

# **Die Funktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in der Regulation der Translation**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Christina Ann-Susann Kießling

geb. am 22.02.1985 in Plauen

**Gutachter:**

Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Rudolf Leube

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26.02.2014

**So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muss sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das mögliche getan hat.**

(Johann Wolfgang von Goethe, 1787)

*für Stephan*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Plakophiline – Mitglieder der Armadillo-Proteinfamilie .....	1
1.2.	Die Funktion der Plakophiline.....	3
1.2.1.	Die Funktion der Plakophiline in der Zelladhäsion .....	3
1.2.2.	Die Funktion der Plakophiline in der Signaltransduktion .....	6
1.2.3.	Die duale Funktion der Plakophiline in der Kanzerogenese.....	7
1.3.	Die Translation.....	9
1.3.1.	Die <i>cap</i> -abhängige Initiation der Translation .....	9
1.3.2.	Die IRES-vermittelte Initiation der Translation .....	13
1.3.3.	Translation und Kanzerogenese.....	15
1.4.	Zielstellung der Arbeit .....	16
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1.	Materialien .....	18
2.1.1.	Chemikalien und Enzyme.....	18
2.1.2.	Bakterienstämme .....	18
2.1.3.	Hefestämme.....	19
2.1.4.	Zelllinien.....	20
2.1.5.	Chromatographie-Säulen .....	20
2.1.6.	Radiochemikalien.....	20
2.2.	Molekularbiologische Methoden .....	20
2.2.1.	Isolierung von RNA .....	20
2.2.2.	Reverse Transkription .....	21
2.2.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	22
2.2.4.	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	22
2.2.5.	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	24
2.2.6.	Reinigung von Nukleinsäuren.....	24
2.2.7.	Klonierung von Expressionsplasmiden.....	24
2.2.8.	Restriktionsverdau .....	24

---

2.2.9.	Ligation .....	25
2.2.10.	Herstellung von chemokompetenten Bakterien .....	25
2.2.11.	Herstellung von elektrokompetenten Bakterien .....	26
2.2.12.	Transformation von chemokompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA.....	26
2.2.13.	Transformation von elektrokompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA.....	26
2.2.14.	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	27
2.2.15.	Präparation von Plasmid-DNA aus Hefen.....	27
2.2.16.	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	28
2.3.	Zellbiologische Methoden.....	28
2.3.1.	Kultivierung humaner und muriner Zellen.....	28
2.3.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	29
2.3.3.	Transfektion humaner und muriner Zellen .....	29
2.3.3.1.	Calcium-Phosphat-Präzipitation .....	29
2.3.3.2.	Lipofektion.....	30
2.3.3.3.	Nukleofektion .....	30
2.3.4.	Immunfluoreszenz.....	31
2.3.5.	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	31
2.3.6.	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) .....	32
2.3.7.	<i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA) .....	33
2.3.8.	Messung der Zellproliferation mittels BrdU-Einbau.....	33
2.3.9.	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	33
2.4.	Biochemische Methoden .....	34
2.4.1.	Isolierung von Proteinen.....	34
2.4.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
2.4.3.	SDS-PAGE .....	34
2.4.4.	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen .....	35
2.4.5.	Western Blot .....	35
2.4.6.	Metabolische Markierung von Zellen mit L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin .....	36
2.4.7.	Expression von GST- bzw. His <sub>6</sub> -Fusionsproteinen .....	37
2.4.8.	Reinigung von Plakophilin 3 .....	38

---

2.4.9.	Präzipitation von transient exprimierten FLAG- bzw. - GFP-Fusionsproteinen .....	39
2.4.10.	GST- <i>pulldown</i> .....	39
2.4.11.	Präzipitation mit 7-Methyl-GTP-Sepharose .....	40
2.4.12.	Hefe-Dihybrid-System .....	40
2.4.13.	Dichtegradientenzentrifugation.....	41
2.4.14.	Microarray-Analyse .....	42
2.4.15.	Analyse der Translation <i>in vitro</i> .....	43
2.4.16.	Statistische Auswertung .....	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1.	Die Funktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in der Regulation der Translation .....	44
3.1.1.	Plakophilin 3 stimuliert die globale Proteinsynthese .....	44
3.1.2.	Der Einfluss von Plakophilin 3 auf die Translation <i>in vitro</i> .....	45
3.1.3.	Plakophilin 3 beeinflusst die Proliferation und die Zellgröße.....	47
3.2.	Identifizierung neuer Plakophilin-3-Interaktionspartner .....	50
3.3.	Plakophilin 1 und Plakophilin 3 sind Bestandteil des Translationsinitiationskomplexes.....	51
3.3.1.	Plakophilin 3 kann mit 7-Methyl-GTP-Sepharose präzipitiert werden .....	51
3.3.2.	Plakophilin 1 und Plakophilin 3 präzipitieren mit Komponenten des <i>cap</i> -mRNA-Bindekomplexes.....	52
3.3.3.	Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit eIF4E .....	54
3.3.3.1.	Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E mittels Hefe-Dihybrid-System .....	54
3.3.3.2.	Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E mittels GST- <i>pulldown</i> .....	55
3.3.3.3.	Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E <i>in vivo</i> .....	56
3.3.4.	Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit eIF4G.....	59
3.3.4.1.	Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G mittels Hefe-Dihybrid-System .....	59
3.3.4.2.	Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G mittels GST- <i>pulldown</i> .....	60

---

3.3.4.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G <i>in vivo</i> .....	61
3.3.5. Plakophilin 3 assoziiert nur schwach mit eIF4A1 .....	64
3.3.5.1. Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 mittels Hefe-Dihybrid-System .....	64
3.3.5.2. Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 <i>in vitro</i> mittels GST- <i>pulldown</i> .....	65
3.3.5.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 <i>in vivo</i> .....	65
3.3.6. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit eIF4B .....	67
3.3.6.1. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B mittels Hefe-Dihybrid-System .....	67
3.3.6.2. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B <i>in vitro</i> mittels GST- <i>pulldown</i> .....	68
3.3.6.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B <i>in vivo</i> .....	69
3.3.7. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit PABP .....	71
3.3.7.1. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP mittels Hefe-Dihybrid-System .....	72
3.3.7.2. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1, Plakophilin 3 und PABP mittels GST- <i>pulldown</i> .....	72
3.3.7.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP <i>in vivo</i> .....	73
3.3.8. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit eIF3c .....	76
3.3.8.1. Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels GST- <i>pulldown</i> .....	76
3.3.8.2. Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels Immunpräzipitation .....	77
3.3.8.3. Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c <i>in vivo</i> ....	78
3.3.8.4. Der Einfluss von eIF3c auf die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex .....	80
3.3.9. Die PCI-Domäne von eIF3c ist verantwortlich für die Interaktion mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 .....	82
3.3.9.1. Charakterisierung der Plakophilin-Bindungsstelle in eIF3c mittels Hefe-Dihybrid-System .....	82

---

3.3.9.2. Charakterisierung der Plakophilin-Bindungsstelle in eIF3c mittels GST- <i>pull-down</i> und Immunpräzipitation .....	83
3.3.9.3. Die PCI-Domäne von eIF3c rekrutiert Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex.....	85
3.3.10. Zusammenfassung der Interaktionsstudien .....	86
3.3.11. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 kolokalisieren mit mRNA .....	87
3.4. Einfluss von Plakophilin 1 auf die Regulation bestimmter Ziel-mRNAs.....	88
3.4.1. Der Einfluss von Plakophilin 1 auf die Polysomenassoziation von Ziel-mRNAs.....	90
3.4.2. Der Einfluss von Plakophilin 1 auf die Proteinexpression ausgesuchter Zielgene...	91
3.4.3. Einfluss von Plakophilin 1 auf den relativen Gesamt-mRNA-Level ausgesuchter Ziel-mRNAs.....	94
3.4.3.1. Plakophilin 1 reguliert den Gesamt-mRNA-Level ausgesuchter Ziel-mRNAs .....	95
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>98</b>
4.1. Die Funktion der Plakophiline in der Translation.....	98
4.2. Der Einfluss der Plakophiline auf die Zellproliferation und Zellgröße .....	110
4.3. Der Einfluss von Plakophilin 1 auf die Regulation von Zieltranskripten.....	114
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>121</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>XVI</b>
7.1. Ergänzende Ergebnisse .....	XVI
7.2. Geräte.....	XVI
7.3. Antikörper.....	XVII
7.4. Vektoren .....	XVIII
7.5. DNA-Oligonukleotide.....	XX
7.6. siRNAs .....	XXII
7.7. Verwendete Kitsysteme.....	XXII
7.8. Berechnung des Vertrauenswertes (TS) .....	XXIII
7.9. Daten der Microarray-Analyse.....	XXIII
7.10. AU-reiche Elemente der Zieltranskripte.....	XXXI
7.11. Abbildungsverzeichnis.....	XXXII

---

7.12.	Tabellenverzeichnis .....	XXXV
7.13.	Abkürzungsverzeichnis .....	XXXVI

# 1. Einleitung

## 1.1. Plakophiline – Mitglieder der Armadillo-Proteinfamilie

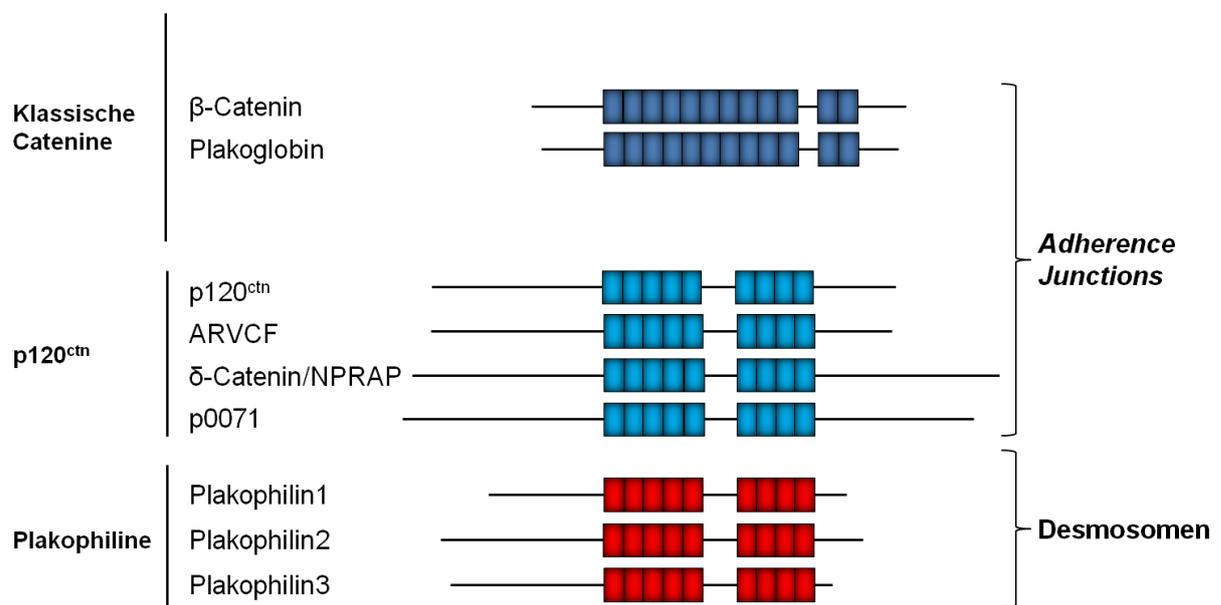
Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine, Plakophilin 1 und Plakophilin 3, gehören zur Familie der Armadillo-Proteine (Übersicht in TEWARI R. *et al.* 2010), weshalb die Proteinfamilie im Nachfolgenden kurz vorgestellt werden soll.

Charakteristisch für die Armadillo-Proteinfamilie ist ein sich wiederholendes Motiv, bestehend aus circa 42 Aminosäuren (Arm-Motiv), welches als erstes beim Segmentpolaritätsprotein Armadillo in *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) identifiziert wurde (PEIFER M. *et al.* 1994; RIGGLEMAN B. *et al.* 1989). Strukturuntersuchungen zeigten, dass ein Arm-Motiv aus drei  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist. Die aufeinanderfolgenden Arm-Motive interagieren so miteinander, dass eine superhelikale Struktur mit einer positiven Oberflächenladung entsteht, welche die Grundlage für eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen bildet (CHOI H. J. und WEIS W. I. 2005; HUBER A. H. *et al.* 1997). Bis heute wurde die Struktur verschiedenster Armadillo-Proteine aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Vertreter nicht zwangsläufig in ihrer Sequenz, wohl aber in ihrer Struktur stark homolog sind (als Beispiele siehe CHOI H. J. und WEIS W. I. 2005; HUBER A. H. und WEIS W. I. 2001; KIDD A. R., 3RD *et al.* 2005; STRIEGL H. *et al.* 2010). Obwohl die ersten Armadillo-Proteine im Tierreich identifiziert wurden, finden sich Vertreter auch im Reich der Pflanzen und Pilze, was für eine frühzeitige Entwicklung dieser Proteinfamilie in der Evolution spricht (Übersicht in COATES J. C. 2003).

