wurden ähnliche Austauschaktivitäten im Vergleich zu p0071 wt detektiert. In Kombination von p0071 und Ect2 wt konnte die stärkste GDP/GTP Austauschaktivität gemessen werden (Abb. 3.35 A, B). Diese Daten legen nahe, dass beide Proteine, p0071 und Ect2, für eine vollständige Aktivierung von RhoA notwendig sind.

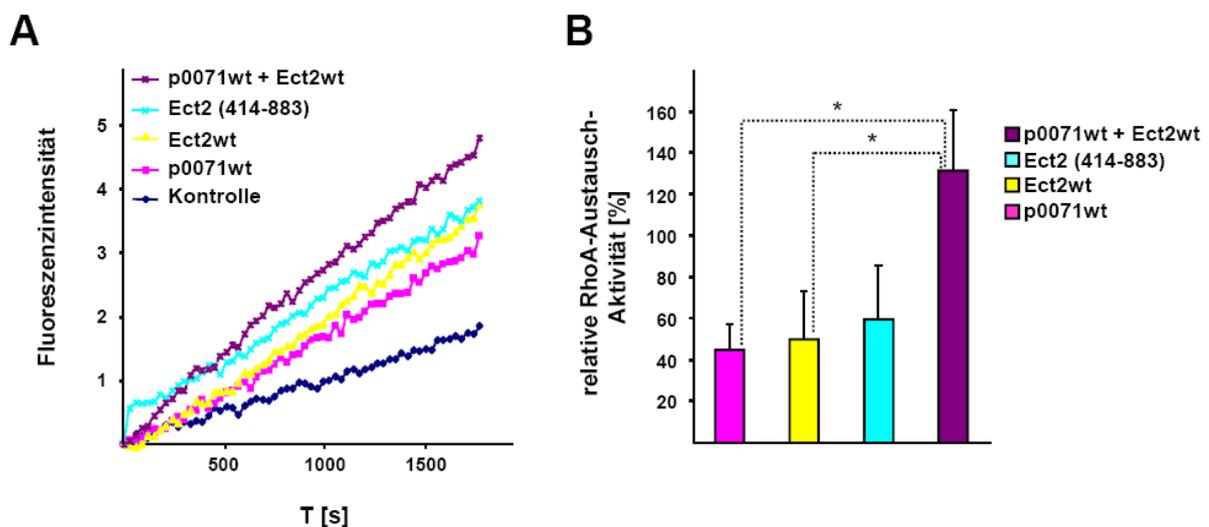


Abb. 3.35: Guanin-Nukleotid-Austauschaktivität von p0071 und Ect2 auf RhoA. GEF-Aktivität von Ect2 wird durch p0071 erhöht. p0071 wt, Ect2 wt und Ect2 (414-883 AS) wurden als Flag-Fusionsproteine in HEK 293 Zellen exprimiert und synchronisiert. Nach 48 h wurden Immunpräzipitate hergestellt und die GEF-Aktivität im Guanin-Nukleotid-Austausch *Assay* analysiert. **(A)** Die Fluoreszenzintensitätszunahme des RhoA beladenen mant-(N-Methylantraniloyl) GTP wurde in Abhängigkeit der Zeit verfolgt. Die Anregung des Fluorophors erfolgte bei 360 nm und die Emission wurde bei 460 nm detektiert. **(B)** Die relative Austauschaktivität repräsentieren die Anstiege der Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Proteine im Vergleich. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. *, $p \geq 0.05$.

4 Diskussion

Die Plakophiline und p0071 sind Mitglieder der *Armadillo-repeat* Proteinfamilie, welche regulatorische Funktionen in der Zell-Zell-Adhäsion ausüben (Übersicht in (Hatzfeld, 2005)). Über die Funktionen jenseits der Zell-Zell-Adhäsion war hingegen kaum etwas bekannt. Hefe-Dihybrid *screens* hatten mehrere an der Translationskontrolle beteiligte Proteine als potentielle Bindungspartner für Plakophilin1 identifiziert. Dieser Befund war zunächst überraschend, da bisherige Hinweise bezüglich der zytoplasmatischen Funktion von Plakophilin1 nur eine Rolle im Rho-Signalweg postulieren (siehe 1.3.3.2). Ob, und wenn ja welche regulatorische Funktion Plakophilin1 während der Translation ausübt, war die zentrale Fragestellung, die es im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen galt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zytoplasmatische Funktion von p0071 charakterisiert. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass endogenes p0071 während der Zytokinese am Zentralkörper akkumulierte und die Überexpression einen Zellteilungsdefekt induzierte, welcher mit der Bildung von mehrkernigen Zellen einherging. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Funktion von p0071 während der Zytokinese und der molekulare Mechanismus des Zellteilungsdefektes untersucht.

4.1 Funktionen der Plakophiline

4.1.1 Funktionen der Plakophiline in der Translation

Die zentrale Frage, ob Plakophilin1 an der Translationskontrolle beteiligt sein könnte, basierte auf dem Befund, dass verschiedene Translationsinitiationsfaktoren als putative Interaktionspartner für Plakophilin1 identifiziert worden. Da dies in eine völlig neue und unerwartete Richtung wies, wurde zunächst nach weiteren Hinweisen gesucht, die eine Rolle in der Translation unter physiologischen Bedingungen unterstützen. Üblicherweise kann eine Kolo-kalisation von zwei putativen Bindungspartnern als erster Hinweis auf eine Interaktion im physiologischen Kontext gewertet werden. Translationsinitiationsfaktoren zeigen typischerweise eine diffuse Lokalisation im Zytoplasma. Eine Kolo-kalisation mit dem zytoplasmatischen Pool von Plakophilin1 war aufgrund dieser diffusen Lokalisation nicht sehr informativ. Es war allerdings bekannt, dass unter zellulärem Stress mRNAs, die von

Polysomen freigesetzt werden, zusammen mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (RBPs) in *stress granules* rekrutiert werden (Anderson and Kedersha, 2002a, b; Kedersha and Anderson, 2002). Sowohl endogenes als auch exogenes Plakophilin1 kolokalisierte mit eIF4A1 und TIAR in *stress granules* (siehe Abb. 3.1-3.). Während diese Arbeit entstand, publizierten Hofmann und Kollegen, dass Plakophilin1 und 3, jedoch nicht Plakophilin2 *stress granule* Komponenten sind (Hofmann *et al.*, 2006). Ihre Ergebnisse deckten sich im Wesentlichen mit den hier in der Arbeit dargestellten (siehe Abb. 3.1 und 3.4). Weiterhin zeigten sie, dass Plakophilin3 mit verschiedenen RBPs u.a. PABPC1 (poly(A)-Bindeprotein C1), G3BP (RasGAP-assoziierte Endoribonuklease) und FXR1 (*fragile-X-mental-retardation-related protein 1*) koimmunpräzipitierte (Hofmann *et al.*, 2006). Die funktionelle Relevanz sowie der molekulare Mechanismus von Plakophilin1 und 3 in *stress granules* bzw. während der Translation oder im RNA-Metabolismus wurden in der oben genannten Arbeit allerdings nicht näher untersucht. Da ich Plakophilin1 prominent in *stress granules* nachweisen konnte, war die erste Arbeitshypothese, dass Plakophilin1 als Gerüstprotein an der *stress granule* Entstehung beteiligt sein könnte. Da der *Knockdown* von Plakophilin1 keinen Einfluss auf die Ausbildung von *stress granules* sowie auf die Lokalisation von eIF4A1 in diesen Strukturen zeigte (siehe Abb. 3.10), wurde diese Hypothese verworfen. Ebenso hatte die Reduktion von eIF4A1 keine Auswirkung auf die Entstehung von *stress granules* und Rekrutierung von Plakophilin1 in diese Strukturen (Abb. 3.10). Das bedeutet, dass weder Plakophilin1 noch eIF4A1 essentiell für die Entstehung von *stress granules* sind und somit nicht als Gerüstproteine fungieren, welche die Aggregation von mRNAs und RBPs, infolge des stressbedingten Erliegens der Translation, vermitteln.

Da die Lokalisation von Plakophilin1 in *stress granules* von seinem Interaktionspartner eIF4A1 unabhängig war, stellte sich die Frage wie Plakophilin1 in *stress granules* rekrutiert wird. Zum einen könnte dieses durch die Assoziation mit anderen RBPs z.B. eIF3 und zum anderen über eine mögliche direkte Assoziation mit mRNAs erfolgen. Die Plakophiline besitzen keine bisher bekannten *RNA Recognition Motifs* (RRMs), jedoch könnten sie, aufgrund ihrer sehr basischen Ladung (pI 9,3-10,1; (Schmidt and Jager, 2005)), mit den Phosphatgruppen der RNA und der DNA direkt interagieren. Hofmann und Kollegen konnten mittels Northwestern Blot Analysen von Plakophilin3-Immunpräzipitaten mit (³²P)-markierter poly(A) mRNA zeigen, dass die poly(A) mRNA eine starke Bindung mit einer Bande entsprechend dem Molekulargewicht von PABPC1 und eine sehr schwache Bindung

mit einer Bande entsprechend dem Molekulargewicht von Plakophilin3 aufweist (Hofmann *et al.*, 2006). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Plakophilin1 und Plakophilin3 reguläre Bestandteile von *stress granules* sind. Auch wenn Plakophilin1 keine essentielle Funktion während der *stress granule* Bildung hatte, deuten diese Ergebnisse zusammen mit den Befunden des Hefe-Dihybrid *screens* darauf hin, dass Plakophilin1 möglicherweise Funktionen während der Translation in ungestressten Zellen ausüben könnte.

Im nächsten Schritt wurde daher die Spezifität der Interaktion zwischen Plakophilin1 und eIF4A1 *in vitro* im Hefe-Dihybrid System und im GST pull-down und *in vivo* mittels Bimolekularer Fluoreszenz-Komplementationsanalysen (BiFC, (Hu *et al.*, 2002)) verifiziert (siehe Abb. 3.6 und 3.7). Da die Plakophiline teilweise gemeinsame Bindungspartner und überschneidende Funktionen in der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion besitzen (siehe 1.3) wurde zusätzlich untersucht, ob eIF4A1 ein gemeinsamer Bindungspartner der Plakophiline oder einzigartig für Plakophilin1 ist. Diese Interaktion war spezifisch für die Plakophilin1 „Kopf“-Domäne und wurde nicht für Plakophilin2 und 3 detektiert (siehe Abb. 3.5). eIF4A1 ist eine RNA-abhängige Helikase, die unter ATP-Verbrauch Sekundärstrukturen der mRNA entwindet (Rozen *et al.*, 1990; Svitkin *et al.*, 2001). Neben eIF4A1 existieren zwei weitere Isoformen eIF4A2 und 3. eIF4A1 und eIF4A2 sind in ihrer Proteinsequenz beinahe identisch und funktionell austauschbar (Conroy *et al.*, 1990; Yoder-Hill *et al.*, 1993). Für eIF4A2 wurde ebenso im Hefe-Dihybrid System eine spezifische Interaktion mit der Plakophilin1 „Kopf“-Domäne beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diese Daten deuten darauf hin, dass Plakophilin1 vermutlich über eIF4A1 bzw. eIF4A2 Funktionen während der Translation ausüben könnte.

Im Hinblick auf die bekannte Funktion von eIF4A1 in der Translationsinitiation, wurde der Einfluss von Plakophilin1 auf die Proteinsynthese *in vivo* mittels (³⁵S)-Methionin-Markierungsexperimenten und dem Luziferase-Reporter System im Vergleich zu Plakophilin2, Plakophilin3 und eIF4A1 untersucht. Um einen Transkriptions- und/oder einen mRNA-Stabilitätseffekt auszuschließen wurde die Luziferase-Aktivität auf die Luziferase mRNA normalisiert. Umfassende Analysen ergaben, dass Plakophilin1 und zu einem geringeren Maße auch Plakophilin3 die globale Proteinsynthese auf der Ebene der Translation regulierten. Für Plakophilin2 wurde kein Effekt auf Translationsebene detektiert (siehe Abb. 3.12 und 3.14). Das unterschiedliche Verhalten von Plakophilin2 erscheint nicht sonderlich überraschend, da Plakophilin2 zum einen keine *stress granule* Komponente darstellt und zum

anderen nicht mit RBPs in diesen Strukturen assoziierte (siehe Abb. 3.4 (Hofmann *et al.*, 2006)). Für Plakophilin3 wurde im Vergleich zu Plakophilin1 nur ein geringfügig stimulierender Einfluss auf die Translation beobachtet. Plakophilin3 ist ebenso wie Plakophilin1 ein regulärer Bestandteil von *stress granules* (siehe Abb. 3.1 und 3.4). Im Hefe-Dihybrid System wurde keine Interaktion zwischen Plakophilin3 und eIF4A1 detektiert (siehe Abb. 3.5). Dieses schließt aber nicht eine Interaktion aus und sollte deshalb in einem unabhängigen Testsystem überprüft werden. Demgegenüber assoziierte Plakophilin3 mit PABPC1, FXR1 und G3BP (Hofmann *et al.*, 2006). PABPC1 ist eine Komponente des eIF4-mRNA Prä-Initiationskomplexes und interagiert mit eIF4G und eIF4B (Imataka *et al.*, 1998). Durch die Interaktion von PABPC1 mit eIF4G kommt es zur Zirkularisierung der mRNA, welche mit einer erhöhten poly(A)-Bindungsaktivität von PABPC1 und einer erhöhten *cap*-Bindungsaktivität von eIF4F verbunden ist. Darüber hinaus beeinflusst die Interaktion zwischen PABPC1 und eIF4G die ATPase und RNA-Helikase Aktivität von eIF4F und eIF4A (Bi and Goss, 2000). In dieser Hinsicht wäre es denkbar, dass Plakophilin3 möglicherweise durch die Assoziation mit PABPC1 die Translation stimulieren könnte.