Die Mitglieder der Armadillo-Proteinfamilie sind häufig multifunktional und variieren in ihrer zellulären Funktion.  $\beta$ -Catenin zum Beispiel, der Prototyp eines Armadillo-Proteins, ist evolutionär stark konserviert. Es erfüllt zum einen Funktionen in der Zelladhäsion und ist zum anderen an der Signaltransduktion des Wnt-Signalweges beteiligt (Übersicht in VALENTA T. *et al.* 2012). Andere Vertreter der Armadillo-Proteinfamilie sind zum Beispiel die Formine, welche die Nukleation und Bildung von Aktinfilamenten regulieren (SCHONICHEN A. und GEYER M. 2010) oder das Importin- $\alpha$ , welches am Transport von Proteinen mit einem Kern-Lokalisierungssignal in den Zellkern beteiligt ist (GOLDFARB D. S. *et al.* 2004).

Die Armadillo-Proteine werden anhand von Sequenzhomologien, der Organisation ihrer Arm-*repeat*-Domäne und ihrer Funktion in verschiedene Gruppen unterteilt (siehe Abb. 1). Zwei bedeutende Gruppen stellen dabei die klassischen Catenine und die mit p120-Catenin (p120<sup>ctn</sup>) verwandten Proteine dar. Zu den klassischen Cateninen zählen das bereits erwähnte  $\beta$ -Catenin, welches homolog ist zum *D.-melanogaster*-Segmentpolaritätsprotein Armadillo, und das Plakoglobin. Die Familie der p120<sup>ctn</sup>-verwandten Proteine untergliedert sich infolge der intrazellulären Lokalisation in zwei weitere Subgruppen. Die erste Untergruppe bilden dabei das p120<sup>ctn</sup> selbst, sowie die Proteine ARVCF (*Armadillo Repeat*

*gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome*) (SIROTKIN H. *et al.* 1997),  $\delta$ -Catenin/NPRAP (*neural plakophilin-related armadillo repeat protein*) (PAFFENHOLZ R. und FRANKE W. W. 1997; ZHOU J. *et al.* 1997) und p0071 (HATZFELD M. und NACHTSHEIM C. 1996). Diese Proteine lokalisieren präferentiell mit den klassischen Cadherinen in *Adherence Junctions*, wobei die Assoziation zwischen der Juxtamembrandomäne der Cadherine und der Armadillo-repeat-Domäne der p120<sup>ctn</sup>-Subfamilie vermittelt wird (YAP A. S. *et al.* 1998). Die zweite Untergruppe bilden die Plakophiline (Plakophilin 1–3). Im Gegensatz zur p120<sup>ctn</sup>-Subfamilie lokalisieren sie hauptsächlich in Desmosomen und interagieren dort über ihre N-terminale Kopfdomäne mit Desmoplakin, Plakoglobin und den desmosomalen Cadherinen wodurch sie zur Vernetzung von Intermediärfilamenten beitragen (BONNE S. *et al.* 2003; BONNE S. *et al.* 1999; CHEN X. *et al.* 2002; HATZFELD M. *et al.* 2000; HATZFELD M. *et al.* 1994; KOWALCZYK A. P. *et al.* 1999; MERTENS C. *et al.* 1996).



**Abb. 1 Schematische Darstellung der Armadillo-Proteinfamilie.** Die Familie der Armadillo-Proteine untergliedert sich in drei Subfamilien. Zur ersten Gruppe, den klassischen Cateninen, gehören  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin mit jeweils zwölf Arm-Motiven. Die zweite Subfamilie, die p120-Catenine (p120<sup>ctn</sup>), bilden das p120<sup>ctn</sup> selbst, ARVCF,  $\delta$ -Catenin und p0071. Sie enthalten je neun Arm-Motive. Sowohl die Vertreter der klassischen Catenine als auch die p120<sup>ctn</sup>-Subfamilie lokalisieren präferentiell in *Adherence Junctions*. Die dritte Proteinfamilie bilden die Plakophiline (Plakophilin 1–3). Sie verfügen über neun Arm-Motive und lokalisieren hauptsächlich in Desmosomen. Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus HATZFELD M. 2005.

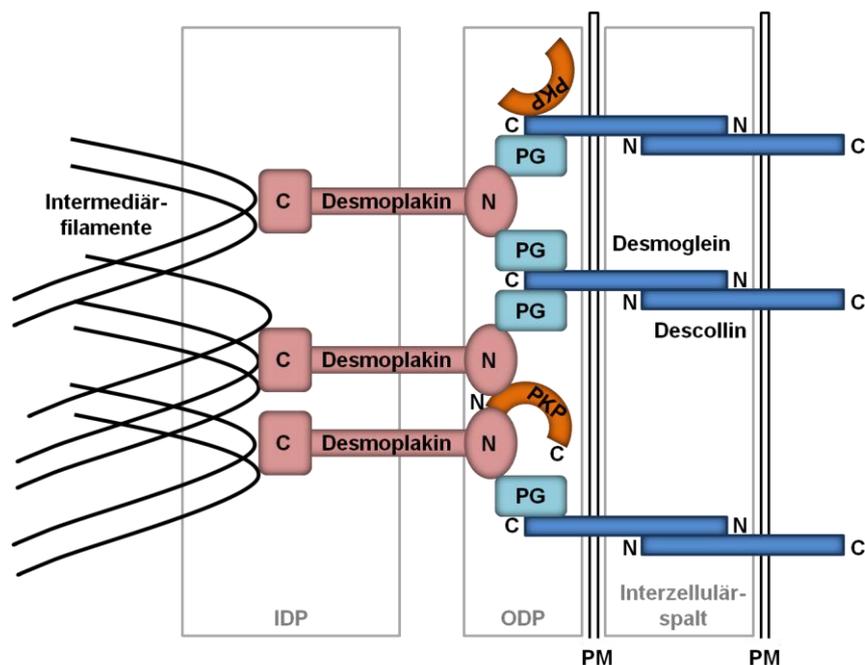
Strukturuntersuchungen an der Arm-repeat-Domäne von Plakophilin 1 zeigten, dass die Plakophiline über neun Arm-Motive verfügen (CHOI H. J. und WEIS W. I. 2005). Die Struktur der *repeat*-Domäne ist sichelförmig, da sich zwischen dem fünften und dem sechsten Arm-Motiv eine aus 28 Aminosäuren bestehende flexible Region befindet, welche einen Knick in der Struktur verursacht (CHOI H. J. und WEIS W. I. 2005). Diese flexible Region ist in der Subfamilie der p120<sup>ctn</sup>-verwandten Proteine stark konserviert, jedoch nicht

bei anderen Vertretern der Armadillo-Proteine, wie dem  $\beta$ -Catenin oder dem Importin- $\alpha$  zu finden (CHOI H. J. und WEIS W. I. 2005).

## 1.2. Die Funktion der Plakophiline

### 1.2.1. Die Funktion der Plakophiline in der Zelladhäsion

Die Plakophiline (Plakophilin 1–3) wurden, wie bereits erwähnt, als Bestandteile der Desmosomen identifiziert (BONNE S. *et al.* 1999; HATZFELD M. *et al.* 1994; MERTENS C. *et al.* 1996). Dies sind intrazelluläre Zell-Zell-Verbindungen welche der Verankerung von Zellen untereinander dienen und damit zur Stabilität des Zellverbandes bzw. von Geweben beitragen. Innerhalb der Zellen verankern die Desmosomen die Intermediärfilamente mit der Zellmembran und stabilisieren dadurch die Zellform (Übersicht in DELVA E. *et al.* 2009). In einem Desmosom gehen die desmosomalen Cadherine, Desmocollin und Desmoglein, mit ihrer extrazellulären Domäne calciumabhängige Zell-Zell-Verbindungen ein. Über ihre intrazelluläre Domäne interagieren sie mit Plakoglobin sowie mit den Plakophilinen 1–3 und bilden dadurch den sogenannten äußeren Plaque (ODP, *outer dense plaque*). Als Verbindungsprotein zwischen dem ODP und dem inneren Plaque (IDP, *inner dense plaque*) dient Desmoplakin, indem es über seinen N-Terminus an Plakoglobin und an die Plakophiline bindet und über seinen C-Terminus mit den Intermediärfilamenten interagiert (siehe Abb. 2).



**Abb. 2 Schematischer Aufbau des Desmosoms.** Die desmosomalen Cadherine, Desmocollin und Desmoglein gehen mit ihrer extrazellulären, N-terminalen Domäne calciumabhängige Zell-Zell-Verbindungen ein. Über ihre intrazelluläre, C-terminale Domäne binden sie Plakoglobin (PG) und die Plakophiline (PKP) und bilden zusammen mit dem N-Terminus von Desmoplakin den äußeren Plaque (ODP, *outer dense plaque*). Desmoplakin bindet innerhalb des inneren Plaque (IDP, *inner dense plaque*) über seine C-terminale Domäne an Intermediärfilamente und vernetzt diese mit der Plasmamembran (PM). Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus DELVA E. *et al.* 2009.

Obwohl *In-vitro*-Studien zeigen, dass neben Desmoplakin, auch die Plakophiline an Intermediärfilamente (darunter Keratin, Desmin, Vimentin) direkt binden können, ist die physiologische Relevanz dieser Interaktion noch nicht geklärt (BONNE S. *et al.* 2003; HATZFELD M. *et al.* 2000; HATZFELD M. *et al.* 1994; HOFMANN I. *et al.* 2000; SMITH E. A. und FUCHS E. 1998). Die Plakophiline lokalisieren im ODP und wären damit für eine Interaktion mit Intermediärfilamenten nicht frei zugänglich.

Eine Gemeinsamkeit der Plakophiline (Plakophilin 1–3) ist, dass sie vorwiegend über ihre N-terminale Kopfdomäne mit den desmosomalen Proteinen interagieren; die Anzahl ihrer Bindungspartner sowie das Expressionsmuster in den einzelnen Epithelien unterscheidet sich jedoch erheblich (HATZFELD M. 2007; NEUBER S. *et al.* 2010).

Plakophilin 1 wurde vor allem in mehrschichtigen, nicht jedoch in einschichtigen Epithelien identifiziert (HEID H. W. *et al.* 1994; KAPPRELL H. P. *et al.* 1988) und interagiert dabei mit Desmoplakin, Desmoglein 1 und Desmocollin 1a (BORNSLAEGER E. A. *et al.* 2001; HATZFELD M. *et al.* 2000; KOWALCZYK A. P. *et al.* 1999; SMITH E. A. und FUCHS E. 1998). Untersuchungen in verschiedenen Zelllinien zeigten, dass Plakophilin 1 die Rekrutierung desmosomaler Proteine, insbesondere Desmoplakin, zur Plasmamembran fördert, wodurch die Anzahl und Größe der Desmosomen erhöht wird (HATZFELD M. *et al.* 2000; KOWALCZYK A. P. *et al.* 1999; SOUTH A. P. *et al.* 2003; WAHL J. K., 3RD 2005). Nach Studien von Hatzfeld und Kollegen zu urteilen, vermittelt die N-terminale Kopfdomäne von Plakophilin 1 die Lokalisation des Proteins an der Zellmembran sowie die Interaktion mit Desmoplakin und Desmoglein, während die C-terminale *repeat*-Domäne für die Assoziation mit Aktinfilamenten verantwortlich ist (HATZFELD M. *et al.* 2000). Weitere Expressionsstudien in A431-Zellen zeigen, dass neben der N-terminalen Domäne auch die letzten 40 Aminosäuren von Plakophilin 1 für Verankerung des Proteins in der Membran und für die Rekrutierung von Desmoplakin verantwortlich sind (SOBOLIK-DELMARE T. *et al.* 2006).

Plakophilin 2 wurde im Gegensatz zu Plakophilin 1 in nahezu allen einschichtigen und komplexen Epithelien nachgewiesen sowie in den nicht-epithelialen Geweben des Herzens und der Lymphfollikel (MERTENS C. *et al.* 1996). Es interagiert ebenso wie Plakophilin 1 mit Desmoplakin, aber auch mit Plakoglobin, Desmoglein 1 und 2 sowie mit Desmocollin 1a und 2a (CHEN X. *et al.* 2002). Obwohl Plakophilin 2 keinen Einfluss auf die Desmosomengröße zu haben scheint, lokalisiert es zusammen mit Desmoplakin in zytoplasmatischen Vorläufer-Komplexen, welche zur Zellmembran transportiert werden und dort die Bildung der Desmosomen initiieren (GODSEL L. M. *et al.* 2005). Kommt es zum Verlust von Plakophilin 2, so wird eine normale Anlagerung von Desmoplakin an der Zellmembran und somit auch die Bildung desmosomaler Strukturen verhindert (BASS-ZUBEK A. E. *et al.* 2008; GROSSMANN K. S. *et al.* 2004).

Plakophilin 3 wird, ebenso wie Plakophilin 2, in einschichtigen und mehrschichtigen Epithelien exprimiert (BONNE S. *et al.* 1999; SCHMIDT A. *et al.* 1999). Innerhalb der Plakophilin-Familie interagiert es jedoch mit der größten Anzahl an desmosomalen Proteinen, darunter Desmoplakin, Plakoglobin, Desmoglein 1–3, Desmocollin 1a, 2a, 3a und 3b (BONNE S. *et al.* 2003). Studien in HaCaT- und HCT116-Zellen zeigen, dass der *knockdown* von Plakophilin 3, ähnlich wie der *knockdown* von Plakophilin 1, zu einer verringerten Desmosomengröße sowie zu einer verminderten Anlagerung desmosomaler Proteine an der Plasmamembran führt (GOSAVI P. *et al.* 2011; KUNDU S. T. *et al.* 2008).