Auch für eIF4A1 wurde eine Stimulation der Translation nach Überexpression in HEK 293 Zellen sowohl mittels (³⁵S)-Methionin-Markierung als auch im Luziferase-Reporter System beobachtet (siehe Abb. 3.13 und 3.14). Diese Ergebnisse waren auf den ersten Blick überraschend, da eIF4A1 der häufigste vorkommende Translationsinitiationsfaktor ist, welcher in drei Kopien pro Ribosom vorliegt (Duncan *et al.*, 1987) und man somit keinen stimulierenden Einfluss von exogenem eIF4A1 auf die Translation erwartet hätte. Allerdings findet man in der Literatur zum Teil widersprüchliche Angaben über den Einfluss von eIF4A1 auf die Translation. Verschiedene *in vitro* Translationsstudien in Kaninchen-Retikulozytenlysaten zeigten, dass eIF4A1 keinen stimulierenden Einfluss auf die *cap*-abhängige Translation hatte (Pause *et al.*, 1994b; Svitkin *et al.*, 2001). Demgegenüber stehen die Daten von Thoma und Kollegen, welche einen stimulierenden Einfluss von eIF4A1 auf die *cap*-abhängige Translation in HeLa-Zellextrakten zeigten (Thoma *et al.*, 2004). Über den Einfluss von eIF4A1 auf die *cap*-abhängige Translation *in vivo* ist hingegen kaum etwas bekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eIF4A1 *in vivo* die *cap*-abhängige Translation stimuliert (siehe Abb. 3.14). Kürzlich wurden mittels *UV-crosslinking* Experimenten gezeigt, dass eIF4A, eIF4B und eIF4H nicht nur in unmittelbarer Nähe der *cap*-Struktur, sondern bis zu 52 Nukleotide von der *cap*-Struktur entfernt an die mRNA binden (Lindqvist *et al.*, 2008a).

Laut dem Modell aus dieser Arbeit (und unserem adaptierten Modell (Abb. 4.2)) binden mehrere eIF4A, eIF4B (und eIF4H) Untereinheiten entlang des 5'UTRs der mRNA, um einen stabilen mRNA-Protein-Komplex zu bilden. Dies bedeutet, dass insbesondere bei längeren, strukturierten 5'UTRs die endogene Konzentration von eIF4A1 möglicherweise limitierend sein könnte und die Überexpression zu einer Stimulation der Translation insbesondere solcher mRNAs führen könnte.

Zur Bestätigung der Funktion von Plakophilin1 während der *cap*-abhängigen Translation, wurden *in vitro* Studien mit rekombinant hergestelltem gereinigtem Plakophilin1 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Plakophilin1 einen konzentrationsabhängigen stimulierenden Einfluss auf die Translation der m⁷G-Cap-CAT-poly(A) mRNA hatte (siehe Abb. 3.16). Zusammenfassend zeigen die *in vivo* und *in vitro* Analysen eindeutig, dass Plakophilin1 die *cap*-abhängige Translation stimuliert. Da Plakophilin1 direkt mit eIF4A1 interagiert lag die Vermutung nahe, dass Plakophilin1 über eIF4A1 die Translation regulieren könnte. Zum einen könnte Plakophilin1 die enzymatische Aktivität von eIF4A1 modulieren und/oder zum anderen als Gerüstprotein fungieren, indem es die Rekrutierung von eIF4A1 zum Prä-Initiationskomplex stimuliert.

Nach dem gängigen Modell ist eIF4A1 eine ATPase/Helikase, die Sekundärstrukturen im 5'UTR der mRNA entwindet und dadurch die Anlagerung der 40S ribosomalen Untereinheit an die mRNA ermöglicht (Rogers *et al.*, 2002). Bisher wurde beschrieben, dass die Translationsinitiationsfaktoren eIF4B, eIF4F, eIF4G und eIF4H die ATPase-Aktivität von eIF4A1 stimulieren (Bi and Goss, 2000; Grifo *et al.*, 1984; Korneeva *et al.*, 2005; Richter-Cook *et al.*, 1998). Um der Frage nachzugehen, ob Plakophilin1 die Aktivität von eIF4A1 moduliert, wurde ein *in vitro* ATPase-Aktivitäts Assay mit rekombinant hergestelltem gereinigtem eIF4A1 und Plakophilin1 durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass Plakophilin1 die RNA-abhängige ATPase-Aktivität von eIF4A1 durch seine direkte Assoziation stimuliert (siehe Abb. 3.17). Überraschenderweise wurde auch für Plakophilin1 eine ATPase-Aktivität detektiert. Obwohl außer der Plakophilin1-Bande keine weiteren Banden im Coomassie gefärbten SDS-Gel nach der Gelfiltrationschromatographie ersichtlich waren (siehe Abb. 3.15), kann eine Kontamination mit einer *E. coli* ATPase nicht ausgeschlossen werden. Die Daten zeigen jedoch deutlich, dass der Plakophilin1-eIF4A1-Komplex eine 1,6-fach höhere ATPase-Aktivität aufweist im Vergleich zur Summe der Einzelkomponenten (siehe Abb. 3.17). Im Vergleich zum eIF4F-Komplex, eIF4G, eIF4B und

eIF4H, welche die ATPase-Aktivität von eIF4A1 um den Faktor 2 bis 4 stimulieren (Bi and Goss, 2000; Korneeva *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 1999), war die hier beschriebene Stimulation für Plakophilin1 etwas geringer (Faktor 1,6). In dieser Arbeit wurde der ATPase Aktivitätstest mit 3 μg eIF4A1 und 4 μg Plakophilin1 durchgeführt. Bi und Kollegen beschreiben eine 2-fach höhere ATPase Aktivität von eIF4A1 durch eIF4B unter Verwendung von 1,5 μg eIF4A1 und 6 μg eIF4B (Bi and Goss, 2000). Ob die ATPase Aktivität von eIF4A1 durch höhere Plakophilin1 Proteinkonzentrationen weiterhin stimuliert werden kann bzw. unter welcher Proteinkonzentration die maximale ATPase Aktivität erzielt wird müssen weitere Experimente zeigen. Diese Analysen implizieren, dass neben den bereits bekannten Translationsinitiationsfaktoren auch Plakophilin1 die enzymatische Aktivität von eIF4A1 stimuliert.

Um die Funktion von Plakophilin1 während der Translationsinitiation zu untersuchen wurden von Dr. Malgorzata Krause-Gruszczynska $m^7\text{GTP}$ -Sepharose Affinitätschromatographie Experimente durchgeführt und der eIF4F-Komplex charakterisiert (Abb. 4.1). eIF4F ist ein trimerischer Komplex, der aus dem *cap*-Bindeprotein eIF4E, dem Adapterprotein eIF4G und der Helikase eIF4A besteht (Übersicht in (Gingras *et al.*, 1999b)). In Übereinstimmung mit der Literatur wurden eIF4E und eIF4A (Bordeleau *et al.*, 2006; Low *et al.*, 2005), daneben aber auch endogenes Plakophilin1 spezifisch kopräzipitiert (Abb. 4.1 A). Zudem stimulierte exogenes Plakophilin1 die Rekrutierung von eIF4A1 und eIF4B zum Prä-Initiationskomplex, während die Mengen von eIF4E und eIF4G unbeeinflusst blieben (Abb. 4.1 B). Da eIF4B ein Kofaktor von eIF4A1 ist, welcher die enzymatische Aktivität von eIF4A1 erhöht (Rogers *et al.*, 2001), könnte man vermuten, dass Plakophilin1 möglicherweise über eIF4B die Aktivität von eIF4A1 *in vivo* beeinflusst.

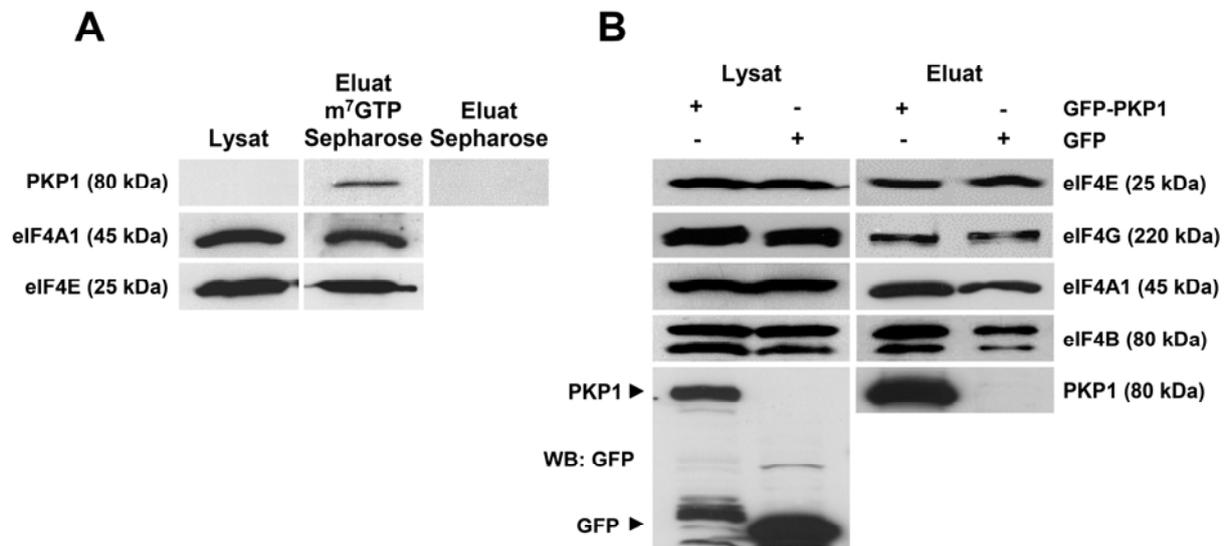


Abb. 4.1: Plakophilin1 assoziiert mit dem eIF4F-Komplex und stimuliert die Rekrutierung von eIF4A1 zum *cap*-Initiations-Komplex. (A) HaCaT Zelllysate wurden mit m⁷GTP-Sepharose oder Sepharose inkubiert. Kopräzipitiertes Plakophilin1, eIF4E und eIF4G wurden mittels Western Blot analysiert. (B) HEK 293 Zellen wurden mit GFP bzw. GFP-Plakophilin1 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zelllysate mit m⁷GTP-Sepharose inkubiert und die präzipitierten Proteine mittels Western Blot analysiert. Plakophilin1 erhöht die Rekrutierung von eIF4A1 und eIF4B zum eIF4E-Komplex. Diese Western Blots sind repräsentativ für drei m⁷GTP-Sepharose Affinitätschromatographie Analysen und wurden freundlicherweise von Dr. Malgorzata Krause-Gruszczynska zur Verfügung gestellt.

Die vorangehend beschriebenen Daten unterstützen die postulierte Funktion von Plakophilin1 während der Translationsinitiation. Zusammengefasst deuten sie darauf hin, dass Plakophilin1 die Translationsinitiation auf zwei Ebenen reguliert: (1) Plakophilin1 stimuliert die Rekrutierung von eIF4A1 und eIF4B zum *cap*-Initiationskomplex; (2) Plakophilin1 moduliert, möglicherweise zusammen mit eIF4B, die enzymatische Aktivität von eIF4A1. Wie bereits zuvor beschrieben postulieren Lindqvist und Kollegen ein Modell, in dem mehrere eIF4A, eIF4B (und eIF4H) Untereinheiten entlang des 5'UTRs mit der mRNA assoziieren, um einen stabilen mRNA-Protein-Komplex zu bilden (Lindqvist *et al.*, 2008a). In Anlehnung an dieses Modell lässt sich folgendes Szenario für Plakophilin1 während der Translationsinitiation postulieren (Abb. 4.2). Plakophilin1 stimuliert die Translation, indem es die Aktivität und Rekrutierung von eIF4A1 zum Initiations-Komplex moduliert. Dieses führt wiederum zu einer erhöhten Assoziation von eIF4B und einer weiteren Aktivierung von eIF4A1. Das Modell impliziert, dass Plakophilin1 insbesondere die Translation solcher mRNAs beeinflussen könnte, welche lange und stark strukturierte 5'UTRs aufweisen. Um dieses Modell zu bestätigen und um mögliche translationskontrollierte mRNA-Zieltranskripte für Plakophilin1 zu identifizieren müssen in weiterführenden Studien RNAi- oder

Überexpressionsexperimente unter Inhibierung der Polymerase II vermittelten Transkription in Kombination mit Mikroarray-Analysen durchgeführt werden.

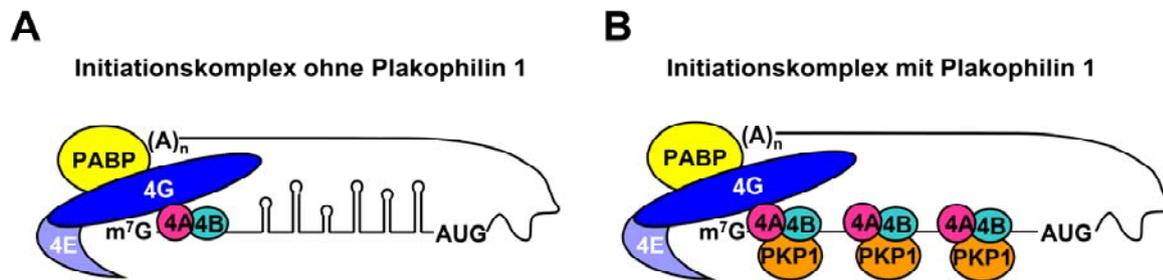


Abb. 4.2: Modell der putativen Funktion von Plakophilin1 während der Translationsinitiation. (A) In Abwesenheit von Plakophilin1 binden eIF4E, eIF4G und eIF4A an der *cap*-Struktur. eIF4A rekrutiert eIF4B, welches die enzymatische Aktivität von eIF4A stimuliert. Abbildung in Anlehnung an (Goodfellow and Roberts, 2007; Hinnebusch, 2006; Holz *et al.*, 2005; Lindqvist *et al.*, 2008a). (B) In Anwesenheit von Plakophilin1 wird mehr eIF4A zum *cap*-Initiations-Komplex rekrutiert, welches wiederum die Assoziation von eIF4B und die Aktivität von eIF4A erhöht. Der Komplex aus Plakophilin1, eIF4A und eIF4B erleichtert die Entwindung von Sekundärstrukturen im 5' untranslatierten Bereich der mRNA und ermöglicht die Anlagerung des 43S Prä-Initiationskomplexes.

4.1.2 Einfluss von Plakophilin1 auf die Proliferation und Zellgröße

Die Regulation von Zellproliferation und Zellgröße ist direkt an die Regulation der Translation gekoppelt. Zudem hat die Regulation der Translation eine entscheidende Funktion während der Entwicklung, der Differenzierung, der Zellzyklusprogression, des Zellwachstums und der Apoptose (Mathews, 2000). mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ist eine evolutionär konservierte Proteinkinase, welche durch Rezeptor-vermittelte Aktivierung die Proliferation und das Zellwachstum über die Regulation der Translation beeinflusst (Übersicht in (Hay and Sonenberg, 2004)). Durch mTOR werden verschiedene Proteine phosphoryliert, deren wichtigste Vertreter die S6 Kinase und das 4E-BP1 sind (Gingras *et al.*, 1998; Schmelzle and Hall, 2000). Hypophosphoryliertes 4E-BP1 hemmt die Translation durch Bindung an eIF4E. Durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 wird die Affinität zu eIF4E reduziert und der eIF4F-Komplex kann assembliert werden (Gingras *et al.*, 1999a). In humanen Zellen wurde nachgewiesen, dass eIF4E neben der Translation auch die Zellproliferation reguliert (De Benedetti *et al.*, 1991). Die S6 Kinase kontrolliert die Zellgröße, das Zellwachstum und die Proliferation in *D. melanogaster* (Montagne *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). In der Maus führt die Depletion von S6 Kinase zu einer Reduktion der Körpergröße (Shima *et al.*, 1998). Durch Immunpräzipitation konnte eine Assoziation zwischen eIF4A und CDKA (*cyclin-dependent protein kinase A*) nachgewiesen werden

(Hutchins *et al.*, 2004). Diese Daten legen einen möglichen Regulationsmechanismus zwischen Translation und Zellproliferation für eIF4A nahe.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Plakophilin1 und eIF4A1, neben ihrer Funktion in der Translation, auch das Zellwachstum, die Proliferation und die Zellgröße regulieren. Nach *Knockdown* von Plakophilin1 bzw. eIF4A1 war die Zellzahl und das Zellwachstum, im Vergleich zur Kontrolle, bedeutend reduziert (siehe Abb. 3.18). Diese Effekte könnten zum einen aus einer Reduktion der Proliferationsrate oder zum anderen aus einer Stimulation der Apoptoserate resultieren. Die Caspase-3/7 Aktivität war nach *Knockdown* von Plakophilin1, im Vergleich zur Kontrolle, leicht reduziert und nach *Knockdown* von eIF4A1 unbeeinflusst (siehe Abb. 3.19). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Reduktion der Zellzahl auf eine verminderte Proliferationsrate zurückzuführen ist (siehe Abb. 3.19) und nicht auf einer Stimulation der Apoptose beruht. Aufgrund der bisher unbekanntes nukleären Funktion von Plakophilin1 kann eine zusätzliche Stimulation des Zellwachstums auf Transkriptionsebene nicht ausgeschlossen werden.

Zudem geben die Ergebnisse erste Hinweise, um den molekularen Mechanismus der Plakophilin1-Defizienz zu verstehen. Der Verlust von Plakophilin1 bzw. Mutationen in Plakophilin1, bei dem trunkiertes verändertes Plakophilin1 exprimiert wird, führen zum sogenannten *skin fragility syndrome*. Die Betroffenen leiden unter blasenartigen Hautläsionen, bedingt durch die gestörte Zell-Zell-Adhäsion, und zusätzlich unter Haarverlust, Gedeihstörung und einer Reduktion an Schweißdrüsen (Hamada *et al.*, 2002; McGrath *et al.*, 1997; McGrath *et al.*, 1999; Whittock *et al.*, 2000). Der Haarfollikel ist ein Anhangsgebilde der Haut epidermalen Ursprungs und weist eine ausgesprochen hohe Proliferationsrate auf. Aufgrund dieser Befunde könnten der Haarverlust bzw. die Bildung von kurzen und spärlichen Haaren sowie die Gedeihstörung mit der hier beschriebenen Funktion von Plakophilin1 in der Regulation der Proliferation korrelieren. In Plakophilin3 *Knockout* Mäusen wurde eine abnorme Morphologie der Haarfollikel und ein stark vermindertes Haarwachstum beschrieben (Sklyarova *et al.*, 2008). Diese Daten implizieren, dass Plakophilin3 neben der Translation auch die Zellproliferation beeinflussen könnte.

4.1.3 Rolle der Plakophiline in der Tumorgenese

In eukaryotischen Zellen stellt die Kontrolle der Translation einen fundamentalen Mechanismus dar, und die Deregulation von Proteinen, die an dieser Kontrolle beteiligt sind, trägt zu verschiedenen Krankheiten bei. Der mTOR/S6 Kinase-Signalweg ist bei mehreren Krebsarten fehlreguliert und resultiert in einer erhöhten Expression verschiedener Zielgene dieses Signalweges, wie z.B. ribosomaler Proteine und Translationsinitiationsfaktoren. Beispielsweise wurde eine erhöhte Expression von eIF4E beim Darmkrebs (Rosenwald *et al.*, 1999), erhöhte eIF4G-Werte in Lungenkarzinomen (Bauer *et al.*, 2002; Brass *et al.*, 1997), erhöhte eIF4A-Werte in Melanomen (Eberle *et al.*, 1997) und in Leberkarzinomen (Shuda *et al.*, 2000) und erhöhte Expressionen verschiedener Untereinheiten von eIF3 in mehreren Tumorarten gefunden (Hershey, 2000). Zudem führt die Überexpression verschiedener Translationsinitiationsfaktoren, wie z.B. von eIF4E und von eIF4G zur malignen Transformation (Fukuchi-Shimogori *et al.*, 1997; Lazaris-Karatzas *et al.*, 1992). Das bedeutet, dass Veränderungen in Signaltransduktionswegen die Translationsaktivität und daraus resultierend die Zelltransformation beeinflussen. Da Plakophilin1 und in einem geringeren Maß auch Plakophilin3 die Translation stimulieren (siehe Abb. 3.14), liegt die Vermutung nahe, dass diese Proteine möglicherweise eine Rolle in der Tumorgenese ausüben könnten. Diese Hypothese korreliert mit dem Befund der erhöhten Expression von Plakophilin1 und Plakophilin3 in verschiedenen Tumoren (Cheung *et al.*, 2007; Furukawa *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2007; Villaret *et al.*, 2000). Normalerweise fungieren Proteine, die eine reine Adhäsionsfunktion ausüben, wie z.B. E-Cadherin, als Tumorsuppressoren. So ist die Expression von E-Cadherin in Tumorzellen häufig vermindert (Birchmeier and Behrens, 1994; Jiang, 1996), während β -Catenin, welches neben seiner Adhäsionsfunktion auch als Transkriptionsaktivator im Zellkern fungiert, in Tumoren häufig überexprimiert wird (Rubinfeld *et al.*, 1997). Diese Daten implizieren, dass Plakophilin1 neben seiner Funktion in Desmosomen auch die Tumorzellproliferation, infolge der erhöhten Translationsaktivität, stimulieren könnte. Entsprechend den Daten für Plakophilin2, welches keinen Effekt auf die Translation hatte (siehe Abb. 3.14), existieren in der Literatur keinerlei Hinweise für eine erhöhte Expression in verschiedenen Tumoren.

4.1.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beschreiben erstmalig eine zytoplasmatische Funktion von Plakophilin1. Sie leisten einen Beitrag zum Verständnis des molekularen Mechanismus von Plakophilin1 während der Translationsinitiation. Plakophilin1 interagiert direkt mit eIF4A1 und reguliert über diesen die *cap*-abhängige Translation. Um weitere Hinweise über den Regulationsmechanismus von Plakophilin1 und eIF4A1 während der Translation zu erhalten, sind weiterführende Interaktionsstudien notwendig. Dabei ist es von Bedeutung, die einzelnen Bindungsmotive in Plakophilin1 und in eIF4A1 zu charakterisieren, Mutanten zu generieren und den Einfluss der Mutanten auf die Translation und die Aktivität von eIF4A1 zu analysieren.

Das in dieser Arbeit postulierte Modell impliziert, dass Plakophilin1 insbesondere die Translation solcher mRNAs beeinflussen könnte, welche lange und stark strukturierte 5'UTRs aufweisen. Um diese Hypothese zu bestätigen, ist es notwendig translationskontrollierte mRNA-Zieltranskripte für Plakophilin1 zu identifizieren und diese in weiterführenden *in vivo* und *in vitro* Studien zu analysieren.

Im Hefe-Dihybrid *screen* wurden neben eIF4A1 auch verschiedene Untereinheiten des eIF3-Komplexes und die S6 Kinase als putative Interaktionspartner für Plakophilin1 identifiziert. Um die Interaktion von Plakophilin1 mit den weiteren möglichen Interaktionspartnern zu validieren, müssen weitere Bindungsstudien und funktionelle Tests durchgeführt werden. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass Plakophilin1 die Translationsinitiation über eIF4A1 reguliert, jedoch ist ein zusätzlicher Einfluss über den eIF3-Komplex nicht auszuschließen. Dieses könnte z.B. über die IRES- (interne Ribosomen Eintrittsstelle) vermittelte Translationsinitiation untersucht werden. eIF4A1 beeinflusst die IRES-vermittelte Translation der Picornaviren, wie z.B. Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) und Polio-Virus (PV) (Pause *et al.*, 1994b; Svitkin *et al.*, 2001), aber auch die von zellulären mRNAs, wie z.B. *c-myc* und BiP (Thoma *et al.*, 2004). Die IRES-Elemente des Hepatitis-C-Virus (HCV) benötigen außer eIF3 und eIF2 keine weiteren Initiationsfaktoren (Pestova *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Plakophilin1 eine Funktion in der Kontrolle der Translation und der Proliferation besitzt. Hierbei stellt sich die Frage, wie diese *in vivo* reguliert wird und unter welchem physiologischen Kontext diese von Bedeutung ist.

Eine translations- und proliferationssteigernde Wirkung sowie eine adhäsionssteigernde Wirkung sind konträr-komplementär. Deshalb ist zu erwarten, dass proliferationssteigernde Signale die Funktion von Plakophilin1 in der Translation erhöhen und in der Adhäsion reduzieren bzw. adhäsionssteigernde Signale den Effekt umkehren. Daraus ergibt sich die Frage, wie das Gleichgewicht zwischen beiden Funktionen von Plakophilin1 in der Zelle reguliert ist. Der mTOR/S6 Kinase-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Translationsaktivität, indem er die Aktivität verschiedener Translationsinitiationsfaktoren über Phosphorylierung kontrolliert und darüber die Proteinsynthese beeinflusst (Übersicht in (Gingras *et al.*, 2001)). Die S6 Kinase stimuliert die Translationsinitiation durch Aktivierung des ribosomalen S6 Proteins und eIF4B (Raught *et al.*, 2004). Es gibt verschiedene Hinweise, dass die Regulation von Plakophilin1 über Phosphorylierung erfolgen könnte. (1) Daten einer zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigen, dass Plakophilin1 in verschiedenen isoelektrischen Varianten vorkommt (Hatzfeld, persönliche Mitteilung). (2) Die S6 Kinase ist ein putativer Interaktionspartner von Plakophilin1. (3) Nach Sequenzanalysen und Vorhersagen auf potentielle Phosphorylierungsstellen wird in der „Kopf“-Region von Plakophilin1 eine putative Zielsequenz der S6 Kinase oder der Akt/GSK3 β vermutet. Inwieweit die Regulation von Plakophilin1 während der Translation phosphorylierungsabhängig ist, müssen weiterführende Studien zeigen.

4.2 Funktion des p0071

4.2.1 Funktion des p0071 in der Zytokinese

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass p0071 in der Zytokinese am Zentralkörper akkumuliert und die Überexpression von p0071 einen Zytokinesedefekt induziert, welcher mit der Bildung von mehrkernigen Zellen einhergeht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Zellzyklus-abhängige Lokalisation von p0071 detailliert untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl endogenes als auch überexprimiertes p0071-DsRed während der Interphase an den Zentrosomen und während der Metaphase an den Spindelpolen lokalisierte. In der Anaphase wurde p0071 zum zentralen Mikrotubulibündel rekrutiert und akkumulierte während der Zytokinese am Zentralkörper (siehe Abb. 3.22 (Wolf *et al.*, 2006)). Diese Lokalisation ähnelte stark dem einiger Proteine, denen eine Funktion in der Chromosomensegregation, der Mitose oder der Zytokinese zugeschrieben wurde, so z.B. der Aurora-B Kinase (Bischoff and Plowman, 1999), der Citron Kinase (Madaule *et al.*, 2000), dem GAP-Protein MgcRacGAP (Hirose *et al.*, 2001) und dem GEF-Protein Ect2 (Tatsumoto *et al.*, 1999). Das deutet darauf hin, dass p0071 neben seiner Funktion in der Zell-Zell-Adhäsion auch eine Funktion in der Mitose/Zytokinese ausüben könnte.

Für viele Proteine, welche eine Funktion in der Zytokinese haben, ist bekannt, dass der *Knockdown* oder funktionsinhibierende Mutationen zu Defekten in der Zellteilung führen, die sich oft in Mehrkernigkeit oder gestörter Trennung der Chromosomen äußern (Übersicht in (Glotzer, 2001)). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl eine erhöhte Expression als auch der *Knockdown* von p0071 einen Zytokinesedefekt induziert (siehe Abb. 3.23 und Abb. 3.25). Dieser Zellteilungsdefekt beruhte nicht auf einer gestörten Chromosomensegregation, sondern vermutlich auf einer gestörten Zellabschnürung (siehe Abb. 3.27). Die Voraussetzung für die Trennung der Tochterzellen ist zum einen die Bildung des kontraktilen Ringes, ein Netzwerk aus Aktin- und Myosinfilamenten, und zum anderen der Neueinbau von Membran im Bereich der Teilungsfurche (Übersicht in (Glotzer, 2001)). Um zu sehen, welcher Prozess primär betroffen ist, wurde das Aktinzytoskelett am kontraktilen Ring nach p0071 *Knockdown* untersucht und eine erheblich verringerte Akkumulation von Aktin gezeigt (siehe Abb. 3.28). Daher wurde auf einen Defekt in der Bildung des kontraktilen Ringes geschlossen. Die Bildung des kontraktilen Ringes wird durch

die lokale Aktivierung von RhoA moduliert (Drechsel *et al.*, 1997; Glotzer, 2001; O'Connell *et al.*, 1999). Nach erfolgter Einschnürung muss RhoA inaktiviert und der kontraktile Ring abgebaut werden. Sowohl die Inhibierung von RhoA durch RNAi oder der C3-Transferase als auch die konstitutive Aktivierung von RhoA induziert einen Zytokinesedefekt (siehe Abb. 3.23 (Aktories and Hall, 1989; Drechsel *et al.*, 1997; Jantsch-Plunger *et al.*, 2000)). Die strikte Kontrolle der RhoA-Aktivität während der Mitose/Zytokinese ist somit essentiell für eine erfolgreiche Zellabschnürung. Komplementationsexperimente und RhoA-Aktivitätsstudien zeigten, dass der *Knockdown* von p0071 die RhoA-Aktivität inhibiert (siehe Abb. 3.29) und die Überexpression von p0071 die RhoA-Aktivität stimuliert (Wolf *et al.*, 2006). Diese Analysen deuten darauf hin, dass der von p0071 induzierte Zytokinesedefekt über RhoA vermittelt wird. Zudem geben diese Ergebnisse eine Erklärung warum sowohl der *Knockdown* als auch die Überexpression von p0071 einen Zellteilungsdefekt induzierte.