Für Plakophilin 1 und Plakophilin 2, jedoch nicht für Plakophilin 3, wurden zwei Spleißvarianten beschrieben. Diese unterscheiden sich durch eine Insertion von 21 Aminosäuren im vierten Arm-Motiv für Plakophilin 1 und durch eine Insertion von 44 Aminosäuren im dritten Arm-Motiv für Plakophilin 2 (MERTENS C. *et al.* 1996; SCHMIDT A. *et al.* 1997). Während die kürzere Isoform von Plakophilin 1 (Plakophilin 1a) sowohl an Zell-Zell-Kontakten als auch im Zellkern detektiert werden konnte, wurde Plakophilin 1b bisher ausschließlich im Kern gefunden (SCHMIDT A. *et al.* 1997). Es wird daher vermutet, dass das Spleißen sowohl die Funktion als auch die Lokalisation von Plakophilin 1 beeinflusst (HATZFELD M. 2007). Informationen über eine unterschiedliche Lokalisation der beiden Plakophilin-2-Isoformen sind nicht bekannt.

Wie wichtig die Funktion der Plakophiline in der Zell-Zell-Adhäsion ist, zeigen genetische Erkrankungen, welche auf Mutationen im Plakophilin-1- bzw. Plakophilin-2-Gen beruhen. Das Fehlen von Plakophilin 1 führt zu einer autosomal rezessiven Erkrankung der Haut, dem EDSF-Syndrom (*ectodermal dysplasia/skin fragility syndrom*) (MCGRATH J. A. *et al.* 1997), wodurch diese extrem fragil und entzündungsanfällig wird. Besonders mechanisch beanspruchte Hautareale, wie der Mund oder die Handflächen sind davon betroffen. Die Patienten entwickeln Hyperkeratosen an Hand- und Fußsohlen und sind zudem durch Entwicklungsdefekte der Haare gekennzeichnet; häufig fehlen die Kopfbehaarung sowie Augenbrauen und Wimpern komplett (als Beispiele siehe BOYCE A. E. *et al.* 2012; MCGRATH J. A. *et al.* 1997; SPRECHER E. *et al.* 2004; TANAKA A. *et al.* 2009). Hautbiopsien von Patienten zeigen, dass das Fehlen von Plakophilin 1 die desmosomale Lokalisation von Desmoplakin beeinträchtigt. Zudem ist die Anzahl und Größe der Desmosomen deutlich reduziert und die Verankerung der Keratinfilamente gestört (HAMADA T. *et al.* 2002; MCMILLAN J. R. *et al.* 2003). Im Zusammenhang mit dem EDSF-Syndrom wurden auch eine Reduktion von Schweißdrüsen und eine generelle Gedeihstörung beschrieben (ERSOY-EVANS S. *et al.* 2006). Mutationen im Plakophilin-2-Gen führen zu einer autosomal dominanten Erkrankung, der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC, *arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*) (GERULL B. *et al.* 2004). Bei der ARVC wird, ausgehend vom rechten Ventrikel des Herzens, das

Myokardgewebe durch fibrös-fettiges Gewebe ersetzt, wodurch die normale Reizleitung gestört ist. Dies kann zum verstärkten Auftreten ventrikulärer Arrhythmien sowie zum plötzlichen Herztod führen (HERREN T. *et al.* 2009). Der Verlust von Plakophilin 2 in Mäusen führt zum Tod der Tiere etwa am elften Tag der Embryonalentwicklung. Die Herzstruktur der Embryonen war schwerwiegend verändert, wodurch es zum Kollaps der embryonalen Blutzirkulation kam. Mikroskopische Analysen zeigten außerdem, dass der Verlust von Plakophilin 2 zur Dissoziation von Desmoplakin von den Zellkontakten und zur Akkumulation im Zytoplasma führte, wodurch eine normale Zellkontaktbildung nicht mehr möglich war (GROSSMANN K. S. *et al.* 2004). Obwohl es keine Informationen über Plakophilin-3-bedingte Erkrankungen gibt, zeigen Tiermodelle wie wichtig die Funktion des Proteins ist. Plakophilin-3-*knockout*-Mäuse sind im Gegensatz zu den Plakophilin-2-*knockout*-Tieren lebensfähig. Sie zeigen Defekte in der Morphologie und Morphogenese der Haare, sind kleiner als die Wildtyp-Tiere und weisen vermehrt Entzündungen der Haut auf. Bedingt durch den Verlust von Plakophilin 3 aggregiert oder fehlt Desmoplakin in der Basalschicht der Epidermis, wodurch die Anzahl der Desmosomen deutlich reduziert und die Zellkontaktbildung gestört ist (SKLYAROVA T. *et al.* 2008).

### 1.2.2. Die Funktion der Plakophiline in der Signaltransduktion

Die Plakophiline (Plakophilin 1–3) wurden nicht nur als Gerüstproteine der Desmosomen beschrieben, sondern erfüllen auch vielfältige Funktionen in der Signaltransduktion. Es wird vermutet, dass die jeweilige Funktion der Proteine vor allem durch ihre intrazelluläre Lokalisation (Zellmembran: Plakophilin 1–3; Zytoplasma: Plakophilin 1–3; Zellkern: Plakophilin 1+2) bestimmt wird (WOLF A. und HATZFELD M. 2010).

Erste Informationen über eine mögliche Funktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in der Signaltransduktion lieferten Hofmann und Kollegen. Sie identifizierten beide Proteine als Bestandteile von *stress granules*, zytoplasmatischen Aggregaten inaktiver Translationsinitiationskomplexe (HOFMANN I. *et al.* 2006). Im Zusammenhang damit konnte für Plakophilin 3 auch eine Assoziation mit den RNA-bindenden Proteinen PABP (Poly-(A)-Bindeprotein), FXR1 (*fragile-X-related protein 1*) und G3BP (*ras-GAP-SH3-binding protein*) nachgewiesen werden, so dass eine Funktion in der Translation bzw. im RNA-Metabolismus denkbar war (HOFMANN I. *et al.* 2006). Weiterführende Studien bestätigten, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 die *cap*-abhängige Translation *in vivo* stimulieren können (WOLF A. *et al.* 2010). Plakophilin 1 interagiert dabei über seine N-terminale Kopfdomäne mit dem eukaryontischen Initiationsfaktor 4A1 (eIF4A1), stimuliert dessen ATPase-Aktivität und fördert die Rekrutierung des Proteins in den Translationsinitiationskomplex (WOLF A. *et al.* 2010). Die genaue Funktion von Plakophilin 3 in der Translation wurde bisher allerdings noch nicht beschrieben.

Auch in Lungenkarzinomzellen konnten erste Hinweise über eine mögliche zytoplasmatische Funktion von Plakophilin 3 gefunden werden. Hier assoziiert das Protein mit DNM-1L (*dynamamin-1-like*) (FURUKAWA C. *et al.* 2005). DNM-1L ist an der Teilung von Peroxisomen und Mitochondrien beteiligt und erfüllt Funktionen in der Sortierung des Golgi-Apparates (BONEKAMP N. A. *et al.* 2010; SANTEL A. und FRANK S. 2008; YAN M. *et al.* 2005). Obwohl der molekulare Mechanismus dieser Interaktion noch nicht geklärt werden konnte, könnte eine verstärkte Expression von Plakophilin 3 und DNM-1L durch die Aktivierung verschiedener Signalwege zur Tumorentwicklung und Metastasenbildung beitragen (FURUKAWA C. *et al.* 2005).

Plakophilin 2 scheint im Zytoplasma an der Signaltransduktion des Wnt-Signalweges beteiligt zu sein. Es interagiert mit  $\beta$ -Catenin und potenziert so dessen transkriptionelle Aktivität (CHEN X. *et al.* 2002). Offenbar konkurriert es mit E-Cadherin um die Bindung an  $\beta$ -Catenin und beeinflusst somit die Zelladhäsion negativ (CHEN X. *et al.* 2002). Die intrazelluläre Lokalisation von Plakophilin 2 wird vermutlich durch die Kinase C-TAK1 (*Cdc25C-associated kinase 1*) reguliert. Diese phosphoryliert Plakophilin 2 am Serin 82 und generiert dadurch eine Bindungsstelle für 14-3-3-Proteine (MULLER J. *et al.* 2003). Wird Plakophilin 2 an der 14-3-3-Bindungsstelle mutiert (S82A), so zeigt es eine verstärkte nukleäre Akkumulation, was darauf schließen lässt, dass durch die Bindung an das 14-3-3-Protein der Transport von Plakophilin 2 in den Zellkern verhindert wird (MULLER J. *et al.* 2003).

Im Zellkern konnte eine Assoziation von Plakophilin 2 mit RPC155, der größten Untereinheit der RNA-Polymerase III, sowie mit RPC39, RPC82 und dem Transkriptionsfaktor TFIIIB nachgewiesen werden (MERTENS C. *et al.* 2001). Die RNA-Polymerase III ist vor allem für die Transkription kleiner, nicht kodierender RNAs (zum Beispiel 5S-RNA und 7SL-RNA) verantwortlich, welche unter anderem Funktionen in der Proteinsynthese und Proteintranslokation erfüllen (WHITE R. J. 2011).

Auch Plakophilin 1 kann im Zellkern lokalisieren (HATZFELD M. *et al.* 2000; KOWALCZYK A. P. *et al.* 1999). Die Funktion des Proteins in diesem Zellkompartiment wurde allerdings noch nicht geklärt.

### **1.2.3. Die duale Funktion der Plakophiline in der Kanzerogenese**

Wie essentiell die Funktion der Plakophiline ist, zeigen nicht nur erbliche Erkrankungen, sondern auch zahlreiche Expressionsstudien in Tumoren. Eine verminderte Expression von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde unter anderem in Plattenepithelkarzinomen der Haut, des Mundrachenraumes, der Speisröhre und des Gebärmutterhalses beschrieben (KUNDU S. T. *et al.* 2008; MOLL I. *et al.* 1997; NARAYANA N. *et al.* 2010; PAPAGERAKIS S. *et al.* 2003; SCHMITT-GRAEFF A. *et al.* 2007; SCHWARZ J. *et al.* 2006; SOBOLIK-DELMARE T. *et al.* 2007). Die Expression der Plakophiline korreliert dabei invers mit der Differenzierung

und Invasivität der Tumore. Während gut bzw. moderat differenzierte Plattenepithelkarzinome Plakophilin 1 bzw. Plakophilin 3 exprimieren, ist die Expression in schlecht differenzierten Tumoren vermindert (MOLL I. *et al.* 1997; PAPAGERAKIS S. *et al.* 2003; SCHWARZ J. *et al.* 2006; SOBOLIK-DELMARE T. *et al.* 2007). In der Folge ist die Ausbildung der Desmosomen und somit auch die Zelladhäsion gestört, wodurch die Migrationsfähigkeit der Zellen erhöht und die Bildung von Metastasen begünstigt wird (KUNDU S. T. *et al.* 2008; SOBOLIK-DELMARE T. *et al.* 2007). Ähnliche Effekte konnten u. a. auch für Desmoplakin, Desmoglein und Plakoglobin beobachtet werden (als Beispiele siehe CHIDGEY M. und DAWSON C. 2007; HIRAKI A. *et al.* 1996; RIEGER-CHRIST K. M. *et al.* 2005). Im Zusammenhang damit konnten Aigner und Kollegen zeigen, dass die Expression von Plakophilin 3 in invasiven Darmkrebszellen durch den Transkriptionsfaktor ZEB1 (*zinc finger E-box-binding homeobox 1*) unterdrückt wird, welcher die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) induziert (AIGNER K. *et al.* 2007; KALLURI R. und WEINBERG R. A. 2009). Da ähnliche Effekte u. a. auch für Plakophilin 2 und Desmoplakin beobachtet wurden (VANDEWALLE C. *et al.* 2005), könnte der Verlust desmosomaler Proteine entscheidend zur EMT und damit zur Steigerung der Migrationsfähigkeit von Tumorzellen beitragen (AIGNER K. *et al.* 2007).

Aber nicht in allen Tumoren ist die Expression der Plakophiline verringert. In Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und der Lunge konnte ein erhöhter Plakophilin-1- bzw. Plakophilin-3-Level nachgewiesen werden (FURUKAWA C. *et al.* 2005; SANCHEZ-PALENCIA A. *et al.* 2011; VILLARET D. B. *et al.* 2000). Die Behandlung von Lungenkarzinomzellen mit Plakophilin-3-siRNA unterdrückte deren Wachstum und verringerte deren Lebensfähigkeit (FURUKAWA C. *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von Plakophilin 3 in COS-7-Zellen zu einer gesteigerten Proliferation und Invasivität (FURUKAWA C. *et al.* 2005). Eine Analyse von Adenokarzinomen der Prostata zeigt zudem, dass Plakophilin 1 hauptsächlich in gut differenzierten Tumoren exprimiert wird, wohingegen Plakophilin 3 vorwiegend in schlecht differenzierten Tumoren zu finden ist (BREUNINGER S. *et al.* 2010).