Um erste Hinweise über den molekularen Mechanismus der Aktivierung von RhoA durch p0071 zu erhalten, wurden zunächst Interaktionsstudien durchgeführt. Zum einen könnte p0071 die Rho-Aktivität direkt über RhoA selbst und zum anderen indirekt über ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) modulieren. Ect2 ist das einzige von 70 humanen GEF-Proteinen für Rho-GTPasen, für das eine essentielle Funktion in der Zytokinese beschrieben wurde (Garcia-Mata and Burridge, 2007; Kimura *et al.*, 2000; Tatsumoto *et al.*, 1999). Hierbei wurde festgestellt, dass p0071 sowohl mit wt-RhoA und der konstitutiv aktiven Form von RhoA (siehe Abb. 3.30) als auch mit der N-terminalen Domäne von Ect2 direkt interagiert (siehe Abb. 3.31). Da p0071 keine putative GEF-Domäne besitzt um RhoA zu aktivieren, liegt die Vermutung nahe, dass p0071 als Gerüstprotein fungiert, indem es über Ect2 die RhoA-Aktivität modulieren könnte.

Aufgrund dieser Überlegung stellte sich die Frage, ob die Lokalisation von p0071 am Zentralkörper über Ect2 vermittelt wird. Der Transport von Ect2 zur zentralen Spindel und zum Zentralkörper erfolgt über den Zentralspindlin-Komplex, welcher aus dem Rho-GAP Protein MgcRacGAP und dem Kinesin-6 MKLP1 besteht (Mishima *et al.*, 2002; Yuce *et al.*, 2005). Immunfluoreszenzanalysen nach *Knockdown* von Ect2 zeigten eine verminderte und diffuse Lokalisation von p0071 am Zentralkörper (siehe Abb. 3.34). Demgegenüber war die Lokalisation von Ect2 am Zentralkörper p0071 unabhängig. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Zentralspindlin-Komplex die zentralen Mikrotubuli stabilisiert und die Depletion von Ect2 die Bildung der Teilungsfurche beeinträchtigt (Chalamalasetty *et al.*,

2006). Die verminderte Akkumulation von p0071 am Zentralkörper könnte somit auf einem indirekten Effekt aufgrund fehlender Mikrotubuli-Stabilisierung beruhen. Neuere Studien zeigen, dass p0071 unabhängig von Ect2 durch das Kinesin Kif3b zum Zentralkörper transportiert wird (Keil et al., Manuskript in Revision). Jedoch schließt dieses einen zusätzlichen Einfluss von Ect2 und RhoA auf die Lokalisation von p0071 nicht aus, da nach Inhibierung der Rho-Kinasen mit Y27632 ein nahezu vollständiger Verlust von p0071 an den Zentrosomen, an der zentralen Spindel und am Zentralkörper zu verzeichnen war (Wolf *et al.*, 2006). Das bedeutet, dass die Lokalisation von p0071 am Zentralkörper zum einen durch Kif3b und zum anderen durch den Rho-Signalweg vermittelt wird.

Ect2 besitzt eine regulatorische N-terminale Domäne, zwei NLS und eine C-terminal gelegene katalytische Domäne. In der Interphase liegt Ect2 in einer inaktiven Konformation im Zellkern vor, in welcher die N-terminale regulatorische Domäne die katalytische Domäne inhibiert (Abb. 4.3 (Kim *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2004)). Diese Inhibierung wird durch Phosphorylierung am T341 durch Cdk1 (*cyclin dependent kinase1*) während der G2/M Phase aufgehoben (Hara *et al.*, 2006). Der Übergang in die offene Konformation ermöglicht vermutlich die Assoziation mit einem putativen Regulatorprotein, welches die katalytische Aktivität von Ect2 reguliert (Hara *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005). Das interne NLS ist für den Reimport des Proteins in den Zellkern, nach erfolgter Zytokinese, verantwortlich. Die Expression des N-terminalen Ect2-Fragmentes, dem das NLS und die katalytische Domäne fehlen, korreliert mit der Bildung von mehrkernigen Zellen (siehe Abb. 3.32 (Kim *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2003; Tatsumoto *et al.*, 1999)). Kimura und Kollegen zeigen, dass die Überexpression von Ect2 (1-333 AS) die RhoA-Aktivität in der Telophase inhibiert (Kimura *et al.*, 2000). Aufgrund dessen postulieren sie, dass der N-Terminus die GEF-Aktivität negativ beeinflussen könnte.

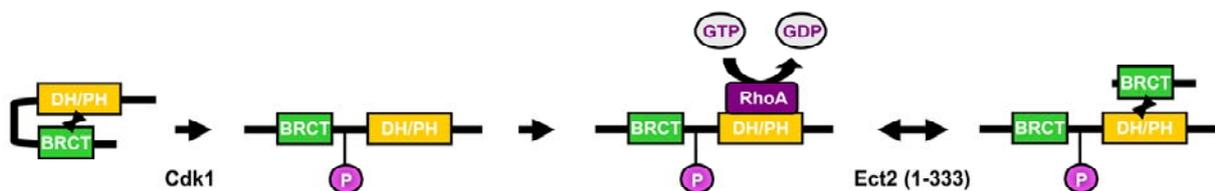


Abb. 4.3: Modell der Zellzyklus abhängigen Regulation von Ect2. Die N-terminale regulatorische Domäne von Ect2 inhibiert die katalytische Domäne in Interphase-Zellen. Während der G2/M-Phase wird Ect2 phosphoryliert und partiell aktiviert. Exogenes Ect2 (1-333) inhibiert die katalytische Domäne von endogenem Ect2. Abbildung modifiziert nach (Hara *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005).

Interessanterweise wurde nach Überexpression der regulatorischen Domäne von Ect2 (1-333 AS) und p0071 der Zytokinesedefekt von Ect2 stark vermindert (siehe Abb. 3.32). Dies könnte darauf hinweisen, dass p0071, durch die direkte Interaktion mit der regulatorischen Domäne von Ect2, die autoinhibierende Wirkung dieser Domäne aufhebt, indem es endogenes Ect2 verdrängt. Um diese Hypothese zu überprüfen müssen in weiterführenden Studien Ko-Immunpräzipitationsexperimente sowohl mit überexprimiertem Ect2 (1-333 AS) als auch mit Ect2 (1-333 AS) + p0071 durchgeführt werden. Diese Daten belegen, dass neben der direkten Interaktion zwischen p0071 und Ect2 auch eine funktionelle Assoziation *in vivo* stattfindet. Sie sind somit weitere Hinweise dafür, dass p0071 zusammen mit Ect2 die Rho-Aktivität modulieren könnte.

Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob p0071 die Austauschrate von RhoA direkt reguliert oder die Austauschaktivität von Ect2 erhöht. Die katalytische Aktivität von Ect2 wird durch den Phosphorylierungsstatus des Proteins reguliert (Tatsumoto *et al.*, 1999). Da die Phosphorylierung von Proteinen in *E. coli* nicht stattfindet, konnte der Guanin-Nukleotid-Austausch *Assay* nur mit gereinigten Flag-Fusionsproteinen und nicht mit rekombinanten hergestellten gereinigten Proteinen durchgeführt werden. Dabei wurde festgestellt, dass p0071 eine ähnlich hohe GDP/GTP Austauschaktivität wie Ect2 wt und deren katalytische Domäne (Ect2 414-883 AS) besitzt. In Kombination von p0071 und Ect2 wt war die GDP/GTP Austauschaktivität im Vergleich zu den Einzelkomponenten deutlich erhöht (siehe Abb. 3.35). Der Befund, dass p0071 allein eine GEF-Aktivität besitzt ist überraschend, da die Aminosäuresequenz von p0071 keine putative Domäne für eine mögliche GEF-Funktion aufweist. Eine mögliche Kontamination von Ect2 im p0071-Präzipitat kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Diese Analysen zeigen jedoch deutlich, dass p0071 zusammen mit Ect2 die Rho-Aktivität stimuliert und somit die Austauschaktivität von Ect2 reguliert.

Zusammenfassend lässt sich folgender Regulationsmechanismus für p0071 während der Zytokinese postulieren (Abb. 4.4). (1) p0071 interagiert mit Ect2 und da-RhoA am Zentralkörper. Dort stabilisiert p0071 RhoA in seiner aktiven Form und erhöht die GEF-Aktivität von Ect2. (2) Die erhöhte RhoA-Aktivität initiiert die Bildung und Kontraktion des kontraktilen Ringes. (3) Nach Erreichen eines gewissen GTP-RhoA Schwellenwertes dissoziiert p0071 aus diesem Komplex. (Lokalisation von p0071 am Zentralkörper ist nach Überexpression von da-RhoA vermindert (Wolf *et al.*, 2006)). (4) Dieses führt zu einer

Destabilisierung von Ect2 und RhoA, einer Verringerung der RhoA-Aktivität und Auflösung des kontraktiven Ringes. (5) Ect2 wird am T341 dephosphoryliert, inaktiviert und in den Zellkern transloziert.

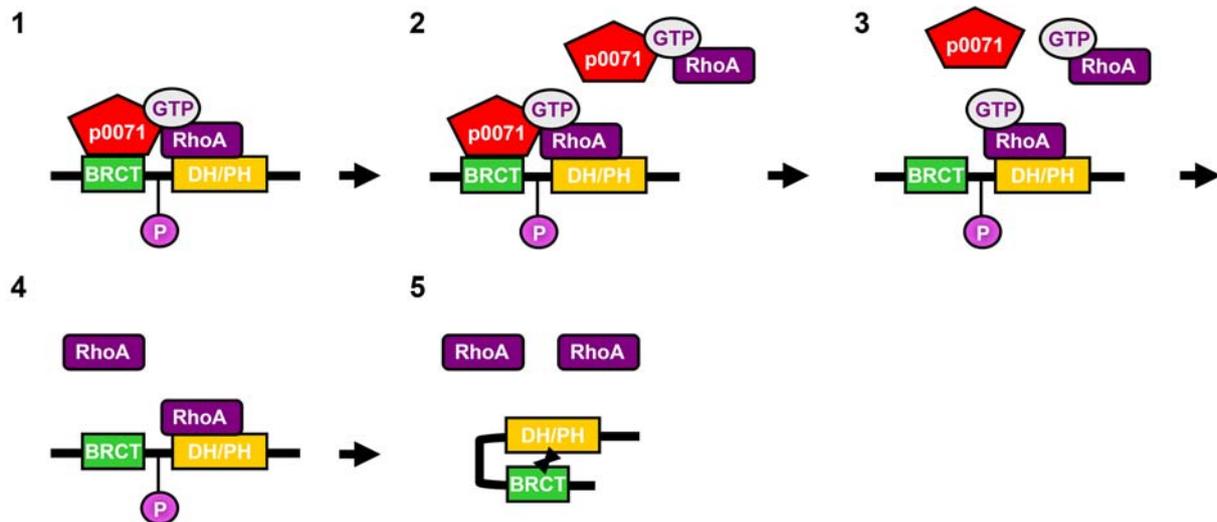


Abb. 4.4: Modell der putativen RhoA-Aktivierungsschritte an der zentralen Spindel. Die Bindung von p0071 an GTP-RhoA und Ect2 erhöht die Stabilität von RhoA in seiner aktiven Form und die GEF-Aktivität von Ect2. Nach Erreichen des GTP-RhoA Schwellenwertes, induziert die erhöhte RhoA-Aktivität die Deslokalisierung von p0071 vom Zentralkörper. Dieses führt vermutlich zur Destabilisierung und Inaktivierung des Ect2-RhoA-Komplexes.

Obwohl dieses Modell die verschiedenen Befunde dieser Arbeit widerspiegelt ist es nur eine vereinfachte Übersicht, welches nicht den Regulationsmechanismus des Gleichgewichtes zwischen dem GEF-Protein Ect2 und den GAP-Proteinen MgcRacGAP bzw. p190RhoGAP oder weitere Zytokinese relevanten Proteine beinhaltet. Ob, und wenn ja welche Funktionen p0071 bei der Inaktivierung von RhoA und der Zellabschnürung ausüben könnte, müssen weiterführende Studien zeigen.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Defizienz des eng verwandten p120^{ctn} in Keratinozyten einen Zytokinesedefekt aufgrund der Regression der Teilungsfurche induziert (Perez-Moreno *et al.*, 2008). Dieser Zellteilungsdefekt korrelierte mit einer erhöhten RhoA-Aktivität. Interessanterweise wurde auch ein Zytokinesedefekt in α -Catenin *Knockdown* Keratinozyten beobachtet (Vasioukhin *et al.*, 2001), welcher vermutlich auf eine erhöhte Rac-Aktivität zurückzuführen war (Kobielak and Fuchs, 2006). Diese Daten implizieren, dass die p120^{ctn}-verwandten Proteine eine essentielle Funktion in der Zellteilung ausüben, indem sie die Aktivität der Rho-GTPasen modulieren.

4.2.2 Regulation des Rho-Signalweges: Eine gemeinsame Funktion aller p120^{ctn}-verwandten Proteine?

Es ist bekannt, dass die p120^{ctn}-verwandten Proteine, wie z.B. p120^{ctn} selbst und δ -Catenin Funktionen im Rho-Signalweg ausüben (Übersicht in (Keil *et al.*, 2007)). Die hier präsentierten Daten legen die Vermutung nahe, dass die Mitglieder der p120^{ctn}-Proteinfamilie die RhoA-Aktivität in verschiedenen Bereichen und zellulären Prozessen regulieren. Die Überexpression von p120^{ctn} induziert einen *branching* Phänotyp, welcher durch die Inhibierung von RhoA und Aktivierung von Rac1 und Cdc42 vermittelt wird (Anastasiadis and Reynolds, 2000, 2001; Noren *et al.*, 2000). Die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 wird vermutlich über das GEF-Protein Vav2 und die Inaktivierung von RhoA über das GAP-Protein p190RhoGAP moduliert (Noren *et al.*, 2000; Wildenberg *et al.*, 2006). Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass Plakophilin1 mit einem GEF-Protein interagiert und über dieses Funktionen im Rho-Signalweg ausüben könnte (Hatzfeld, *et al.*, in Vorbereitung). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p0071 direkt mit dem GEF-Protein Ect2 interagiert, welches RhoA während der Zytokinese aktiviert. Es könnte daher sein, dass die Interaktion mit GEFs ein gemeinsames Merkmal der p120^{ctn}-verwandten Proteine ist, um den Rho-Signalweg zu regulieren. Zurzeit sind mehr als 20 Rho-GTPasen, 70 Rho-GEFs und 80 Rho-GAPs bekannt (Garcia-Mata and Burridge, 2007; Moon and Zheng, 2003). Viele GEF- und GAP-Proteine zeigen keine Spezifität für eine Rho-GTPase, wodurch ein sehr komplexes Signalkaskadennetzwerk entsteht. Um eine korrekte Zellantwort hervorzurufen sind zusätzliche Faktoren notwendig, welche die Regulation von GEFs und GAPs am richtigen Ort und zur richtigen Zeit gewährleisten. Diese wichtigen Funktionen könnten die p120^{ctn}-verwandten Proteine erfüllen, indem sie als Adapterproteine die Funktion der Regulatoren (GEFs und GAPs) koordinieren und dadurch die Spezifität des Signalweges herstellen.

4.2.3 Rolle von p0071 in der Tumorgenese

Die Rho-GTPasen spielen eine wesentliche und zentrale Rolle bei der Tumorprogression und der Metastasierung (Boettner and Van Aelst, 2002; Sahai and Marshall, 2002). Im Gegensatz zu den Ras-Proteinen sind in humanen Tumoren bis auf eine Ausnahme (RhoH) allerdings keine Mutationen in den Genen der Rho-Familie gefunden worden. Die tumorfördernde Wirkung der Rho-Proteine korreliert meist mit der veränderten

Aktivität ihrer Regulatorproteine (GEFs). Ect2 wurde ursprünglich als ein Protoonkogen identifiziert, welches nach Überexpression in epithelialen Zellen zur malignen Transformation führt (Miki *et al.*, 1993). Die transformierenden Eigenschaften von Ect2 sind auf eine Deletion der N-terminalen regulatorischen Domäne bzw. der Kernlokalisierungssignale im zentralen Bereich des Proteins zurückzuführen (Saito *et al.*, 2004; Solski *et al.*, 2004). Durch die Deletion kommt es zur verstärkten Lokalisation von Ect2 im Zytoplasma und damit vermutlich zu einer konstitutiven Aktivierung von RhoA, welche in malignen Transformationen resultiert (Saito *et al.*, 2004). Weiterhin wurde beschrieben, dass eine abnormale Aktivierung von ROCK eine wesentliche Rolle bei der Transformation, der Tumordinvasion und der Metastasierung spielt (Itoh *et al.*, 1999; Sahai *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass p0071 direkt mit Ect2 interagiert und dessen GEF-Aktivität stimuliert. Zudem induziert sowohl der *Knockdown* als auch die Überexpression von p0071 die Bildung von mehrkernigen Zellen. Mehrkernige Zellen sind hauptsächlich beim Sarkom und Karzinom anzutreffen. Diese Daten implizieren, dass p0071 über seine direkte Interaktion mit Ect2 die RhoA-Aktivität moduliert und somit eine Rolle bei der Tumorprogression und der Metastasierung ausüben könnte.

4.2.4 Ausblick

Die Zytokinese ist ein Prozess, in dem verschiedene Ereignisse koordiniert werden müssen. Zum einen muss sie zum richtigen Zeitpunkt während des Zellzyklus erfolgen und zum anderen muss sie, aufgrund der erforderlichen Symmetrie während der Zellteilung, die exakte räumliche Positionierung der Teilungsebene gewährleisten. Einige molekulare Mechanismen und Signaltransduktionswege, die diese Vorgänge steuern, sind aufgeklärt worden, jedoch ist man noch weit davon entfernt, die Molekularbiologie der Zytokinese zu verstehen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass p0071 eine essentielle Funktion in der Zytokinese ausübt. p0071 beeinflusst die Bildung des kontraktiven Ringes, indem es die Aktivierung von Ect2 und RhoA reguliert. Um die Zytokinese erfolgreich abzuschließen muss der kontraktile Ring abgebaut werden. Dafür ist eine Verringerung der Rho-Aktivität notwendig, welche zur Depolymerisation und damit zum Abbau der Aktinfilamente führt. Der genaue Regulationsmechanismus für die Inaktivierung von RhoA und die Abschnürung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Mögliche GAP-Proteine, die essentielle Funktionen in der Zytokinese

haben, sind MgcRacGAP und p190RhoGAP (Minoshima *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003). Ect2, MgcRacGAP und MKLP1 bilden einen Komplex und die Lokalisation von Ect2 an der zentralen Spindel hängt von dieser Komplexbildung ab (Nishimura and Yonemura, 2006; Yuce *et al.*, 2005; Zhao and Fang, 2005). Um weitere Hinweise zu erhalten, ob und wie p0071 die Zellabschnürung beeinflussen könnte, ist es von Bedeutung den p0071-Proteinkomplex am Zentralkörper zu charakterisieren. Hierbei wäre es interessant zu wissen, ob der p0071-Proteinkomplex neben Ect2 auch MgcRacGAP enthält oder ob es sich hierbei um zwei voneinander unabhängige Proteinkomplexe handelt.

Ein wichtiger Mechanismus der Aktivierung verschiedener Proteine mit Funktionen in der Zytokinese erfolgt mittels posttranslationaler Modifikation durch reversible Phosphorylierung (Hara *et al.*, 2006; Minoshima *et al.*, 2003; Tatsumoto *et al.*, 1999). Es ist daher interessant zu sehen, ob p0071 während der Zytokinese phosphoryliert wird. Sequenzanalysen und Vorhersagen auf potentielle Phosphorylierungsstellen von p0071 ergaben eine beträchtliche Anzahl an putativen Zielsequenzen für Aurora und Plk1. Um spezifische Phosphorylierungsstellen zu identifizieren müssen massenspektrometrische Analysen durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Die Plakophiline und p0071 gehören zur Familie der p120^{ctn}-verwandten Proteine. Neben ihrer subzellulären Verteilung an Zell-Zell-Kontakten weisen diese Proteine auch eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation auf. Diese duale Lokalisation in einer „*junctional*“ und „*non-junctional*“ Form impliziert, dass diese Proteine neben ihrer adhäsiven Funktion im Plaque auch eine Signalfunktion haben könnten, welche bereits für die verwandten Proteine β -Catenin, p120^{ctn}, ARVCF und δ -Catenin beschrieben wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig die zytoplasmatischen Funktionen von Plakophilin1 in der Translationskontrolle und von p0071 in der Regulation der Zytokinese beschrieben. Grundlage für die Charakterisierung der Funktion von Plakophilin1 in der Translationskontrolle war die Identifizierung verschiedener eukaryotischer Translationsinitiationsfaktoren (eIF4A1, eIF3S8, eIF3S5 und eIF3S6 IP) als potentielle Bindungspartner für Plakophilin1.

Plakophilin1 stimuliert die Proteinsynthese unabhängig von einer möglichen Funktion bei der Transkription. Anhand von Reporter-Gen-Studien wurde gezeigt, dass Plakophilin1 die Stimulation der Translationsaktivität über eine Stimulation der Translation und nicht über eine Stabilisierung der mRNA reguliert. Plakophilin1 stimuliert die Translation über die direkte Interaktion mit eIF4A1, eine ATPase/Helikase, und reguliert die Translationsinitiation auf zwei Ebenen. Zum einen moduliert Plakophilin1 die enzymatische Aktivität von eIF4A1 *in vitro* und zum anderen stimuliert Plakophilin1 die Rekrutierung von eIF4A1 zum *cap*-Initiationskomplex *in vivo*. Die Funktion von Plakophilin1 in der Translationskontrolle korreliert mit einer Funktion bei der Regulation von Proliferation und Zellgröße. Diese Daten geben eine mögliche Erklärung für die erhöhte Expression von Plakophilin1 in verschiedenen Tumoren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die zytoplasmatische Funktion des p0071 charakterisiert. p0071 lokalisiert während der Zytokinese am Zentralkörper und hat eine essentielle Funktion in der Zellteilung. Sowohl der *Knockdown* als auch die Überexpression von p0071 verhindern das normale Zellwachstum und induzieren einen Zytokinesedefekt, welcher sich in Mehrkernigkeit äußert. Diese Zytokinesedefekte korrelieren mit einer

Deregulation der RhoA-Aktivität. Die RhoA-GTPase ist ein wichtiger Regulator während der Zytokinese, welcher die Ausbildung des kontraktilen Ringes induziert. p0071 interagiert am Zentralkörper sowohl mit RhoA als auch mit Ect2, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF), der eine essentielle Funktion in der Regulation der Zytokinese ausübt. Basierend auf diesen Interaktionen stabilisiert p0071 die aktive Form von RhoA und erhöht die GEF-Aktivität von Ect2. p0071 und Ect2 wirken synergistisch bei der Aktivierung von RhoA. Diese Daten belegen eine essentielle Funktion von p0071 bei der räumlichen und zeitlichen Regulation des Rho-Signalweges während der Zytokinese.

6 Literatur

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**: 3797-3804.
- Adams, R.R., Tavares, A.A., Salzberg, A., Bellen, H.J., and Glover, D.M. (1998) pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev* **12**: 1483-1494.
- Adams, R.R., Maiato, H., Earnshaw, W.C., and Carmena, M. (2001) Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol* **153**: 865-880.
- Aktories, K., and Hall, A. (1989) Botulinum ADP-ribosyltransferase C3: a new tool to study low molecular weight GTP-binding proteins. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 415-418.
- Alberts, A.S. (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* **276**: 2824-2830.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**: 20246-20249.
- Anastasiadis, P.Z., and Reynolds, A.B. (2000) The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* **113** (Pt 8): 1319-1334.
- Anastasiadis, P.Z., and Reynolds, A.B. (2001) Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 604-610.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2002a) Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* **7**: 213-221.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2002b) Stressful initiations. *J Cell Sci* **115**: 3227-3234.
- Aspenstrom, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* **377**: 327-337.
- Barr, F.A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A. (2004) Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 429-440.
- Bauer, C., Brass, N., Diesinger, I., Kayser, K., Grasser, F.A., and Meese, E. (2002) Overexpression of the eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G-1) in squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer* **98**: 181-185.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**: 638-642.
- Behrens, J. (1999) Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* **18**: 15-30.
- Bi, X., and Goss, D.J. (2000) Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem* **275**: 17740-17746.
- Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* **1198**: 11-26.

- Bischoff, J.R., and Plowman, G.D. (1999) The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol* **9**: 454-459.
- Boettner, B., and Van Aelst, L. (2002) The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* **286**: 155-174.
- Bonne, S., van Hengel, J., Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. (1999) Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci* **112** (Pt **14**): 2265-2276.
- Bonne, S., Gilbert, B., Hatzfeld, M., Chen, X., Green, K.J., and van Roy, F. (2003) Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol* **161**: 403-416.
- Bordeleau, M.E., Matthews, J., Wojnar, J.M., Lindqvist, L., Novac, O., Jankowsky, E., Sonenberg, N., Northcote, P., Teesdale-Spittle, P., and Pelletier, J. (2005) Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10460-10465.
- Bordeleau, M.E., Cencic, R., Lindqvist, L., Oberer, M., Northcote, P., Wagner, G., and Pelletier, J. (2006) RNA-mediated sequestration of the RNA helicase eIF4A by Pateamine A inhibits translation initiation. *Chem Biol* **13**: 1287-1295.
- Bornslaeger, E.A., Godsel, L.M., Corcoran, C.M., Park, J.K., Hatzfeld, M., Kowalczyk, A.P., and Green, K.J. (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* **114**: 727-738.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**: 761-771.
- Brass, N., Heckel, D., Sahin, U., Pfreundschuh, M., Sybrecht, G.W., and Meese, E. (1997) Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma. *Hum Mol Genet* **6**: 33-39.
- Calkins, C.C., Hoepner, B.L., Law, C.M., Novak, M.R., Setzer, S.V., Hatzfeld, M., and Kowalczyk, A.P. (2003) The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *J Biol Chem* **278**: 1774-1783.
- Chalamalasetty, R.B., Hummer, S., Nigg, E.A., and Sillje, H.H. (2006) Influence of human Ect2 depletion and overexpression on cleavage furrow formation and abscission. *J Cell Sci* **119**: 3008-3019.
- Chan, K.M., Delfert, D., and Junger, K.D. (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* **157**: 375-380.
- Chen, X., Bonne, S., Hatzfeld, M., van Roy, F., and Green, K.J. (2002) Protein binding and functional characterization of Plakophilin 2: Evidence for its diverse roles in Desmosomes and {beta}-catenin signaling. *J Biol Chem* **14**: 14.
- Cheung, I.Y., Feng, Y., Danis, K., Shukla, N., Meyers, P., Ladanyi, M., and Cheung, N.K. (2007) Novel markers of subclinical disease for Ewing family tumors from gene expression profiling. *Clin Cancer Res* **13**: 6978-6983.
- Choi, H.J., and Weis, W.I. (2005) Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol* **346**: 367-376.
- Conroy, S.C., Dever, T.E., Owens, C.L., and Merrick, W.C. (1990) Characterization of the 46,000-dalton subunit of eIF-4F. *Arch Biochem Biophys* **282**: 363-371.

- Cowin, P., Kapprell, H.P., Franke, W.W., Tamkun, J., and Hynes, R.O. (1986) Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* **46**: 1063-1073.
- Dang, Y., Kedersha, N., Low, W.K., Romo, D., Gorospe, M., Kaufman, R., Anderson, P., and Liu, J.O. (2006) Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J Biol Chem* **281**: 32870-32878.
- Daniel, J.M., and Reynolds, A.B. (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* **19**: 3614-3623.
- Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B. (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163**: 525-534.
- De Benedetti, A., Joshi-Barve, S., Rinker-Schaeffer, C., and Rhoads, R.E. (1991) Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F. *Mol Cell Biol* **11**: 5435-5445.
- De Gregorio, E., Preiss, T., and Hentze, M.W. (1999) Translation driven by an eIF4G core domain in vivo. *Embo J* **18**: 4865-4874.
- DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* **15**: 356-363.
- Dickson, R.B., Bates, S.E., McManaway, M.E., and Lippman, M.E. (1986) Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* **46**: 1707-1713.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Hall, A., and Glotzer, M. (1997) A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Curr Biol* **7**: 12-23.
- Duncan, R., Milburn, S.C., and Hershey, J.W. (1987) Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* **262**: 380-388.
- Eberle, J., Krasagakis, K., and Orfanos, C.E. (1997) Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro. *Int J Cancer* **71**: 396-401.
- Echeverri, C.J., and Perrimon, N. (2006) High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat Rev Genet* **7**: 373-384.
- Ersoy-Evans, S., Erkin, G., Fassihi, H., Chan, I., Paller, A.S., Surucu, S., and McGrath, J.A. (2006) Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome resulting from a new homozygous mutation, 888delC, in the desmosomal protein plakophilin 1. *J Am Acad Dermatol* **55**: 157-161.
- Etchison, D., Milburn, S.C., Edery, I., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (1982) Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem* **257**: 14806-14810.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635.
- Fang, X., Ji, H., Kim, S.W., Park, J.I., Vaught, T.G., Anastasiadis, P.Z., Ciesiolka, M., and McCrea, P.D. (2004) Vertebrate development requires ARVCF and p120 catenins and their interplay with RhoA and Rac. *J Cell Biol* **165**: 87-98.

- Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (1998) PDZ domains and the formation of protein networks at the plasma membrane. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**: 209-233.
- Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002) Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* **16**: 1472-1487.
- Flemming, W. (1891) Neue Beiträge zur Kenntnis der Zelle. *Arc. Anat.* **37**: 685-751.
- Fukuchi-Shimogori, T., Ishii, I., Kashiwagi, K., Mashiba, H., Ekimoto, H., and Igarashi, K. (1997) Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Cancer Res* **57**: 5041-5044.
- Fukunaga, R., and Hunter, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J* **16**: 1921-1933.
- Furukawa, C., Daigo, Y., Ishikawa, N., Kato, T., Ito, T., Tsuchiya, E., Sone, S., and Nakamura, Y. (2005) Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* **65**: 7102-7110.
- Garcia-Mata, R., and Burridge, K. (2007) Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol* **17**: 36-43.
- Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., Paul, M., Basson, C.T., McDermott, D.A., Lerman, B.B., Markowitz, S.M., Ellinor, P.T., MacRae, C.A., Peters, S., Grossmann, K.S., Drenckhahn, J., Michely, B., Sasse-Klaassen, S., Birchmeier, W., Dietz, R., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E., and Thierfelder, L. (2004) Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* **36**: 1162-1164.
- Gey, G.O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T. (1952) Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* **12**: 264-265.
- Giet, R., and Glover, D.M. (2001) Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* **152**: 669-682.
- Gingras, A.C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N., and Hay, N. (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* **12**: 502-513.
- Gingras, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999a) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* **13**: 1422-1437.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999b) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**: 913-963.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* **15**: 807-826.
- Glotzer, M. (2001) Animal cell cytokinesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 351-386.
- Glotzer, M. (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* **307**: 1735-1739.
- Goodfellow, I.G., and Roberts, L.O. (2007) Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.

- Green, K.J., and Gaudry, C.A. (2000) Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 208-216.
- Grifo, J.A., Abramson, R.D., Satler, C.A., and Merrick, W.C. (1984) RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem* **259**: 8648-8654.
- Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M., and Bershadsky, A.D. (2001) p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* **114**: 695-707.
- Grossmann, K.S., Grund, C., Huelsken, J., Behrend, M., Erdmann, B., Franke, W.W., and Birchmeier, W. (2004) Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol* **167**: 149-160.
- Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E.A., and Barr, F.A. (2004) Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol* **166**: 167-172.
- Gruneberg, U., Neef, R., Li, X., Chan, E.H., Chalamalasetty, R.B., Nigg, E.A., and Barr, F.A. (2006) KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *J Cell Biol* **172**: 363-372.
- Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995) Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *Embo J* **14**: 5701-5709.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514.
- Hall, A. (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**: 891-895.
- Hamada, T., South, A.P., Mitsuhashi, Y., Kinebuchi, T., Bleck, O., Ashton, G.H., Hozumi, Y., Suzuki, T., Hashimoto, T., Eady, R.A., and McGrath, J.A. (2002) Genotype-phenotype correlation in skin fragility-ectodermal dysplasia syndrome resulting from mutations in plakophilin 1. *Exp Dermatol* **11**: 107-114.
- Hannon, G.J., and Rossi, J.J. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* **431**: 371-378.
- Hara, T., Abe, M., Inoue, H., Yu, L.R., Veenstra, T.D., Kang, Y.H., Lee, K.S., and Miki, T. (2006) Cytokinesis regulator ECT2 changes its conformation through phosphorylation at Thr-341 in G2/M phase. *Oncogene* **25**: 566-578.
- Hatta, K., Nose, A., Nagafuchi, A., and 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* **106**: 873-881.
- Hatzfeld, M., Kristjansson, G.I., Plessmann, U., and 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* **107** (Pt 8): 2259-2270.
- Hatzfeld, M., and 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* **109** (Pt 11): 2767-2778.
- Hatzfeld, M. (1999) The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol* **186**: 179-224.
- Hatzfeld, M., Haffner, C., Schulze, K., and Vizens, U. (2000) The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol* **149**: 209-222.

- Hatzfeld, M., Green, K.J., and Sauter, H. (2003) Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *J Cell Sci* **116**: 1219-1233.
- Hatzfeld, M. (2005) The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* **84**: 205-214.
- Hatzfeld, M. (2007) Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta* **1773**: 69-77.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**: 1926-1945.
- Heid, H.W., Schmidt, A., Zimbelmann, R., Schafer, S., Winter-Simanowski, S., Stumpp, S., Keith, M., Figge, U., Schnolzer, M., and Franke, W.W. (1994) Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation* **58**: 113-131.
- Hershey, J.W.B.a.M., S. (2000) Translational control and cancer. In *Translational control of gene expression* (ed. M.B. Mathews): pp. 637-654.
- Hinnebusch, A.G. (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* **31**: 553-562.
- Hirose, K., Kawashima, T., Iwamoto, I., Nosaka, T., and Kitamura, T. (2001) MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody. *J Biol Chem* **276**: 5821-5828.
- Ho, C., Zhou, J., Medina, M., Goto, T., Jacobson, M., Bhide, P.G., and Kosik, K.S. (2000) delta-catenin is a nervous system-specific adherens junction protein which undergoes dynamic relocalization during development. *J Comp Neurol* **420**: 261-276.
- Hoffman, G.R., Nassar, N., and Cerione, R.A. (2000) Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**: 345-356.
- Hofmann, I., Mertens, C., Brettel, M., Nimmrich, V., Schnolzer, M., and Herrmann, H. (2000) Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci* **113** (Pt 13): 2471-2483.
- Hofmann, I., Casella, M., Schnolzer, M., Schlechter, T., Spring, H., and Franke, W.W. (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**: 1388-1398.
- Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 318-327.
- Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**: 569-580.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**: 789-798.
- Hu, C.D., and Kerppola, T.K. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**: 539-545.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* **90**: 871-882.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., and Kemler, R. (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**: 3-10.

- Hutchins, A.P., Roberts, G.R., Lloyd, C.W., and Doonan, J.H. (2004) In vivo interaction between CDKA and eIF4A: a possible mechanism linking translation and cell proliferation. *FEBS Lett* **556**: 91-94.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., and Singer, R.H. (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**: 512-515.
- Hynes, R.O., and Lander, A.D. (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* **68**: 303-322.
- Imataka, H., and Sonenberg, N. (1997) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* **17**: 6940-6947.
- Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *Embo J* **17**: 7480-7489.
- Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999) An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* **5**: 221-225.
- Izawa, I., Nishizawa, M., Tomono, Y., Ohtakara, K., Takahashi, T., and Inagaki, M. (2002) ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells. *Genes Cells* **7**: 475-485.
- Jantsch-Plunger, V., Gonczy, P., Romano, A., Schnabel, H., Hamill, D., Schnabel, R., Hyman, A.A., and Glotzer, M. (2000) CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis. *J Cell Biol* **149**: 1391-1404.
- Jaulin-Bastard, F., Arsanto, J.P., Le Bivic, A., Navarro, C., Vely, F., Saito, H., Marchetto, S., Hatzfeld, M., Santoni, M.J., Birnbaum, D., and Borg, J.P. (2002) Interaction between Erbin and a Catenin-related protein in epithelial cells. *J Biol Chem* **277**: 2869-2875.
- Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., Liang, M.C., Cai, D., Naumov, G.N., Bao, L., Contreras, C.M., Li, D., Chen, L., Krishnamurthy, J., Koivunen, J., Chirieac, L.R., Padera, R.F., Bronson, R.T., Lindeman, N.I., Christiani, D.C., Lin, X., Shapiro, G.I., Janne, P.A., Johnson, B.E., Meyerson, M., Kwiatkowski, D.J., Castrillon, D.H., Bardeesy, N., Sharpless, N.E., and Wong, K.K. (2007) LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* **448**: 807-810.
- Jiang, W.G. (1996) E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* **83**: 437-446.
- Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J.S., and Miki, T. (2006) Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. *Mol Biol Cell* **17**: 43-55.
- Kapprell, H.P., Owaribe, K., and Franke, W.W. (1988) Identification of a basic protein of Mr 75,000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia. *J Cell Biol* **106**: 1679-1691.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., and Kaibuchi, K. (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* **147**: 1023-1038.
- Kedersha, N., and Anderson, P. (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* **30**: 963-969.

- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I.J., Stahl, J., and Anderson, P. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* **13**: 195-210.
- Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* **147**: 1431-1442.
- Keil, R., Wolf, A., Huttelmaier, S., and Hatzfeld, M. (2007) Beyond regulation of cell adhesion: local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin. *Cell Cycle* **6**: 122-127.
- Kim, J.E., Billadeau, D.D., and Chen, J. (2005) The tandem BRCT domains of Ect2 are required for both negative and positive regulation of Ect2 in cytokinesis. *J Biol Chem* **280**: 5733-5739.
- Kim, K., Sirota, A., Chen Yh, Y.H., Jones, S.B., Dudek, R., Lanford, G.W., Thakore, C., and Lu, Q. (2002) Dendrite-like process formation and cytoskeletal remodeling regulated by delta-catenin expression. *Exp Cell Res* **275**: 171-184.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**: 245-248.
- Kimura, K., Tsuji, T., Takada, Y., Miki, T., and Narumiya, S. (2000) Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation. *J Biol Chem* **275**: 17233-17236.
- Kitajima, Y. (2002) Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clin Exp Dermatol* **27**: 684-690.
- Kobielak, A., and Fuchs, E. (2006) Links between alpha-catenin, NF-kappaB, and squamous cell carcinoma in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2322-2327.
- Koch, P.J., Goldschmidt, M.D., Walsh, M.J., Zimbelmann, R., and Franke, W.W. (1991) Complete amino acid sequence of the epidermal desmoglein precursor polypeptide and identification of a second type of desmoglein gene. *Eur J Cell Biol* **55**: 200-208.
- Korneeva, N.L., First, E.A., Benoit, C.A., and Rhoads, R.E. (2005) Interaction between the NH2-terminal domain of eIF4A and the central domain of eIF4G modulates RNA-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* **280**: 1872-1881.
- Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Inagaki, M. (2000) Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene* **19**: 6059-6064.
- Kowalczyk, A.P., Hatzfeld, M., Bornslaeger, E.A., Kopp, D.S., Borgwardt, J.E., Corcoran, C.M., Settler, A., and Green, K.J. (1999) The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *J Biol Chem* **274**: 18145-18148.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**: 1942-1952.
- Krakstad, B.F., Ardawatia, V.V., and Aragay, A.M. (2004) A role for Galpha12/Galpha13 in p120ctn regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10314-10319.
- Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K., and Ito, M. (1997) Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* **272**: 12257-12260.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamphear, B.J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H.D., Klump, H., Kuechler, E., Skern, T., and Rhoads, R.E. (1993) Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Cocksackievirus and rhinovirus. *J Biol Chem* **268**: 19200-19203.
- Lamphear, B.J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R.E. (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* **270**: 21975-21983.
- Laura, R.P., Witt, A.S., Held, H.A., Gerstner, R., Deshayes, K., Koehler, M.F., Kosik, K.S., Sidhu, S.S., and Lasky, L.A. (2002) The Erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl termini of delta-catenin and ARVCF. *J Biol Chem* **277**: 12906-12914.
- Lazaris-Karatzas, A., Smith, M.R., Frederickson, R.M., Jaramillo, M.L., Liu, Y.L., Kung, H.F., and Sonenberg, N. (1992) Ras mediates translation initiation factor 4E-induced malignant transformation. *Genes Dev* **6**: 1631-1642.
- Lindqvist, L., Imataka, H., and Pelletier, J. (2008a) Cap-dependent eukaryotic initiation factor-mRNA interactions probed by cross-linking. *Rna* **14**: 960-969.
- Lindqvist, L., Oberer, M., Reibarkh, M., Cencic, R., Bordeleau, M.E., Vogt, E., Marintchev, A., Tanaka, J., Fagotto, F., Altmann, M., Wagner, G., and Pelletier, J. (2008b) Selective pharmacological targeting of a DEAD box RNA helicase. *PLoS ONE* **3**: e1583.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**: 837-847.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Low, W.K., Dang, Y., Schneider-Poetsch, T., Shi, Z., Choi, N.S., Merrick, W.C., Romo, D., and Liu, J.O. (2005) Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A. *Mol Cell* **20**: 709-722.
- Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1998) Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* **394**: 491-494.
- Madaule, P., Furuyashiki, T., Eda, M., Bito, H., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2000) Citron, a Rho target that affects contractility during cytokinesis. *Microsc Res Tech* **49**: 123-126.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995) The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* **15**: 4990-4997.
- Majumdar, R., Bandyopadhyay, A., and Maitra, U. (2003) Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J Biol Chem* **278**: 6580-6587.
- Mareel, M., Boterberg, T., Noe, V., Van Hoorde, L., Vermeulen, S., Bruyneel, E., and Bracke, M. (1997) E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J Cell Physiol* **173**: 271-274.
- Mariner, D.J., Wang, J., and Reynolds, A.B. (2000) ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120(ctn) in E-cadherin complexes. *J Cell Sci* **113** (Pt 8): 1481-1490.

- Martinez, M.C., Ochiishi, T., Majewski, M., and Kosik, K.S. (2003) Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho. *J Cell Biol* **162**: 99-111.
- Mathews, M.B., Sonenberg, N., and Hershey, J.W.B. (2000) Origins and principles of translational control. In *Translational control of gene expression* (ed. N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews): pp. 1-31.
- Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M.E., Kaufman, R.J., Northcote, P., Tanaka, J., Gallouzi, I., and Pelletier, J. (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell* **17**: 4212-4219.
- McGrath, J.A., McMillan, J.R., Shemanko, C.S., Runswick, S.K., Leigh, I.M., Lane, E.B., Garrod, D.R., and Eady, R.A. (1997) Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet* **17**: 240-244.
- McGrath, J.A., Hoeger, P.H., Christiano, A.M., McMillan, J.R., Mellerio, J.E., Ashton, G.H., Dopping-Hepenstal, P.J., Lake, B.D., Leigh, I.M., Harper, J.I., and Eady, R.A. (1999) Skin fragility and hypohidrotic ectodermal dysplasia resulting from ablation of plakophilin 1. *Br J Dermatol* **140**: 297-307.
- Mechanic, S., Raynor, K., Hill, J.E., and Cowin, P. (1991) Desmocollins form a distinct subset of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4476-4480.
- Mertens, C., Kuhn, C., and Franke, W.W. (1996) Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol* **135**: 1009-1025.
- Mertens, C., Hofmann, I., Wang, Z., Teichmann, M., Sepelchik, S., Schnolzer, M., and Franke, W.W. (2001) Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7795-7800.
- Miki, T., Smith, C.L., Long, J.E., Eva, A., and Fleming, T.P. (1993) Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature* **362**: 462-465.
- Minich, W.B., Balasta, M.L., Goss, D.J., and Rhoads, R.E. (1994) Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7668-7672.
- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonzuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M., and Kitamura, T. (2003) Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* **4**: 549-560.
- Mishima, M., Kaitna, S., and Glotzer, M. (2002) Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev Cell* **2**: 41-54.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**: 391-399.
- Mollinari, C., Kleman, J.P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., and Margolis, R.L. (2002) PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* **157**: 1175-1186.
- Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1999) *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* **285**: 2126-2129.