Doch wie kann sowohl eine gesteigerte als auch eine verringerte Expression der Plakophiline zur Tumorprogression beitragen? Ein Modell dazu findet sich in WOLF A. und HATZFELD M. 2010: Als Strukturproteine der Desmosomen fördern die Plakophiline die Zelladhäsion und verringern die Migrationsfähigkeit der Zellen. Der Verlust der Proteine könnte diese jedoch erhöhen und somit zur Tumorentstehung beitragen. Im Gegensatz dazu, steht die Funktion der Plakophiline in der Regulation der Translation. Die verstärkte Expression der Proteine würde die Translation und damit auch die Proliferation der Zellen stimulieren und könnte somit ebenfalls zur Tumorprogression beitragen. Die Plakophiline könnten also eine duale Funktion in der Kanzerogenese erfüllen, welche entscheidend durch

ihre Lokalisation bestimmt werden würde. Als Strukturproteine der Desmosomen würden sie die Tumorentwicklung unterdrücken und als zytoplasmatische Proteine die Translation und Proliferation der Zellen stimulieren (WOLF A. und HATZFELD M. 2010). Tatsächlich konnte in einigen Tumorproben eine verstärkte Lokalisation der Proteine im Zytoplasma detektiert werden (NARAYANA N. *et al.* 2010; PAPAGERAKIS S. *et al.* 2003; SOBOLIK-DELMARE T. *et al.* 2007).

### 1.3. Die Translation

In der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien zeigten, dass neben Plakophilin 1 auch Plakophilin 3 die *cap*-abhängige Translation *in vivo* stimulieren kann (WOLF A. *et al.* 2010). Zudem konnte in Hefe-Dihybrid-Analysen eine Interaktion zwischen Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit dem eukaryontischen Initiationsfaktor 3c (eIF3c) nachgewiesen werden (A. Wolf, persönliche Korrespondenz). Da in dieser Arbeit die Funktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3, bei der Regulation der Translation näher untersucht worden ist, soll im nachfolgenden Kapitel der Mechanismus der Translation kurz erklärt werden.

Der Prozess der Translation unterteilt sich in die Initiation, die Elongation, die Termination und das Recycling von Ribosomen. Da jedoch die Initiation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Translation darstellt, und da in der vorliegenden Arbeit die Interaktion mit den einzelnen Initiationsfaktoren untersucht worden ist, wird im Nachfolgenden ausschließlich auf die Translationsinitiation und deren Regulation eingegangen.

#### 1.3.1. Die *cap*-abhängige Initiation der Translation

Die *cap*-abhängige Translationsinitiation ist der Prozess, bei dem ein elongationsfähiges 80S-Ribosom auf der mRNA so angeordnet wird, dass es zur Basenpaarung zwischen dem Startkodon (AUG) der mRNA mit der Initiator-Methionyl-transfer-RNA (Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>) in der Peptidyl-Stelle (P-Stelle)<sup>1</sup> des Ribosoms kommen kann (siehe Abb. 3, S. 11). Dieser Prozess untergliedert sich in mehrere Teilabschnitte (Übersicht in JACKSON R. J. *et al.* 2010; SONENBERG N. und HINNEBUSCH A. G. 2009).

Zunächst dissoziiert das 80S-Ribosom unter dem Einfluss des eIF3-Komplexes, eIF1 und eIF1A in seine 40S- und 60S-Untereinheit (PISAREV A. V. *et al.* 2007). Ein ternärer Komplex (TC) bestehend aus der Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> und GTP-gebundenem eIF2 lagert sich anschließend an die 40S-Untereinheit des Ribosoms an und bildet zusammen mit eIF3, eIF1, eIF5 und eIF1A den 43S-Präinitiationskomplex (43S-PIC).

Studien aus *Saccharomyces cerevisiae* belegen, dass für die Rekrutierung des ternären Komplexes zum Ribosom eIF3c, eine Untereinheit des eIF3-Komplexes,

---

<sup>1</sup> In der P-Stelle des Ribosoms ist die tRNA (Peptidyl-tRNA) verankert, die die wachsenden Polypeptidkette trägt.

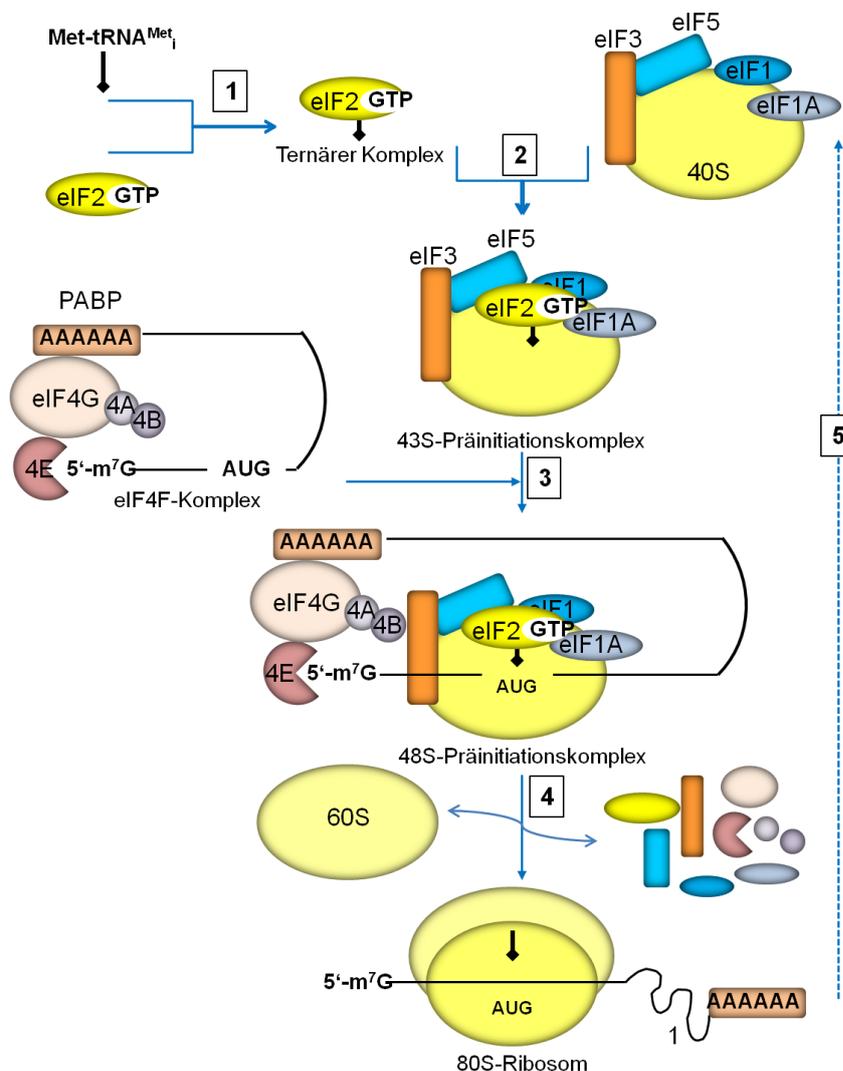
verantwortlich ist, da das Protein direkt mit eIF1 und eIF5 und indirekt mit eIF2 über eIF5 interagieren kann (ASANO K. *et al.* 2000; VALASEK L. *et al.* 2002; VALASEK L. *et al.* 2004).

Parallel dazu lagert sich auch der eIF4F-Komplex an die *cap*-Struktur der mRNA an. Dieser besteht aus den Proteinen eIF4E, eIF4A1 und eIF4G (GRIFO J. A. *et al.* 1983). eIF4G ist ein multifunktionelles Gerüstprotein mit einer N-terminale Bindungsstelle für PABP und eIF4E (IMATAKA H. *et al.* 1998; MADER S. *et al.* 1995) und einer Bindungsstelle für eIF4A1 und eIF3 in der mittleren Region (IMATAKA H. und SONENBERG N. 1997; KORNEEVA N. L. *et al.* 2001; LEFEBVRE A. K. *et al.* 2006). Der C-Terminus von eIF4G besitzt eine zusätzliche Bindungsstelle für eIF4A1 (IMATAKA H. und SONENBERG N. 1997) sowie Bindungsstellen für die eIF4E-phosphorylierenden Kinasen MNK1 (*MAP kinase interacting Ser/Thr kinase 1*) und MNK2 (PYRONNET S. *et al.* 1999; SCHEPER G. C. *et al.* 2001; WASKIEWICZ A. J. *et al.* 1999). Die Bindung des eIF4F-Komplexes an die *cap*-Struktur wird durch eIF4E vermittelt, wobei das Protein durch seine konkave Oberflächenstruktur und zahlreiche ionische Wechselwirkungen in Position gehalten wird (VON DER HAAR T. *et al.* 2004). eIF4A1 ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase und entwindet die Sekundärstrukturen der mRNA. Die Helikase-Aktivität von eIF4A1 ist sehr gering, wird jedoch durch eIF4G, eIF4B und eIF4H sehr stark stimuliert (GRIFO J. A. *et al.* 1984; KORNEEVA N. L. *et al.* 2005; ROGERS G. W., JR. *et al.* 2001; ROZEN F. *et al.* 1990).

Nachdem sich der 43S-PIC, durch eine Interaktion zwischen eIF4G und eIF3, an die mRNA angelagert hat, beginnt er die mRNA vom 5'- zum 3'-Ende nach dem Startkodon (AUG) abzutasten. Das sogenannte ‚Scanning‘ erfordert zum einen das Entwinden der Sekundärstrukturen im 5'-UTR und zum anderen muss sich das Ribosom entlang der mRNA bewegen. Obwohl der ‚Scan-Mechanismus‘ nicht vollständig verstanden ist, zeigen Untersuchungen, dass vor allem eIF1A und eIF1 essentiell für diesen Prozess sind (PESTOVA T. V. und KOLUPAEVA V. G. 2002). ATP, eIF4A1, eIF4G und eIF4B sind für das Entwinden der Sekundärstrukturen notwendig und tragen damit ebenfalls zu einem erfolgreichen ‚Scanning‘ bei (PESTOVA T. V. und KOLUPAEVA V. G. 2002; SVITKIN Y. V. *et al.* 2001).

Nachdem das Startkodon (AUG) der mRNA eine Basenpaarung mit dem Antikodon der Met-tRNA<sup>Met</sup> eingegangen ist, wodurch sich der 48S-PIC vollständig gebildet hat, kommt es zu einer Interaktion zwischen eIF5 und eIF1A und der Dissoziation von eIF1 nahe der P-Stelle (MAAG D. *et al.* 2006; MAAG D. *et al.* 2005). Damit verbunden geht das Ribosom von einer offenen in eine geschlossene Konformation über und das weitere ‚Scanning‘ wird unterbunden (MAAG D. *et al.* 2006). eIF5 induziert dann die Hydrolyse von eIF2-gebundenem GTP, weshalb anorganisches Phosphat (P<sub>i</sub>) freigesetzt wird. Durch die GTP-Hydrolyse verringert sich die Affinität von eIF2 zur Met-tRNA<sup>Met</sup>, wodurch es zur partiellen Dissoziation von eIF2-GDP von der 40S-Ribosomenuntereinheit kommt (KAPP L. D. und

LORSCH J. R. 2004). Anschließend vermittelt eIF5B-GTP die Anlagerung der 60S-Untereinheit des Ribosoms und die Abspaltung von eIF1, eIF5, eIF3 und dem verbleibenden eIF2-GDP (PESTOVA T. V. *et al.* 2000; UNBEHAUN A. *et al.* 2004). Die Hydrolyse des eIF5B-gebundenen GTPs ermöglicht, dass der Faktor selbst zusammen mit eIF1A vom Ribosom dissoziiert (ACKER M. G. *et al.* 2009). Das somit gebildete 80S-Ribosom kann dann mit der Elongation beginnen.



**Abb. 3 Die cap-abhängige Initiation der Translation.** Die cap-abhängige Initiation gliedert sich in mehrere Teilabschnitte. **1** Ausbildung eines ternären Komplexes (TC) aus eIF2-GTP und Met-tRNA<sup>Met</sup>. **2** Zusammenlagerung des TC mit der 40S-Untereinheit des Ribosoms, eIF3, eIF5, eIF1 und eIF1A zum 43S-Präinitiationskomplex (43S-PIC). **3** Der eIF4F-Komplex, bestehend aus eIF4E, eIF4A1 (4A) und eIF4G lagert sich zusammen mit eIF4B (4B) und PABP an die mRNA an und entwindet deren Sekundärstrukturen. Das Ribosom scannt die mRNA nach dem Startkodon (AUG). Durch die komplementäre Basenpaarung zwischen dem Startkodon der mRNA und dem Antikodon der Met-tRNA<sup>Met</sup> bildet sich der 48S-PIC vollständig. **4** Durch die Anlagerung der 60S-Untereinheit des Ribosoms und der Dissoziation der Initiationsfaktoren kommt es zur Ausbildung des 80S-Ribosoms. **5** Nach der Elongation und Termination kommt es zum Recycling der einzelnen Initiationsfaktoren, wodurch die Translation von Neuem beginnen kann. Abbildung modifiziert nach JACKSON R. J. *et al.* 2010.

Die Translationsinitiation wird streng über die Aktivität der Translationsfaktoren reguliert. Dabei spielen zum einen reversibel Phosphorylierungsprozesse, die die Aktivität von eIF4F und eIF2 beeinflussen, eine entscheidende Rolle und zum anderen die Proteolyse von eIF4G (Übersicht in HOLCIK M. und SONENBERG N. 2005; JACKSON R. J. *et al.* 2010).