- Moon, S.Y., and Zheng, Y. (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**: 13-22.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y.V., Pestova, T.V., and Sonenberg, N. (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol Cell Biol* **20**: 468-477.
- Murata-Hori, M., Suizu, F., Iwasaki, T., Kikuchi, A., and Hosoya, H. (1999) ZIP kinase identified as a novel myosin regulatory light chain kinase in HeLa cells. *FEBS Lett* **451**: 81-84.
- Nishimura, Y., and Yonemura, S. (2006) Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci* **119**: 104-114.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**: 1235-1244.
- Noren, N.K., Liu, B.P., Burridge, K., and Kreft, B. (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* **150**: 567-580.
- Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1987) Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *Embo J* **6**: 3655-3661.
- Oberer, M., Marintchev, A., and Wagner, G. (2005) Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G. *Genes Dev* **19**: 2212-2223.
- O'Connell, C.B., Wheatley, S.P., Ahmed, S., and Wang, Y.L. (1999) The small GTP-binding protein rho regulates cortical activities in cultured cells during division. *J Cell Biol* **144**: 305-313.
- Olofsson, B. (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**: 545-554.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M., and Hentze, M.W. (1997) mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell* **89**: 597-606.
- Paffenholz, R., and Franke, W.W. (1997) Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation* **61**: 293-304.
- Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., Jr., and Sonenberg, N. (1994a) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**: 762-767.
- Pause, A., Methot, N., Svitkin, Y., Merrick, W.C., and Sonenberg, N. (1994b) Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *Embo J* **13**: 1205-1215.
- Perez-Moreno, M., Song, W., Pasolli, H.A., Williams, S.E., and Fuchs, E. (2008) Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15399-15404.
- Pestova, T.V., Borukhov, S.I., and Hellen, C.U. (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**: 854-859.

- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., and Hellen, C.U. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7029-7036.
- Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**: 1837-1851.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., and Prokhortchouk, E. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* **15**: 1613-1618.
- Prokopenko, S.N., Brumby, A., O'Keefe, L., Prior, L., He, Y., Saint, R., and Bellen, H.J. (1999) A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in Drosophila. *Genes Dev* **13**: 2301-2314.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *Embo J* **18**: 270-279.
- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**: 23-32.
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (2004) Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *Embo J* **23**: 1761-1769.
- Reynolds, A.B., Roesel, D.J., Kanner, S.B., and Parsons, J.T. (1989) Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol* **9**: 629-638.
- Reynolds, A.B., Daniel, J.M., Mo, Y.Y., Wu, J., and Zhang, Z. (1996) The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* **225**: 328-337.
- Reynolds, A.B., and Roczniak-Ferguson, A. (2004) Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* **23**: 7947-7956.
- Richter, N.J., Rogers, G.W., Jr., Hensold, J.O., and Merrick, W.C. (1999) Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem* **274**: 35415-35424.
- Richter-Cook, N.J., Dever, T.E., Hensold, J.O., and Merrick, W.C. (1998) Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem* **273**: 7579-7587.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 389-399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401-410.
- Ridley, A.J. (2004) Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat* **84**: 13-19.
- Riggleman, B., Wieschaus, E., and 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* **3**: 96-113.
- Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dolz, R., Jahnig, F., Epplen, J., Mayer, S., and et al. (1987) The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *Embo J* **6**: 3647-3653.

- RNAi?, W. (2003) Whither RNAi? *Nat Cell Biol* **5**: 489-490.
- Rogers, G.W., Jr., Richter, N.J., and Merrick, W.C. (1999) Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem* **274**: 12236-12244.
- Rogers, G.W., Jr., Richter, N.J., Lima, W.F., and Merrick, W.C. (2001) Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* **276**: 30914-30922.
- Rogers, G.W., Jr., Komar, A.A., and Merrick, W.C. (2002) eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 307-331.
- Rosenwald, I.B., Chen, J.J., Wang, S., Savas, L., London, I.M., and Pullman, J. (1999) Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene* **18**: 2507-2517.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., and Sonenberg, N. (1990) Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol* **10**: 1134-1144.
- Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997) Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275**: 1790-1792.
- Sahai, E., Alberts, A.S., and Treisman, R. (1998) RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *Embo J* **17**: 1350-1361.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* **2**: 133-142.
- Saito, S., Tatsumoto, T., Lorenzi, M.V., Chedid, M., Kapoor, V., Sakata, H., Rubin, J., and Miki, T. (2003) Rho exchange factor ECT2 is induced by growth factors and regulates cytokinesis through the N-terminal cell cycle regulator-related domains. *J Cell Biochem* **90**: 819-836.
- Saito, S., Liu, X.F., Kamijo, K., Raziuddin, R., Tatsumoto, T., Okamoto, I., Chen, X., Lee, C.C., Lorenzi, M.V., Ohara, N., and Miki, T. (2004) Dereglulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J Biol Chem* **279**: 7169-7179.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A., and Collard, J.G. (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**: 1009-1022.
- Schafer, S., Koch, P.J., and Franke, W.W. (1994) Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* **211**: 391-399.
- Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**: 253-262.
- Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Prätzel, S., Zimbelmann, R., and Franke, W.W. (1997) Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res* **290**: 481-499.
- Schmidt, A., Langbein, L., Pratzel, S., Rode, M., Rackwitz, H.R., and Franke, W.W. (1999) Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation* **64**: 291-306.
- Schmidt, A., and Jager, S. (2005) Plakophilins--hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *Eur J Cell Biol* **84**: 189-204.

- Schumacher, J.M., Golden, A., and Donovan, P.J. (1998) AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol* **143**: 1635-1646.
- Sellers, J.R., Pato, M.D., and Adelstein, R.S. (1981) Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin. *J Biol Chem* **256**: 13137-13142.
- Setzer, S.V., Calkins, C.C., Garner, J., Summers, S., Green, K.J., and Kowalczyk, A.P. (2004) Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of a431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration. *J Invest Dermatol* **123**: 426-433.
- Severson, A.F., Hamill, D.R., Carter, J.C., Schumacher, J., and Bowerman, B. (2000) The aurora-related kinase AIR-2 recruits ZEN-4/CeMKLP1 to the mitotic spindle at metaphase and is required for cytokinesis. *Curr Biol* **10**: 1162-1171.
- Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., and Kozma, S.C. (1998) Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *Embo J* **17**: 6649-6659.
- Shuda, M., Kondoh, N., Tanaka, K., Ryo, A., Wakatsuki, T., Hada, A., Goseki, N., Igari, T., Hatsuse, K., Aihara, T., Horiuchi, S., Shichita, M., Yamamoto, N., and Yamamoto, M. (2000) Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* **20**: 2489-2494.
- Sirotkin, H., O'Donnell, H., DasGupta, R., Halford, S., St Jore, B., Puech, A., Parimoo, S., Morrow, B., Skoultschi, A., Weissman, S.M., Scambler, P., and Kucherlapati, R. (1997) Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics* **41**: 75-83.
- Sklyarova, T., Bonne, S., D'Hooge, P., Denecker, G., Goossens, S., De Rycke, R., Borgonie, G., Bosl, M., van Roy, F., and van Hengel, J. (2008) Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* **128**: 1375-1385.
- Smith, E.A., and Fuchs, E. (1998) Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol* **141**: 1229-1241.
- Solski, P.A., Wilder, R.S., Rossman, K.L., Sondek, J., Cox, A.D., Campbell, S.L., and Der, C.J. (2004) Requirement for C-terminal sequences in regulation of Ect2 guanine nucleotide exchange specificity and transformation. *J Biol Chem* **279**: 25226-25233.
- Sonenberg, N., Morgan, M.A., Merrick, W.C., and Shatkin, A.J. (1978) A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 4843-4847.
- South, A.P., Wan, H., Stone, M.G., Dopping-Hepenstal, P.J., Purkis, P.E., Marshall, J.F., Leigh, I.M., Eady, R.A., Hart, I.R., and McGrath, J.A. (2003) Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *J Cell Sci* **116**: 3303-3314.
- Stohr, N., Lederer, M., Reinke, C., Meyer, S., Hatzfeld, M., Singer, R.H., and Huttelmaier, S. (2006) ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol* **175**: 527-534.
- Su, L., Agati, J.M., and Parsons, S.J. (2003) p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis. *J Cell Biol* **163**: 571-582.
- Svitkin, Y.V., Pause, A., Haghighat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G.J., and Sonenberg, N. (2001) The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *Rna* **7**: 382-394.

- Takeichi, M. (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 806-811.
- Tatsuka, M., Katayama, H., Ota, T., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F., and Terada, Y. (1998) Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res* **58**: 4811-4816.
- Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I., and Miki, T. (1999) Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol* **147**: 921-928.
- Terada, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Yasuda, Y., Fujita, S., and Otsu, M. (1998) AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *Embo J* **17**: 667-676.
- Thoma, C., Bergamini, G., Galy, B., Hundsdoerfer, P., and Hentze, M.W. (2004) Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. *Mol Cell* **15**: 925-935.
- Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Daniel, J.M., Ireton, R.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hummingbird, D.K., and Reynolds, A.B. (2000) Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* **148**: 189-202.
- Tourriere, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J.M., Bertrand, E., and Tazi, J. (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* **160**: 823-831.
- van Hengel, J., Vanhoenacker, P., Staes, K., and van Roy, F. (1999) Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7980-7985.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Degenstein, L., Wise, B., and Fuchs, E. (2001) Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin. *Cell* **104**: 605-617.
- Villaret, D.B., Wang, T., Dillon, D., Xu, J., Sivam, D., Cheever, M.A., and Reed, S.G. (2000) Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* **110**: 374-381.
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., and Cooper, J.A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* **16**: 1909-1920.
- Wheatley, S.P., and Wang, Y. (1996) Midzone microtubule bundles are continuously required for cytokinesis in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* **135**: 981-989.
- Whitlock, N.V., Haftek, M., Angoulvant, N., Wolf, F., Perrot, H., Eady, R.A., and McGrath, J.A. (2000) Genomic amplification of the human plakophilin 1 gene and detection of a new mutation in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *J Invest Dermatol* **115**: 368-374.
- Whitlock, N.V., and Bower, C. (2003) Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. *J Invest Dermatol* **120**: 523-530.
- Wieschaus, E., and Riggelman, R. (1987) Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **49**: 177-184.
- Wildenberg, G.A., Dohn, M.R., Carnahan, R.H., Davis, M.A., Lobdell, N.A., Settleman, J., and Reynolds, A.B. (2006) p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* **127**: 1027-1039.

- Wolf, A., Keil, R., Gotzl, O., Mun, A., Schwarze, K., Lederer, M., Huttelmaier, S., and Hatzfeld, M. (2006) The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* **8**: 1432-1440.
- Yamada, T., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2006) Regulation of cytokinesis by mgcRacGAP in B lymphocytes is independent of GAP activity. *Exp Cell Res* **312**: 3517-3525.
- Yamashiro, S., Totsukawa, G., Yamakita, Y., Sasaki, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Matsumura, F. (2003) Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol Biol Cell* **14**: 1745-1756.
- Yap, A.S., Niessen, C.M., and Gumbiner, B.M. (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* **141**: 779-789.
- Yoder-Hill, J., Pause, A., Sonenberg, N., and Merrick, W.C. (1993) The p46 subunit of eukaryotic initiation factor (eIF)-4F exchanges with eIF-4A. *J Biol Chem* **268**: 5566-5573.
- Yuce, O., Piekny, A., and Glotzer, M. (2005) An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol* **170**: 571-582.
- Zhang, H., Stallock, J.P., Ng, J.C., Reinhard, C., and Neufeld, T.P. (2000) Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* **14**: 2712-2724.
- Zhao, W.M., and Fang, G. (2005) MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13158-13163.
- Zhou, J., Liyanage, U., Medina, M., Ho, C., Simmons, A.D., Lovett, M., and Kosik, K.S. (1997) Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport* **8**: 1489-1494.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Klonierung. Alle die in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden standardmäßig unter *annealing*-Bedingungen von 55-60°C und 30 s verwendet. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Tab. 7.1: Oligonukleotide zur Klonierung.

Primer	Sequenz (5' → 3')
PKP1 EcoRI <i>s</i>	CCT <u>GAA TTC</u> GCC ATG AAC CAC TCG CCG CTC AAG ACC GCC
PKP1 XhoI + STOP <i>as</i>	CTC <u>CTC GAG</u> TTA GAA TCG GGA GGT GAA GTT CCT GAG GCT G
PKP1 XhoI – STOP <i>as</i>	CTC <u>CTC GAG</u> GAA TCG GGA GGT GAA GTT CCT GAG GCT G
PKP1 Kopf XhoI + STOP <i>as</i>	GCC <u>CTC GAG</u> TTA CTG ATA GAC CTG TTG CTT GGC AGA TTC ATC C
PKP1 repeat EcoRI <i>s</i>	CAG <u>GAA TTC</u> GAG ATG GGA GGC ATC TGC AAG CTG GTG GAC CTC
PKP2 EcoRI <i>s</i>	CCC <u>GAA TTC</u> CCC ATG GCA GCC CCC GGC GCC C
PKP2 SalI + STOP <i>as</i>	TTT <u>GTC GAC</u> TCA GTC TTT AAG GGA GTG GTA GGC TTT GGC
PKP2 Kopf SalI + STOP <i>as</i>	GAG <u>GTC GAC</u> CTA ATC AAG CTG GTT AAC CCT CTT CCG AGC TTC AG
PKP2 repeat EcoRI <i>s</i>	AGG <u>GAA TTC</u> GCC ATG CGT GGC ATC CTC AAG CTT CTG CAG C
PKP3 EcoRI <i>s</i>	GGA <u>GAA TTC</u> GCC ATG CAG GAC GGT AAC TTC CTG CTG
PKP3 SalI + STOP <i>as</i>	AGG <u>GTC GAC</u> CTA TGG GCC CAG GAA GTC CTC CTT CCG
PKP3 Kopf SalI + STOP <i>as</i>	GTG <u>GTC GAC</u> CTA GGC CGC TCC CAG CAC CTG CAG
PKP3 repeat EcoRI <i>s</i>	GGA <u>GAA TTC</u> GCC ATG CAG CAC AAG TGC TAC AGC GAT GC
eIF4A1 EcoRI <i>s</i>	AAT <u>GAA TTC</u> GCC ATG TCT GCG AGC CAG GAT TCC
eIF4A1 SalI + STOP <i>as</i>	GAC <u>GTC GAC</u> TCA GAT GAG GTC AGC AAC ATT GAG
eIF4A2 MunI <i>s</i>	GTT <u>CAA TTG</u> ACC ATG TCT GGT GGC TCC GCG
eIF4A2 SalI + STOP <i>as</i>	CCG <u>TCG ACT</u> TAA ATA AGG TCA GCC ACA TTC ATG G
eIF4A3 MunI <i>s</i>	CCC AAT TGA CCA TGG CGA CCT CGG GCT C
eIF4A3 SalI + STOP <i>as</i>	CTG <u>TCG ACT</u> CAG ATA AGA TCA GCA ACG TTC ATC
eIF3S8 EcoRI <i>s</i>	CGC <u>GAA TTC</u> GCC ATG TCG CGG TTT TTC ACC
eIF3S8 XhoI + STOP <i>as</i>	GTG <u>CTC GAG</u> TCA GTA GGC CGT CTG AG
eIF3S5 EcoRI <i>s</i>	TTG AAT <u>TCG CCA</u> TGG CCA CAC CGG CG
eIF3S5 XhoI + STOP <i>as</i>	GGG <u>CTC GAG</u> TCA CAG GTT TAC AAG TTT TTC
eIF3S6 IP EcoRI <i>s</i>	GCG AAT <u>TCG CCA</u> TGT CTC CCG CTG ATG ATT ATG
eIF3S6 IP SalI + STOP <i>as</i>	GAG <u>TCG ACT</u> CAA GGT CTC TGT CCC ATC TTC
Ect2 EcoRI <i>s</i>	AGA <u>GAA TTC</u> GCC ATG GCT GAA AAT AGT GTA TTA ACA TC
Ect2 XhoI + STOP <i>as</i>	GGT <u>CTC GAG</u> TCA TAT CAA ATG AGT TGT AGA TC