In Säugetieren sind vier Kinasen bekannt, die unter zellulärem Stress eIF2 $\alpha$  (eIF2 Untereinheit  $\alpha$ ) am Serin 51 phosphorylieren und somit die Translation inhibieren. Die HRI (*heme-regulated inhibitor kinase*), welche u. a. durch einen Mangel an Häm aktiviert wird (CHEN J. J. 2007); die PKR (*protein kinase RNA-activated*), welche durch doppelsträngige RNA während viraler Infektionen aktiviert wird (KAUFMAN R. J. 1999); die PERK (*PKR-like endoplasmatic reticulum kinase*), die durch ungefaltete Proteine im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums aktiviert wird (RON D. 2002) und die EIF2AK4 (*eIF2 $\alpha$  kinase 4*), welche durch den Entzug verschiedener Aminosäuren und UV-Strahlung aktiviert wird (DENG J. *et al.* 2002; KIMBALL S. R. 2001). Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  bewirkt, dass eIF2-GDP an eIF2B bindet und dessen Aktivität inhibiert, wodurch GDP nicht mehr gegen GTP ausgetauscht werden kann. eIF2-GTP kann folglich nicht regeneriert werden, womit die Bildung des ternären Komplexes (eIF2-GTP-Met-tRNA<sup>Met</sup>) verhindert wird (KIMBALL S. R. 1999; ROWLANDS A. G. *et al.* 1988). Dadurch kommt es zur Ausbildung eines inaktiven Translationsinitiationskomplexes an den sich die RNA-bindenden Proteine TIAR und TIA-1 an Stelle des ternären Komplexes anlagern können (ANDERSON P. und KEDERSHA N. 2002). Die Selbstaggregation von TIA-1 fördert dann die Akkumulation dieser Komplexe in definierte zytoplasmatische Strukturen, die als *stress granules* bezeichnet werden (KEDERSHA N. L. *et al.* 1999).

Auch die Bindung des eIF4F-Komplexes an die *cap*-Struktur wird indirekt über Phosphorylierungen reguliert. Dabei spielen eIF4E-bindende Proteine (eIF4E-BP 1–3) eine wichtige Rolle. Sie kompetieren mit eIF4G um die Bindung an eIF4E und können dadurch die Bildung eines aktiven eIF4F-Komplexes verhindern (HAGHIGHAT A. *et al.* 1995; MADER S. *et al.* 1995). Hypophosphoryliertes eIF4E-BP bindet sehr stark an eIF4E und verhindert die Assoziation von eIF4G. Wird eIF4E-BP jedoch durch die Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) phosphoryliert, so dissoziiert es von eIF4E und ein aktiver eIF4F-Komplex kann gebildet werden (LAPLANTE M. und SABATINI D. M. 2012). mTOR ist nicht nur an der Inaktivierung der eIF4E-BP beteiligt, sondern stimuliert die Translation auch durch die Phosphorylierung anderer Initiationsfaktoren, wie zum Beispiel eIF4G und S6K (*p70 S6 kinase*) (MA X. M. und BLENIS J. 2009). Die S6K kann nach der Aktivierung eIF4B phosphorylieren, dadurch die Interaktion mit eIF3 ermöglichen, und so ebenfalls zur Aktivierung der Translation beitragen (HOLZ M. K. *et al.* 2005). Aber auch die Aktivität von eIF4E selbst kann durch Phosphorylierung reguliert werden. Die Kinasen MNK1 und MNK2

binden an eIF4G und phosphorylieren eIF4E am Serin 209 (PYRONNET S. *et al.* 1999; SCHEPER G. C. *et al.* 2001; WASKIEWICZ A. J. *et al.* 1999), wodurch die Translation und die transformierende Aktivität von eIF4E stimuliert wird (TOPISIROVIC I. *et al.* 2004; WENDEL H. G. *et al.* 2007). Die genaue Funktion der eIF4E-Phosphorylierung ist allerdings noch nicht abschließend geklärt.

Die *cap*-abhängige Translation kann auch durch virale Faktoren beeinflusst werden. Die Proteasen 2A und L aus Picornaviren spalten eIF4G, wodurch ein C-terminales eIF4G-Fragment (bezeichnet als p100), ohne eIF4E-Bindestelle, entsteht. Dieses Fragment besitzt eine höhere Affinität für virale mRNAs als für *cap*-mRNAs wodurch die Translation viraler mRNAs bevorzugt wird (ALI I. K. *et al.* 2001; LAMPHEAR B. J. *et al.* 1995).

### 1.3.2. Die IRES-vermittelte Initiation der Translation

Viren aber auch eukaryontische Zellen haben einen alternativen, *cap*-unabhängigen Mechanismus zur Initiation der Translation entwickelt, bei dem das Ribosom direkt zur mRNA über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) rekrutiert wird (Übersicht in BALVAY L. *et al.* 2009; FITZGERALD K. D. und SEMLER B. L. 2009; HELLEN C. U. 2009). Als IRES werden lange, hochstrukturierte RNA-Sequenzen bezeichnet, die je nach Typ unterschiedliche Initiationsfaktoren für die Anlagerung des Ribosoms benötigen. IRES-Elemente vermitteln die Translation viraler aber auch zellulärer mRNAs wenn die klassische *cap*-abhängige Translation blockiert ist, zum Beispiel nach viralen Infektionen, bei zellulärem Stress oder bei Erkrankungen (SARNOW P. 1989; SPRIGGS K. A. *et al.* 2008). Da in der vorliegenden Arbeit virale IRES-Elemente genutzt wurden, um Hinweise über den Mechanismus der Plakophilin-3-vermittelten Translation zu erhalten, sollen diese im Folgenden kurz beschrieben werden.

Die IRES-Elemente der Viren werden auf Grund ihrer Struktur in vier Gruppen unterteilt, charakterisiert durch den Poliovirus (PV; Typ I), den Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV; Typ II), den Hepatitis-C-Virus (HCV; Typ III) und den Cricket-Paralysis-Virus (Typ IV) (HELLEN C. U. 2009). Je nach Typ enthalten die IRES-mRNAs eine unterschiedliche Anzahl an Stammschleifen- bzw. Pseudoknotenstrukturen im 5'-UTR (Übersicht in BALVAY L. *et al.* 2009) (siehe Abb. 4, S. 15). Studien zeigten, dass die Initiation der EMCV-IRES alle klassischen Initiationsfaktoren, bis auf eIF4E, benötigt (PESTOVA T. V. *et al.* 1996a; PESTOVA T. V. *et al.* 1996b). eIF4G bindet direkt an eine Stammschleifenstruktur nahe dem Startkodon, rekrutiert eIF4A und fördert somit die Anlagerung des 43S-PIC (KOLUPAEVA V. G. *et al.* 1998; PESTOVA T. V. *et al.* 1996b). Die Assoziation mit eIF4A steigert die Affinität von eIF4G (LOMAKIN I. B. *et al.* 2000) für die IRES und induziert Strukturveränderungen um die Anlagerung des Ribosoms zu ermöglichen (KOLUPAEVA V. G. *et al.* 2003). eIF4G bindet auch an IRES-Elemente vom Typ I, rekrutiert eIF4A1 und induziert dadurch

Strukturveränderungen, so dass für diese IRES der gleiche Mechanismus wie für die Typ-II-IRES angenommen wird (DE BREYNE S. *et al.* 2009).

Die Sequenz und Struktur, sowie der Initiationsmechanismus der Typ-III- und Typ-IV-IRES unterscheidet sich komplett von dem der Typ-I- und Typ-II-IRES.

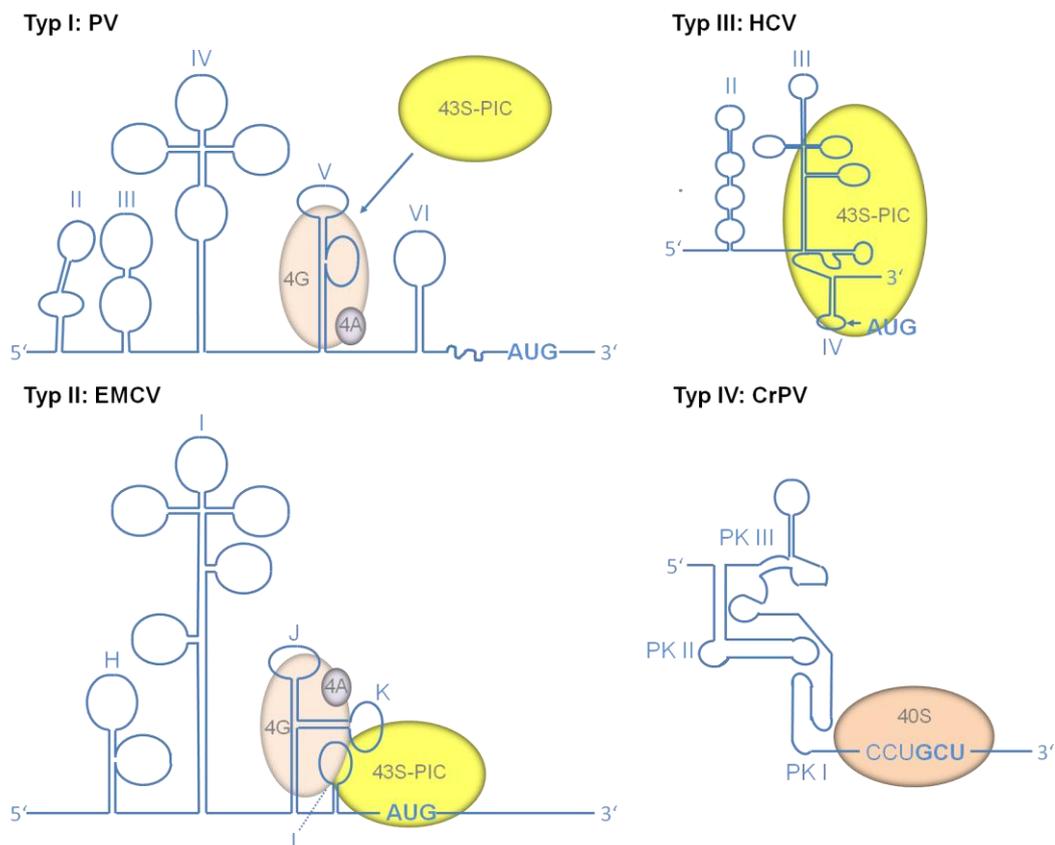
Damit sich ein 48S-PIC an der HCV-mRNA anlagern kann, bedarf es der 40S-Untereinheit des Ribosoms, der Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> und eIF2. Die Faktoren eIF4B und eIF4F werden nicht benötigt, da das Ribosom direkt an eine Stammschleifenstruktur der IRES bindet (PESTOVA T. V. *et al.* 1998). Durch diese Interaktion kommt es zu einer Strukturveränderung, die das Ribosom direkt am Startkodon der mRNA positioniert, so dass kein ‚Scanning‘ erforderlich ist (PESTOVA T. V. *et al.* 1998; SPAHN C. M. *et al.* 2001). Auch eIF3 kann direkt an eine Schleifenstruktur der IRES binden und den eIF2-GTP-Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>-Komplex rekrutieren (BURATTI E. *et al.* 1998; JI H. *et al.* 2004; KIEFT J. S. *et al.* 2001; SIZOVA D. V. *et al.* 1998). Nach der Stimulation der Hydrolyse von eIF2-gebundenem GTP durch eIF5, lagert sich die 60S-Untereinheit des Ribosoms unter dem Einfluss von eIF5B an, so dass ein elongationsfähiges Ribosom gebildet werden kann (UNBEHAUN A. *et al.* 2004). Wie bereits unter Abschnitt 1.3.1 erwähnt wurde, wird nach einer viralen Infektion die PRK aktiviert, was zur Phosphorylierung und Inaktivierung von eIF2 führt (KAUFMAN R. J. 1999). Interessanterweise kann die HCV-vermittelte Translation auf einen alternativen Mechanismus umschalten und die Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> durch eIF5B zum Ribosom rekrutieren (TERENIN I. M. *et al.* 2008).

Das Genom des Cricket-Paralysis-Virus (Typ IV) enthält eine intergenische Region (IGR) zwischen zwei großen offenen Leserahmen (OLR) die als IRES fungieren kann (WILSON J. E. *et al.* 2000b). Im Gegensatz zu Typ-III-IRES benötigt die IGR-IRES keine klassischen Initiationsfaktoren, sondern kann direkt an die 40S-Untereinheit (welche sich eIF5B-unabhängig an die 60S-Untereinheit anlagern kann) oder das 80S-Ribosom binden (JAN E. und SARNOW P. 2002; WILSON J. E. *et al.* 2000a). Dabei beginnt die Translation nicht wie üblich an einem AUG-Triplett in der P-Stelle sondern an einem GCU-Triplet in der A-Stelle<sup>2</sup> des Ribosoms (WILSON J. E. *et al.* 2000a). Die entsprechende Aminoacyl-tRNA wird dann durch den eukaryontischen Elongationsfaktor 1 (eEF1) zur A-Stelle rekrutiert und durch eEF2 zur P-Stelle transportiert, wo die Translation beginnen kann (JAN E. *et al.* 2003; PESTOVA T. V. und HELLEN C. U. 2003; PESTOVA T. V. *et al.* 2004). Studien in Säugetieren und Hefen zeigten, dass die IGR-IRES-vermittelte Translation dann stimuliert wird, wenn keine aktiven Initiationsfaktoren zur Verfügung stehen (DENIZ N. *et al.* 2009; THOMPSON S. R. *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu kann die Translation der CrPV-mRNA durch eIF2 *in vitro* inhibiert werden (WILSON J. E. *et al.* 2000a), was dafür spricht, dass

---

<sup>2</sup> Die A-Stelle des Ribosoms bezeichnet die Bindungsstelle für die Aminoacyl-tRNA.

nach viralen Infektionen, wenn die zelluläre Translation durch die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  inhibiert ist, das Ribosom verstärkt an die IGR-IRES binden kann.



**Abb. 4 Schematische Darstellung der IRES-vermittelten Initiation der Translation.** Virale IRES-Elemente werden auf Grund Ihrer Struktur in vier Gruppen eingeteilt: Typ I (Poliovirus, PV), Typ II (Enzephalomyokarditis-Virus, EMCV), Typ III (Hepatitis-C-Virus, HCV) und Typ IV (Cricket-Paralysis-Virus, CrPV). Die **IRES des PV** besteht aus den Domänen II-VI. eIF4G interagiert direkt mit Domäne V, fördert die Rekrutierung von eIF4A und ermöglicht somit die Anlagerung des 43S-PIC. Den gleichen Mechanismus besitzt auch die **IRES des EMCV**, wobei hier ein Strukturelement zwischen den Domänen K und L direkt an eIF4G bindet. Die **IRES des HCV** besteht aus den Domänen II-IV, wobei der 43S-PIC direkt zum AUG-Startcodon rekrutiert wird. Die **IRES des CrPV** ermöglicht eine direkte Anlagerung des Ribosoms, wobei klassische Initiationsfaktoren nicht benötigt werden. Sie besteht ebenfalls aus drei Domänen die durch Pseudoknotenstrukturen (PK) gekennzeichnet sind. Durch die Anlagerung des Ribosoms an die IRES kommt es zur Besetzung der P-Stelle (CCU-Triplett), wodurch der Leserahmen festgelegt wird und die Initiation am GCU-Triplett, in der A-Stelle des Ribosoms, beginnen kann. Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus JACKSON R. J. *et al.* 2010.

### 1.3.3. Translation und Kanzerogenese

Die Regulation der Translation ist ein wichtiger Mechanismus, damit die Zelle ihr Wachstum und ihr Proliferationsvermögen an verschiedenste Lebensbedingungen anpassen kann (FINGAR D. C. *et al.* 2002; MA X. M. und BLENIS J. 2009). Kommt es allerdings zu einer Fehlregulation der Translation, so kann dies die Entstehung von Tumoren begünstigen (DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004).

Am besten charakterisiert ist die Funktion des eIF4F-Komplexes in der Tumorentwicklung, wobei erste Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Regulation der Translation und der Kanzerogenese zeigen, mit eIF4E durchgeführt wurden. Die

Überexpression von eIF4E erhöht die Proliferation, induziert die maligne Transformation und stimuliert das Zellwachstum von NIH3T3-Zellen (LAZARIS-KARATZAS A. *et al.* 1990). Der *knockdown* von eIF4E hingegen, vermindert das Zellwachstum und die Proliferation, führt zur Rückbildung des transformierten Phänotyps und vermindert die globale Translationsrate (DE BENEDETTI A. *et al.* 1991; GRAFF J. R. *et al.* 1995; ORIDATE N. *et al.* 2005; RINKER-SCHAEFFER C. W. *et al.* 1993).

eIF4E ist in einer Vielzahl von Tumoren, darunter Brust-, Kolon- und Lungenkarzinome, erhöht (DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004). Es fördert die Transformation und Tumorgenese, indem es die Translation von mRNAs stimuliert, die über ein stark strukturiertes, GC-reiches 5'-UTR verfügen (KOROMILAS A. E. *et al.* 1992). Diese mRNAs benötigen, im Vergleich mit weniger stark strukturierten mRNAs, mehr eIF4F und damit mehr eIF4E um ihre Sekundärstrukturen zu entwinden (MAMANE Y. *et al.* 2004). Unter normalen Bedingungen ist eIF4E limitierend, wodurch stark strukturierte mRNAs nur schlecht translatiert werden (DUNCAN R. *et al.* 1987; HIREMATH L. S. *et al.* 1985; MAMANE Y. *et al.* 2004). In Tumoren hingegen, kann die Translation dieser mRNAs durch eine verstärkte Expression von eIF4E gefördert werden. Entscheidend dabei ist, dass diese mRNAs häufig für Proteine kodieren, die für das Zellwachstum, die Angiogenese und das Überleben der Zellen verantwortlich sind, weshalb deren verstärkte Translation die Tumorentstehung begünstigen kann (LARSSON O. *et al.* 2007; MAMANE Y. *et al.* 2007).

Eine transformierende Aktivität konnte auch für eIF4G nachgewiesen werden (FUKUCHI-SHIMOGORI T. *et al.* 1997). eIF4G ist in Lungen- und Brustkarzinomen erhöht und fördert die Translation IRES-enhaltender mRNAs, wodurch das Überleben der Zellen sowie die Ausbildung von Tumoremboli gefördert werden kann (BAUER C. *et al.* 2001; SILVERA D. *et al.* 2009).

Bis heute konnte für nahezu alle Translationsfaktoren ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression und einer Funktion in der Tumorentwicklung nachgewiesen werden. Eine Übersicht findet sich in SILVERA D. *et al.* 2010.

#### **1.4. Zielstellung der Arbeit**

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 zusammen mit RNA-bindenden Proteinen in *stress granules*, inaktiven Translationsinitiationskomplexen, lokalisieren können, so dass eine Funktion beider Proteine in der Regulation der Translation bzw. im RNA-Metabolismus denkbar war. Weiterführende Studien in der Arbeitsgruppe bestätigten diese Vermutung und zeigten, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 die *cap*-abhängige (und damit eIF4E-abhängige) Translation *in vivo* sowie die globale Proteinsynthese stimulieren können. Außerdem konnten der Initiationsfaktor eIF3c als putative Interaktionspartner sowohl für Plakophilin 1 als auch für Plakophilin 3 in einer Hefe-Dihybrid-Analyse identifiziert werden. Plakophilin 1 reguliert die Translation, indem es mit

dem eukaryontischen Initiationsfaktor 4A1 (eIF4A1) interagieren, dessen ATPase-Aktivität stimulieren und die Rekrutierung von eIF4A1 in den Translationsinitiationskomplex fördern kann. Die genaue Funktion von Plakophilin 3 in diesem Prozess ist jedoch nicht bekannt.

Daher war das erste Ziel dieser Arbeit, die Funktion von Plakophilin 3 in der Regulation der Translation mit Hilfe von *In-vitro*-Translationsstudien näher zu charakterisieren und Hinweise über einen möglichen Mechanismus zu erhalten. Da die Regulation der Translation auch an die Regulation der Zellgröße und das Zellwachstum gekoppelt ist, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Plakophilin 3 auf diese Prozesse zu untersuchen.

Um darüber hinaus Informationen über den Aufbau des Translationsinitiationskomplexes in Gegenwart der Plakophiline zu erhalten, sollte eine mögliche Interaktion mit den Hauptkomponenten des *cap*-mRNA-Bindekomplexes (eIF4E, eIF4G, eIF4A1, eIF4B und PABP) analysiert und die Interaktion mit eIF3c validiert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Frage geklärt werden, ob Plakophilin 3 eine aktive Komponente des Translationsinitiationskomplexes darstellt und wenn ja, wie das Protein in diesen Komplex rekrutiert wird.

Plakophilin 1 und Plakophilin 3 werden in einer Vielzahl von Tumoren verstärkt exprimiert, ebenso wie eIF4E, welches die Translation bestimmter mRNAs selektiv regulieren und damit zum Überleben der Zelle und zum Zellwachstum beitragen kann. Da sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 die eIF4E-abhängige Translation *in vivo* stimulieren können, stellte sich die Frage, ob auch die Plakophiline die Translation bestimmter mRNAs beeinflussen können. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, mögliche Zieltranskripte von Plakophilin 1 mit Hilfe einer Microarray-Analyse zu identifizieren und diese gegebenenfalls auch zu validieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) und Merck (Darmstadt) in der Qualitätsstufe *p.a.* bezogen. Zellkulturmedien und Zusätze wurden von den Firmen PAA (Cölbe) bzw. Biochrom (Berlin), Enzyme, Protein- und DNA-Größenstandards von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

#### 2.1.2. Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tab. 1 aufgeführten *Escherichia-coli*-Stämme (*E.-coli*-Stämme) verwendet.

**Tab. 1** Verwendete *E.-coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Vertrieb
JM109	<i>e14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Stratagene, Ja Jolla, Kalifornien, USA
BL21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λ(DE3)</i>	Stratagene, Ja Jolla, Kalifornien, USA
BL21-CodonPlus® (DE3) RIL	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> E. coli gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene, Ja Jolla, Kalifornien, USA
ArcticExpress™ (DE3) RIL	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent<sup>r</sup>] [argU ileY leuW Str<sup>r</sup>]</i>	Stratagene, Ja Jolla, Kalifornien, USA
SHuffle™ T7 Express	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal latt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec<sup>R</sup>, lac<sup>I</sup>) ΔtxrB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main
KC8	<i>hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5(kan<sup>r</sup>), hisB463, lacΔX74, strA, galU, galK</i>	Clontech, Saint- Germain-en-Laye, Frankreich

Die verwendeten *E.-coli*-Stämme wurden standardmäßig in LB-Medium (BERTANI G. 1951) angezogen. Zur Selektion rekombinanter Klone wurde dem Medium in Anhängigkeit des Vektors 50 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

**LB-Medium:** 1 % (w/v) NaCl; 1 % (w/v) Trypton; 5 % (w/v) Hefeextrakt; pH 7,0

Zur Herstellung von LB-Agar wurde dem LB-Medium 2 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

War eine Selektion rekombinanter Klone durch Zugabe von Antibiotika nicht möglich, so wurde der *E.-coli*-Stamm KC8 verwendet, welcher eine Selektion auf Aminosäuren ermöglicht. Die Kultivierung der rekombinanten Klone erfolgte dann auf M9-Agar (siehe Tab. 2).

**Tab. 2 Allgemeiner Ansatz für M9-Minimal-Agar**

5x M9-Salz-Lösung		M9-Agar	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	64 g	5x M9-Salz-Lösung	200 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g	1 M MgSO <sub>4</sub>	2 ml
NaCl	2,5 g	1 M CaCl <sub>2</sub>	0,1 ml
NH <sub>4</sub> Cl	5 g	40 % (w/v) Glucose	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l	10x Aminosäure Drop-out-Lösung	100 ml
		1 M Thiamin-HCl	1 ml
		50 mg/ml Ampicillin	1 ml
		Agar-Agar	20 g
		ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Für die Anzucht der Bakterien zur Expression rekombinanter Proteine wurde 2x YT-Medium verwendet.

**2x YT-Medium:** 1,6 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 5 % (w/v) NaCl; pH 7,0

### 2.1.3. Hefestämme

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tab. 3 aufgeführten *Saccharomyces-cerevisiae*-Stämme (*S.-cerevisiae*-Stämme) verwendet.

**Tab. 3 Verwendete *S.-cerevisiae*-Stämme**

Stamm	Genotyp	Vertrieb
YRG2	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2::UAS<sub>GAL1</sub><sup>-</sup>, TATA<sub>GAL1</sub>-HIS3, URA3::UAS<sub>GAL4 17mers(x3)</sub><sup>-</sup>, TATA<sub>CYC1</sub>-lacZ</i>	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, ura3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met<sup>-</sup>, gal80Δ, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

Die Anzucht der verwendeten *S.-cerevisiae*-Stämme erfolgte in YPDA-Medium.

**YPDA-Medium:** 2 % (w/v) Bakto-Pepton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Glucose; 0,08 % (w/v) Adenin-Hemisulfat; pH 6,5

Nach erfolgter Transformation von *S. cerevisiae* mit den entsprechenden Expressionsplasmiden, erfolgte die Anzucht in SD-Medium.

**SD-Medium:** 2 % (w/v) Glucose; 6,7 % (w/v) Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren; 1x Aminosäure *Drop-out*-Lösung; pH 5,8

Zur Herstellung von YPDA- bzw. SD-Agar wurde den entsprechenden Medien 2 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

#### 2.1.4. Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien (siehe Tab. 4) verwendet.

**Tab. 4** Verwendete humane und murine Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	GRAHAM F. L. <i>et al.</i> 1977
HeLa SS6	Humane epitheliale Zervixkarzinomzellen	GEY G. O. <i>et al.</i> 1952
HaCaT	Humane epitheliale Keratinozyten	BOUKAMP P. <i>et al.</i> 1988
Maus-Keratinozyten	Murine Keratinozyten	Gabe von Prof. Dr. Magin, Universität Leipzig

#### 2.1.5. Chromatographie-Säulen

Zur Reinigung von Plakophilin 3 wurden in der vorliegenden Arbeit die Chromatographie-Säulen HIS Trap™ HP und HiTrap™ SP HP, beide von GE Healthcare (Uppsala, Schweden), verwendet.

#### 2.1.6. Radiochemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurde EasyTag™ L-[<sup>35</sup>S]-Methionin der Firma Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) zur metabolischen Markierung von Proteinen verwendet.

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus humanen bzw. murinen Zellen erfolgte mittels Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (TRIzol) (CHOMCZYNSKI P. und SACCHI N. 1987).