Ect2 1-333 XhoI <i>as</i>	TGA <u>CTC GAG</u> TCA TTT CTT GAG CTC AGG AGT ATT TG
Ect2 1-414 XhoI <i>as</i>	TGA <u>CTC GAG</u> TCA TGG AGT GGA GCT TTT AGA AGA C
Ect2 334-884 EcoRI <i>s</i>	GAG <u>GAA TTC</u> GCC ATG TCA GTG TCA ATG CTT TCT C
Ect2 415-884 EcoRI <i>s</i>	AGC <u>GAA TTC</u> GCC ATG GTT CCT TCA AAG CAG TCA GC
RhoA EcoRI <i>s</i>	CCT <u>GAA TTC</u> GCC ATG GCT GCC ATC CGG AAG AAA CTG GTG
RhoA XhoI + STOP <i>as</i>	CAC <u>CTC GAG</u> TCA CAA GAC AAG GCA CCC AGA TTT TTT CTT CCC
p0071 mouse MunI <i>s</i>	CTG <u>CAA TTG</u> GCC ATG CCC GCC CCT GAA CAG
p0071 mouse ApaI + STOP <i>as</i>	GTC <u>GGG CCC</u> CTA CAC CCA GGA GTC CGG
p0071#4 <i>s</i>	CACCGCACATTACTCCTATATATGACGAATCATATATAGGAGTA ATGTGC
p0071#4 <i>as</i>	AAAAGCACATTACTCCTATATATGATTCGTCATATATAGGAGTA ATGTGC
p0071#6 <i>s</i>	CACCGATAACGATAGAGTTGTTTCTCGAAAGAAACAACCTCTATC GTTATC
p0071#6 <i>as</i>	AAAAGATAACGATAGAGTTGTTTCTTTCGAGAAACAACCTCTAT CGTTATC

Oligonukleotide für qRT-PCR. Alle die in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden standardmäßig bei *annealing*-Bedingungen von 60°C und 30 s verwendet.

Tab. 7.2: Oligonukleotide für qRT-PCR.

Gen	<i>sense</i> (5' → 3')	<i>antisense</i> (5' → 3')
Cyclophilin A	GTCAACCCACCGTGTTCTT	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT
RPLP0	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	CCATCAGCACCACAGCCTTC
PKP1	GGAGCAGCTACTACTCCAAGT	CGGCTCGCCTTGATTTTCT
PKP2	GTGGGCAACGGAAATCTTCAC	CCAGCCTTTAGCATGTCATAGG
PKP3	CCGAGGCCACTGAGGTTTC	TTGAACCCATGCACGTCCG
eIF4A1	GATTCCCGATCCAGAGACAA	AGGGACTCCGAGAGGTTTCAT
eIF4A2	GCTCCGCGGATTATAACAGA	CGTAAGCATAGATGCCACGA
eIF4A3	GCAGTGGAGAGGGAAGAGTG	AGTGAAGTTGGCTTCCCTCA
Firefly	GAATCCATCTTGCTCCAACAC	TTCGTCCACAAACACAACCTC
Renilla	ATCAGGCAAATCTGGTAATGG	ACATCTACTACACTTTCAGCGT
p0071 human	CAATTCGGACAGCAGCAGTA	GCGGTACACTGGGCTGTAAT
p0071 mouse	ACATGGTCCTGCTGGAGTTC	TGGAGACAGCTTCCCTGGTG
Ect2	CTAACAGCAATCGCAAACGA	AACTTGCCACCTTGCTGACT

Tab. 7.3: siRNAs.

siRNA	Sequenz (5' → 3')
Kontrolle	AAG CUG ACC CUG AAG UUC AUC UGC ACC
PKP1	GAC CAU GCG UAA CUA CUC AdTdT
PKP2	CGU GGG CAA CGG AAA UCU UCA dTdT

PKP3	GAC UCC GAA AGC UCA UCU UCA dTdT
eIF4A1	CUG GCC GUG UGU UUG AUA UdTdT
Ect2	CAA GAG UGA UAU UGG UUC AdTdT (Kim <i>et al.</i> , 2005)
p0071	UGG AUA ACG AUA GAG UUG UUU CUU CCG UGG

Tab. 7.4: Verwendete cDNA-Konstrukte.

Plasmidname	Insert	Vektor	Restriktionsschnittstellen
pGBKT7-PKP1 Kopf	Plakophilin1 Kopf	pGBKT7	EcoRI / XhoI in Sal I
pYFP1-Flag-PKP1 Kopf	Plakophilin1 Kopf	YFP1-Flag-C	EcoRI / XhoI in Sal I
pGBKT7-PKP1 repeats	Plakophilin1 repeats	pGBKT7	EcoRI / XhoI in Sal I
pYFP1-Flag-PKP1 Kopf	Plakophilin1 repeats	YFP1-Flag-C	EcoRI / XhoI in Sal I
pGFP-PKP1 wt	Plakophilin1 wt	pEGFP-C2	EcoRI / XhoI in Sal I
PKP1 wt-DsRed	Plakophilin1 wt	pDsRed-N1	EcoRI / XhoI in Sal I
pRSET-PKP1 wt	Plakophilin1 wt	pRSETA	EcoRI / XhoI
pYFP1-Flag-PKP1 wt	Plakophilin1 wt	YFP1-Flag-C	EcoRI / XhoI in Sal I
PKP1 wt-Flag-YFP1	Plakophilin1 wt	YFP1-Flag-N	EcoRI / XhoI in Sal I
pGBKT7-PKP2 Kopf	Plakophilin2 Kopf	pGBKT7	EcoRI / Sal I
pGBKT7-PKP2 repeats	Plakophilin2 repeats	pGBKT7	EcoRI / Sal I
pGFP-PKP2 wt	Plakophilin2 wt	pEGFP-C2	EcoRI / Sal I
pGBKT7-PKP3 Kopf	Plakophilin3 Kopf	pGBKT7	EcoRI / Sal I
pGBKT7-PKP3 repeats	Plakophilin3 repeats	pGBKT7	EcoRI / Sal I
pGFP-PKP3 wt	Plakophilin3 wt	pEGFP-C2	EcoRI in Sal I
pGFP-eIF4A1	eIF4A1	pEGFP-C2	EcoRI in Sal I
pRSET-eIF4A1	eIF4A1	pRSETA	EcoRI / Sal I in XhoI
pGEX-eIF4A1	eIF4A1	pGEX-5x1	EcoRI / Sal I in XhoI
pGADT7-eIF4A1	eIF4A1	pGADT7	EcoRI / Sal I in XhoI
pYFP2-HA-eIF4A1	eIF4A1	YFP2-HA-C	EcoRI / Sal I
pGFP-eIF4A1 R362Q	eIF4A1 R362Q	pEGFP-C2	EcoRI / Sal I
pGFP-eIF4A2	eIF4A2	pEGFP-C2	Mun I / Sal I in EcoRI
pGADT7-eIF4A2	eIF4A2	pGADT7	Mun I / Sal I in EcoRI / XhoI
pGFP-eIF4A3	eIF4A3	pEGFP-C2	Mun I / Sal I in EcoRI
pGFP-eIF3S8	eIF3S8	pEGFP-C2	EcoRI / XhoI in Sal I
pGADT7-eIF3S8	eIF3S8	pGADT7	EcoRI / XhoI
pGFP-eIF3S5	eIF3S5	pEGFP-C2	EcoRI / XhoI in Sal I
pGADT7-eIF3S5	eIF3S5	pGADT7	EcoRI / XhoI
pGFP-eIF3S6 IP	eIF3S6 IP	pEGFP-C2	EcoRI / Sal I
pGADT7-eIF3S6 IP	eIF3S6 IP	pGADT7	EcoRI / Sal I in XhoI

pFlag-p0071 wt	p0071 wt	pcDNA3-Flag	Bam HI / XhoI
pGFP-m-p0071	<i>mouse</i> p0071 wt	pEGFP-C2	MunI / Apa I in EcoRI
pGFP-RhoA wt	RhoA wt	pEGFP-C2	EcoRI / XhoI in Sal I
pGADT7-RhoA wt	RhoA wt	pGADT7	EcoRI / XhoI
pGFP-RhoA da	RhoA da (Q63L)	pEGFP-C2	EcoRI / XhoI in Sal I
pGADT7-RhoA da	RhoA da (Q63L)	pGADT7	EcoRI / XhoI
pGFP-RhoA dn	RhoA dn	pEGFP-C2	EcoRI / XhoI in Sal I
pGADT7-RhoA dn	RhoA dn	pGADT7	EcoRI / XhoI
pGFP-Ect2- Deletionsfragmente	Ect2- Deletionsfragmente	pEGFP-C2	EcoRI / XhoI in Sal I
pGADT7-Ect2- Deletionsfragmente	Ect2- Deletionsfragmente	pGADT7	EcoRI / XhoI
pFlag-Ect2 wt	Ect2 wt	pcDNA3-Flag	EcoRI / XhoI
pFlag-Ect2 (414- 883)	Ect2 (414-883)	pcDNA3-Flag	EcoRI / XhoI
p0071 shRNA #4	sh #4	pENTR	
p0071 shRNA #6	sh #6	pENTR	

7.2 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	<i>Bi-molecular Fluorescence Complementation</i>
BrdU	2-Bromo-5-desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
da	dominant aktiv
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

d.h.	das heißt
dn	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Ribonuklease
dsRed	<i>Discosoma species red fluorescent protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
et al.	<i>et altera</i>
evtl.	eventuell
g	Erdbeschleunigung, Zentrifugationsgeschwindigkeit
g	Gramm
GFP	<i>green fluoreszent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GST	Glutation-S-Transferase
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobasenpaare
L	Liter
LB	Luria Bertani

m	milli
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mind.	mindestens
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	nano
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nt	Nukleotide
o.a.	oben aufgeführt
ORF	<i>open reading frame</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentium Hydrogenii</i>
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
RBP	RNA bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure <i>interference</i>
RNase	Ribonuklease

RNasin	RNase Inhibitor
Rpm	<i>rounds per minute</i> , Zentrifugationsgeschwindigkeit
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SDS-PAGE	denaturierendes Polyacrylamid-Gel
SG	stress granule
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurylsäure
u.a.	und andere
UTR	untranslatierte Region
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Danksagung

Ich danke...

an erster Stelle Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld, die es mir nicht nur ermöglichte diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, sondern mir während dieser Zeit auch mit Rat und Tat zur Seite stand.

der gesamten Arbeitsgruppe Hatzfeld für die gute Zusammenarbeit und freundliche Atmosphäre.

Prof. Dr. Elmar Wahle und Prof. Dr. Anette Beck-Sickinger für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Olaf Birkenmeier für die große Hilfe bei der Proteinaufreinigung.

Julia Achilles für die Hefe-Interaktionsstudien zwischen p0071 und Ect2.

Katrin Schwarze für die Herstellung der Ect2-Konstrukte.

Antje Ostareck-Lederer für die Hilfe der *in vitro* Translationsexperimente und der Überlassung der eIF4A1 R362Q- und pGEM-CAT-Konstrukte.

meinen Freunden für die schöne Zeit neben der Arbeit.

meinen Eltern die mich in jeder Form und zu jeder Zeit mit allen Mitteln unterstützt, motiviert und Anteil an meiner Arbeit genommen haben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Annika Wolf
geboren: am 01.05.1980 in Bad Langensalza
Staatsangehörigkeit: deutsch
Wohnort: Plan 81
99958 Großvargula

Werdegang

1986-1990 Grundschole Großvargula in Großvargula
1990-1991 POS "Juri Gagarin" in Gräfentonna
1991-1998 Salza-Gymnasium in Bad Langensalza
Abschluss: Abitur, 1998

WS/1998-SS/2003 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg
Abschluss: Diplom, 2003

11/2002-07/2003 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. Dr. Thomas Braun
Medizinische Fakultät,
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

seit 09/2003 Promotion in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld
Institut für Pathophysiologie/Abteilung für Pathobiochemie
Medizinische Fakultät,
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Publikationsliste:

Beyond regulation of cell adhesion: local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin. Keil R, Wolf A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M. Cell Cycle. 2007 Jan 15;6(2):122-7.

The armadillo protein p0071 regulates Rho signaling during cytokinesis. Wolf A, Keil R, Götzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, Hüttelmaier S, Hatzfeld M. Nat Cell Biol. 2006 Dec;8(12):1432-40.

Plakophilin 1 stimulates cell proliferation and growth by promoting eIF4A activity. Annika Wolf, Malgorzata Krause-Gruszczynska, Olaf Birkenmeier, Antje Ostareck-Lederer, Stefan Hüttelmaier and Mechthild Hatzfeld. In preparation for Nat Cell Biol.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Die benutzten Quellen und Hilfsmittel wurden vollständig angegeben. Diese Arbeit wurde an keinerlei anderen wissenschaftlichen Instituten vorgelegt.

Annika Wolf