Die Zellen einer 2-cm-Kulturschale wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml TRIzol lysiert. Das Zelllysat wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurde das Lysat 10 min bei 4 °C und 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch die Zugabe von 200 µl Chloroform extrahiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur (RT) wurde die Lösung 15 min bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert, wodurch es zur Phasentrennung kam. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Das Pelletieren der RNA erfolgte durch Zentrifugation

(10 min, 4 °C, 15000 g). Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei 60 °C getrocknet und dann in 10 µl RNase/DNase-freiem ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem Spektralphotometer Genequant 1300 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bei 260 nm. Bei einer optischen Dichte (OD) von 1 entspricht die RNA-Konzentration 40 µg/ml (Schichtdicke der Quarzküvette: 10 mm). Neben der OD bei 260 nm wurde auch die OD bei 280 nm bestimmt, um evtl. Proteinkontaminationen nachzuweisen, sowie die OD bei 230 nm bestimmt, um evtl. Phenolkontaminationen aufzuzeigen. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

**TRizol:**

38 % (v/v) Roti<sup>®</sup>-Aqua-Phenol für RNA-Isolierung  
0,8 M Guanidiniumthiocyanat  
0,4 M Ammoniumthiocyanat  
0,1 M Na-Acetat; pH 5,0  
5 % (w/v) Glycerol

**Phosphat-gepufferte****Kochsalzlösung (PBS)**

8 % (w/v) NaCl  
0,2 % (w/v) KCl  
0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7,2

**2.2.2. Reverse Transkription**

Bei der Reversen Transkription wird RNA mit Hilfe von *Random*-Hexamer- oder Oligo(dT)-Primern und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Der *Random*-Hexamer-Primer bindet dabei an verschiedene Stellen der mRNA-Sequenz zufällig, während sich der Oligo(dT)-Primer an den Poly(A)-Schwanz der mRNA anlagert. Der *Random*-Hexamer-Primer wurde verwendet, wenn die Gesamt-RNA einer Zelle amplifiziert werden sollte, der Oligo(dT)-Primer hingegen, wenn ausschließlich polyadenylierte RNA amplifiziert werden sollte. Standardmäßig wurden 2 µg RNA unter Verwendung der Reversen Transkriptase SuperScript™ II (200 u/µl) von Invitrogen (Carlsbad) in cDNA nach folgendem Protokoll (siehe Tab. 5) umgeschrieben. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

**Tab. 5 Allgemeiner Ansatz für die Reverse Transkription**

Schritt	Oligo(dT)-Primer	<i>Random</i> -Hexamer-Primer	
1	Oligo(dT)-Primer (50µM)	<i>Random</i> -Hexamer-Primer (100 µM)	1 µl
	2 µg RNA		x µl
	2 µl dNTP Mix (10 mM)		2 µl
	ddH <sub>2</sub> O		ad 12 µl
	Inkubation 5 min, 65 °C Inkubation 5 min, 4 °C		
Zugabe von:			
2	5x Kit-Puffer für Reverse Transkription		4 µl
	0,1 M Dithiothreitol (DTT)		2 µl
	ddH <sub>2</sub> O		1 µl
Inkubation 2 min, 42 °C		Inkubation 2 min, 25 °C	
Zugabe von:			
3	Reverse Transkriptase SuperScript™ II		1 µl
	-		Inkubation 10 min, 25 °C

Schritt	Oligo(dT)-Primer	Random-Hexamer-Primer
		Inkubation 50 min, 42 °C
		Inkubation 15 min, 70 °C

### 2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (SAIKI R. K. *et al.* 1985) dient der Vervielfältigung von DNA. Mit der Hilfe von zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primer), von denen einer identisch zum 5'-Ende des kodierenden Stranges (*Sense*-Primer), und einer identisch zum 5'-Ende des komplementären Stranges (*Antisense*-Primer) der zu amplifizierenden, doppelsträngigen DNA-Sequenz ist, kann unter Verwendung einer DNA-Polymerase ein definierter Bereich der DNA-Sequenz dupliziert werden. Durch aufeinander folgende Zyklen von DNA-Denaturierung (30 s, 94 °C), Primer-Anlagerung (30 s, 50–65 °C in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer) und DNA-Synthese (1 min/1 kb DNA<sup>3</sup>, 72 °C), kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

In dieser Arbeit wurde die PCR für Klonierungen verschiedener Genprodukte genutzt. Dabei kam der *High-Fidelity*-PCR-Enzym-Mix von Fermentas (St. Leon-Rot) nach den Angaben des Herstellers zum Einsatz. Die PCR wurde im Thermocycler T3 (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

### 2.2.4. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ermöglicht die Vervielfältigung von Nukleinsäuren basierend auf dem Prinzip der PCR und gleichzeitig eine Quantifizierung der eingesetzten DNA-Menge. In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR unter Verwendung des iCycler IQ™ Systems (Bio-Rad, München) mit dem Farbstoff SYBR® Green durchgeführt. SYBR® Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Die detektierte Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge an gebildetem PCR-Produkt zu und wird über eine Photozelle nach jedem Zyklus registriert. Die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über den Hintergrund ansteigt, wird als C<sub>T</sub>-Wert (*cycle threshold*; Zykluszahl) angegeben.

Bei dem Entwerfen der qRT-PCR-Primer wurde besonders auf die Schmelztemperatur sowie auf die Vermeidung möglicher Sekundärstrukturen geachtet, welche zur Primerdimerisierung führen können. Zudem wurden die Primer so gewählt, dass sie eine Exon-Exon-Grenze überspannen, wodurch die Detektion von genomischer DNA ausgeschlossen werden sollte.

Die Qualität und Spezifität der Produkte wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft, die im Anschluss an die qRT-PCR durchgeführt wurde. Dabei wird durch eine langsame, kontinuierliche Temperaturerhöhung der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen und das SYBR® Green freigesetzt, wodurch es nicht mehr fluoresziert. Die Anzahl der dabei detektierten Peaks korreliert direkt mit der Anzahl der gebildeten PCR-Produkte, wobei die

<sup>3</sup> unter Verwendung des *High-Fidelity*-PCR-Enzym-Mix von Fermentas (St. Leon-Rot)

Höhe der Peaks eine Maß für die gebildete Produktmenge darstellt. Die doppelsträngige DNA spezifischer PCR-Produkte weist eine höhere Schmelztemperatur auf als die der unspezifisch gebildeten Primerdimere, wodurch eine Unterscheidung möglich wird.

Jede qRT-PCR wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Der allgemeine Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt.

**qRT-PCR-Ansatz I:** 7,5 µl 2x PCR-Master-Mix (Promega, Mannheim)  
 0,3 µl SYBR® Green (Stammlösung 1:1000 in DMSO)  
 0,15 µl Fluorescein (Jena Bioscience, Jena)  
 2,05 µl RNase/DNase-freies ddH<sub>2</sub>O

**qRT-PCR-Ansatz II:** 10 µl qRT-PCR-Ansatz I  
 0,06 µl *Sense*-Primer (50 µM)  
 0,06 µl *Antisense*-Primer (50 µM)

Zunächst wurde der qRT-PCR-Ansatz I für alle Reaktionen im Überschuss hergestellt. Anschließend wurde der qRT-PCR-Ansatz II für jedes einzelne Primerpaar separat hergestellt. Pro Reaktion wurden 10 µl vom Ansatz II in einer Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden 5 µl der cDNA (1:5 verdünnt) bzw. 5 µl RNase/DNase-freies ddH<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) zum Ansatz II pipettiert. Die qRT-PCR wurde unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt (siehe Tab. 6).

**Tab. 6 Programm für die qRT-PCR**

Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	3 min	95 °C
Denaturierung	10 s	95 °C
Primer-Anlagerung	30 s	60 °C
DNA-Synthese	30 s	72 °C
Schmelzkurve	10 s/1 °C	60–95 °C

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (LIVAK K. J. und SCHMITTGEN T. D. 2001). Dabei werden die  $C_T$ -Werte von zwei Populationen (z. B. *knockdown* und Kontrolle) nach der Normalisierung auf ein Referenzgen miteinander verglichen, wobei eine PCR-Effizienz von 100 % vorausgesetzt wird. Zur Berechnung der relativen mRNA-Menge  $R$  wurde die folgende Formel verwendet:

$$R = \frac{mRNA_{Zielpopulation}}{mRNA_{Kontrollpopulation}} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

mit

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T^{Zielpopulation} - \Delta C_T^{Kontrollpopulation}$$

und

$$\Delta C_T^{Population} = C_T^{Zielgen,Population} - C_T^{Referenzgen,Population}$$

### 2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse von Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Nukleinsäuren sind auf Grund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen, wodurch sie im elektrischen Feld zur Anode wandern. Das Gel fungiert dabei als Molekularsieb und ermöglicht die Auftrennung der Nukleinsäuren, da ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Gel im Wesentlichen durch ihre Größe und ihre Konformation bestimmt wird. Die Auftrennung erfolgte je nach Molekulargewicht der Nukleinsäuren in einem 0,7 %igen bis 2 %igen Agarosegel dem 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die Nukleinsäuren wodurch sich die Intensität seiner Fluoreszenz-Emission vervielfacht und eine Visualisierung der Nukleinsäuren im UV-Licht ermöglicht wird. DNA-Proben wurden vor der Beladung des Geles mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. RNA-Proben wurden hingegen mit 2x RNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und zur Denaturierung der Sekundärstrukturen für 10 min bei 65 °C erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Elektrophorese-Kammern in TBE-Puffer bei 100 V für 30–60 min.

6x DNA-Ladepuffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)
0,25 % (w/v) Bromphenolblau	445 mM Tris
40 % (v/v) Glycerol	445 mM Borsäure
100 mM EDTA	10 mM EDTA
0,1 % (w/v) SDS	

### 2.2.6. Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel erfolgte unter Verwendung des ‚Gel Extraction Kit‘ und die Reinigung von PCR-Produkten mit Hilfe des ‚PCR Purification Kit‘, beide von Genomed (Löhne), nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.7. Klonierung von Expressionsplasmiden

Zur Klonierung von Expressionsplasmiden wurde das entsprechende DNA-Fragment zunächst ausgehend von HeLa- oder HaCaT-cDNA unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthielten, amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit dem *High-Fidelity*-PCR-Enzym-Mix (Fermentas, St. Leon-Rot) nach den Angaben des Herstellers. Das DNA-Fragment wurde im Agarose-Gel aufgetrennt, die Bande der entsprechenden Größe ausgeschnitten und gereinigt. Anschließend konnte das Fragment durch Ligation in verschiedene Plasmide unter Verwendung entsprechender Restriktionsschnittstellen subkloniert werden. Die Expressionsplasmide wurden durch Restriktionsanalysen (siehe 2.2.8) und durch Sequenzierung (siehe 2.2.16) verifiziert.

### 2.2.8. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die sequenzspezifisch DNA schneiden. Sie werden anhand ihres Aufbaus in drei Kategorien eingeteilt, wobei in der Molekularbiologie hauptsächlich Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet werden,

da sie die DNA spezifisch an einer einzigen Stelle schneiden. Sie erkennen eine palindromische Sequenz von 4–8 Basenpaaren in einem DNA-Strang und hydrolysieren an dieser Stelle die Phosphodiesterbindung, wodurch DNA-Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende entstehen. Schneiden die Restriktionsendonukleasen die beiden DNA-Stränge an der gleichen Stelle entstehen „glatte“ Enden, schneiden sie versetzt entstehen „klebrige“ Enden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot) genutzt, um DNA-Fragmente zu klonieren bzw. um Plasmid-DNA zu analysieren. Es wurden die folgenden Ansätze (siehe Tab. 7) verwendet.

**Tab. 7 Allgemeiner Ansatz für den Restriktionsverdau**

	Präparativer Verdau	Analytischer Verdau
Plasmid-DNA (1 µg/µl)	10 µl	2 µl
10x Puffer (nach Herstellerempfehlung)	5 µl	1 µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	3 µl	0,3 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	ad 10 µl

### 2.2.9. Ligation

Bei der Ligation wird durch das Enzym Ligase eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxyl-Ende eines DNA-Fragments und dem 5'-Phosphat-Ende eines anderen DNA-Fragments geknüpft. Diese Eigenschaft wurde genutzt um DNA-Fragmente, die durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen entstanden sind, kovalent zu verknüpfen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Ligation das Enzym T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Da für eine erfolgreiche Ligationsreaktion das Mengenverhältnis zwischen DNA-Fragment und Zielvektor zwischen 3:1 bis 5:1 liegen sollte, wurde vor der Ligation eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um das Mengenverhältnis abzuschätzen. Der aufgeführte Ligationsansatz (siehe Tab. 8) wurde 2 h bei RT inkubiert.

**Tab. 8 Allgemeiner Ansatz für die Ligation**

DNA-Fragment	x µl
Zielvektor	y µl
Ligasepuffer	1,5 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 15 µl

### 2.2.10. Herstellung von chemokompetenten Bakterien

Zur Herstellung chemokompetenter *E.-coli*-Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit je einer Kolonie angeimpft und über Nacht aerob bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 2 ml dieser Vorkultur zum Animpfen einer 200-ml-Hauptkultur verwendet, welche bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,6 bei 37 °C im Schüttelkolben inkubiert wurde. Die Bakterien wurden auf Eis abgekühlt und durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 1/20 Vol. TSB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis

inkubiert. Um die kompetenten Bakterien anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  zu lagern, wurden diese mit 10 % Glycerol versetzt und zu je 100  $\mu\text{l}$  aliquotiert.

**TSB-Puffer**

1x LB-Medium (Stammlösung 2x LB-Medium; pH 6,1 mit HCl eingestellt)  
10 % (v/v) PEG 4000  
5 % (v/v) DMSO  
10 mM  $\text{MgCl}_2$   
10 mM  $\text{MgSO}_4$

**2.2.11. Herstellung von elektrokompetenten Bakterien**

Zur Herstellung elektrokompetenter *E.-coli*-Zellen wurden 10 ml LB-Medium mit je einer Kolonie angeimpft und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht aerob unter Schütteln inkubiert. 2 ml der Übernachtskultur wurden genutzt um 200 ml Hauptkultur anzupflegen. Diese wurde bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{ nm}}$  von 0,55 bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 1,5 h auf Eis gekühlt, durch Zentrifugation bei 3000 g für 10 min und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pelletiert und anschließend in 200 ml eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerol resuspendiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 3000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen erneut mit 200 ml 10 %igem (v/v) Glycerol ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen und wiederum zentrifugiert (30 min, 3000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Das Bakterienpellet wurde in 1 ml 10 %igem (v/v) Glycerol ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) aufgenommen und zu je 50  $\mu\text{l}$  auf Eis aliquotiert. Zur Lagerung der *E.-coli*-Zellen wurden diese mit Stickstoff eingefroren und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**2.2.12. Transformation von chemokompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA**

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurde ein 100- $\mu\text{l}$ -Aliquot chemokompetenter *E.-coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz bzw. 50 ng Plasmid-DNA in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  wurden mit 2,5  $\mu\text{l}$  5x KCM-Lösung versetzt und zusammen mit den *E.-coli*-Zellen für 20 min auf Eis und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden mit 1 ml LB-Medium versetzt und unter Schütteln 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

**5x KCM-Lösung**

500 mM KCl  
150 mM  $\text{CaCl}_2$   
250 mM  $\text{MgCl}_2$

**2.2.13. Transformation von elektrokompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA**

Zur Transformation der elektrokompetenten *E.-coli*-Zellen wurde ein Aliquot der Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1,5  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA versetzt. Die Bakterien wurden mit einem Puls von 500 V für 8 ms elektroporiert (Elektroporator ECM<sup>®</sup>830; VWR, Darmstadt). Anschließend wurden die transformierten Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt, 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  schüttelnd inkubiert und auf M9-Agar-Aminosäuremangel-Platten ausgestrichen.

#### 2.2.14. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Analyse der auf Selektions-Agar-Platten gewachsenen Kolonien wurde von diesen eine Übernachtskultur in 3 ml LB-Medium (mit entsprechendem Selektionsantibiotikum) angeimpft. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 13000 g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl eiskaltem GET-Puffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurde anschließend 200 µl 0,2 M NaOH mit 1 % (w/v) SDS zugesetzt und das Lysat für 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µl 3 M Na-Acetat wurden darauffolgend alle gelösten Proteine und die genomische DNA präzipitiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 g und RT wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 800 µl Isopropanol für 15 min bei RT gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation (13000 g, RT) pelletiert, anschließend mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl ddH<sub>2</sub>O (+ 0,5 ng RNase A) unter Schütteln bei 37 °C im Heizblock gelöst.

Sollte die DNA zur Transfektion humaner bzw. muriner Zelllinien genutzt werden, wurde die DNA mit Hilfe des NucleoBond<sup>®</sup> Xtra EF Midi-Präparationskits (Macherey-Nagel, Düren) gereinigt.

Wurde die Plasmid-DNA aus dem *E.-coli*-Stamm KC8 isoliert erfolgte vor der DNA-Fällung ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit Phenol-Chloroform.

Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und durch Sequenzierung. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die OD bei 260 nm mit Hilfe des Spektralphotometers Genequant 1300 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bestimmt. Bei einer OD von 1 entspricht die DNA-Konzentration 50 µg/ml (Schichtdicke der Quarzküvette: 10 mm). Die isolierte Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

##### **GET-Puffer**

50 mM Glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl; pH 8,0

#### 2.2.15. Präparation von Plasmid-DNA aus Hefen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurden 3 ml SD-Medium (mit entsprechender Aminosäure-Drop-out-Lösung) mit je einer Hefekolonie angeimpft und für 24–36 h aerob bei 30 °C schüttelnd inkubiert. 2 ml der Kultur wurden für 15 s bei 14000 g zentrifugiert und mit 200 µl Hefe-Lysepuffer, einer Spatelspitze Glasperlen (Ø 425–600 µm; Sigma Aldrich, München) und 200 µl Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt. Anschließend wurde das Lysat für 2 min mit Hilfe des Vortex (Vortex 2 Genie; Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA) durchmischt und dann zur Phasentrennung für 5 min bei 14000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 500 µl eiskaltem Ethanol und einem Gefrier-Tau-Zyklus in flüssigem Stickstoff gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 14000 g pelletiert, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet (20 min bei 37 °C). Die DNA wurde in 20 µl DNase/RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### Hefe-Lysepuffer

2 % (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100

1 % (w/v) SDS

0,1 M NaCl

10 mM Tris-HCl; pH 8,0

1 mM EDTA; pH 8,0

### 2.2.16. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchführt.

## 2.3. Zellbiologische Methoden

### 2.3.1. Kultivierung humaner und muriner Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die humanen Zelllinien HEK 293, HeLa und HaCaT verwendet. Diese Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) unter Zusatz von 10 % (v/v) FCS (*fetal calf serum*) und 1 mM Na-Pyruvat im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2–3 Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBSE gewaschen und anschließend mit 0,5 % Trypsin/PBSE von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und 3 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert, die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl replattiert.

Die verwendete Maus-Keratinocyten-Zelllinie wurde auf mit Kollagen I (Kollagen I *rat tail*, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) beschichteten Kulturschalen in DMEM/Ham's-F12-*low-Calcium*-Medium von Biochrom (Zusätze siehe Tab. 9) bei 32 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 2–3 Tagen wurden diese Zellen ebenso wie die humanen Zelllinien (allerdings unter Verwendung von 0,045 % Trypsin/PBSE) passagiert.

**Tab. 9 Zusätze für DMEM/Ham's-F12-*low-Calcium*-Medium**

Zusatz	Verwendete Stammlösung
10 % (v/v) FCS ohne Ca <sup>2+</sup>	-
1 % (v/v) Na-Pyruvat	-
0,18 mM Adenin	45 mM in 0,1625 % HCl
5 µg/ml Insulin	5 mg/ml in 0,01625 % HCl
25,5 µg/ml Hydroxycortison	51 mg/ml in Ethanol
0,1 µg/ml EGF ( <i>epidermal growth factor</i> )	10 µg/ml in DMEM/Ham's F12 <i>low Calcium</i>
5 µl Choleratoxin	10 <sup>-5</sup> M

Um die Kulturschalen mit Kollagen I zu beschichten, wurden 5 ml Kollagen-Lösung (43,09 mg/l in 0,02 N Essigsäure) auf eine 10-cm-Kulturschale gegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Schale wurde dann zweimal mit PBS gewaschen und konnte anschließend verwendet werden.

#### **PBSE**

135 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,5 mM EDTA  
pH 7,4

### **2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese wie unter 2.3.1 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und in ein Einfrier-Röhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte über Nacht bei -80 °C in einer mit Isopropanol gefüllten Box, in welcher die Abkühlrate 1 °C/min betrug. Anschließend erfolgte die Lagerung der Zellen bei -80 °C.

Die Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in Kulturmedium überführt. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 1000 g wurde das Zellpellet in neuem Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturschale überführt.

### **2.3.3. Transfektion humaner und muriner Zellen**

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryontische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Calcium-Phosphat-Präzipitation, die Lipofektion sowie die Nukleofektion genutzt um die verwendeten Zelllinien (siehe 2.1.4) zu transfizieren.

#### **2.3.3.1. Calcium-Phosphat-Präzipitation**

Die zu transfizierende DNA bindet bei dieser Transfektionsmethode an Calciumphosphat-kristalle, welche in einer Lösung aus CaCl<sub>2</sub> und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ausfallen. Die Kristalle und damit die DNA werden durch Endozytose von den Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden ca. 20 h vor der Transfektion so eingesät, dass sie am Tag der Transfektion ca. 70 % konfluent waren. 20 min vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen frisches Medium ersetzt (800 µl Medium pro 2-cm-Kulturschale). Die Calcium-Phosphat-Präzipitation wurde genutzt, um Plasmid-DNA in HEK-293-Zellen einzubringen. Dabei wurde der in Tab. 10 aufgeführte Ansatz verwendet.

**Tab. 10 Allgemeiner Ansatz für die Calcium-Phosphat-Präzipitation (2-cm-Kulturschale)**

<b>Zusatz</b>	<b>Menge</b>
Plasmid-DNA	7,5 µg
CaCl <sub>2</sub> (2 M)	12,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Zunächst wurde die DNA in ddH<sub>2</sub>O entsprechend verdünnt und anschließend mit CaCl<sub>2</sub> versetzt. Die DNA-Lösung wurde tropfenweise zu 100 µl DNA-Präzipitationspuffer gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei RT wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde 6 h nach der Transfektion entfernt, die Zellen mit Medium ohne FCS gewaschen und mit 500 µl Glycerol-Puffer für 1,5 min bei RT versetzt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen in Kulturmedium inkubiert.

**DNA-Präzipitationspuffer**

280 mM NaCl  
10 mM KCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
12 mM Glucose  
50 mM HEPES  
pH 7,05

**Glycerol-Puffer**

50 % (v/v) DNA-Präzipitationspuffer  
15 % (v/v) Glycerol  
35 % (v/v) ddH<sub>2</sub>O

**2.3.3.2. Lipofektion**

Die Lipofektion ist eine Form der Transfektion, bei der die DNA mit Hilfe von kationischen Lipidvesikeln in die Zellen eingebracht wird. Kationische Lipide bilden zusammen mit Phospholipiden kationische Liposomen, welche an die negativ geladenen Nucleinsäuren binden. Die entstandenen Komplexe können von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Lipofektion von DNA Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad) bzw. TrueFect™ (United Biosystems, Rockville, Maryland, USA) genutzt. Die Lipofektion von siRNA erfolgte unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad). Die Transfektion der Zellen (HEK 293, HeLa, HaCaT, Maus-Keratinocyten) erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Die Zellen wurden ca. 20 h vor der Transfektion so eingesät, dass sie am Tag der Transfektion ca. 70 % konfluent waren.

**2.3.3.3. Nucleofektion**

Die Nucleofektion (Lonza, Basel, Schweiz) kombiniert die Elektroporation von Zellen mit Zelltyp-spezifischen Reagenzien, um eine möglichst effektive und schonende Transfektion der Zellen zu erreichen. Die zu transfizierende DNA bzw. siRNA wird bei dieser Methode direkt in den Zellkern eingebracht.

Die Nucleofektion wurde genutzt, um HaCaT-Zellen mit siRNA zu transfizieren. Dabei wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen in 100 µl Nucleofektor-Lösung V resuspendiert, mit 100 pmol siRNA versetzt und in eine Küvette überführt. Die Nucleofektion erfolgte mit Hilfe des Nucleofektors (Programm U-20, Herstellerangabe). Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium überführt und in entsprechender Zellzahl in Kulturschalen replattiert.

### 2.3.4. Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenz können Proteine in fixierten Zellen sichtbar gemacht werden. Unter Verwendung eines spezifischen Primärantikörpers wird das Protein in der Zelle detektiert und unter Verwendung eines zweiten, Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpers, visualisiert.

Zur Anfertigung von Immunfluoreszenz-Präparaten wurden die Zellen auf Deckgläschen eingesät und ggf. transfiziert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis mit 3,7 % (w/v) Formaldehyd fixiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit 0,5 % (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 für 15 min bei RT permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurde 1 % (w/v) Milchpulver<sup>4</sup>/PBS (30 min, RT) auf die Zellen gegeben, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Die Zellen wurden anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Tab. 16) in 1 % (w/v) Milchpulver/PBS bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und einer 10-minütigen Inkubation in 1 % (w/v) Milchpulver/PBS bei RT wurde die Zellen für 1 h mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper (siehe Tab. 17) bei RT inkubiert. Außerdem erfolgte in diesem Schritt die Markierung der DNA mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol). Die Zellen wurden anschließend dreimal in PBS, sowie einmal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich mit 96 % Ethanol entwässert. Nach erfolgter Trocknung der Zellen wurden diese in Mowiol eingebettet.

#### **Mowiol**

5 % (w/v) Mowiol

30 % (v/v) Glycerol

0,25 % (w/v) DABCO

Die angefertigten Präparate wurden entweder an einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop bzw. am Zeiss Axio Observer aufgenommen. Das Nikon-Mikroskop war mit einer Vosskühler CCD-1300-QLN-Kamera und der Software NIS-Elements AR 2.30 MuTech MV1500 (beide von Nikon, Düsseldorf) ausgestattet. Das Mikroskop von Zeiss verfügte über die Software AxioVision Rel. 4.7 und die Kamera AxioCam MR Rev3 (beide von Carl Zeiss, Jena).

Die Bearbeitung sowie die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ Version 1.42 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) bzw. mit der Software Adobe Photoshop CS2 Version 9.0.

### 2.3.5. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ist eine Methode um RNA bzw. DNA in Zellen oder Geweben unter Verwendung spezifischer Sonden nachzuweisen. Die Sonden, kurze

---

<sup>4</sup> Milchpulver Sucofin von Edeka, Hamburg

fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, können durch Basenpaarung an ihre komplementäre DNA- oder RNA-Sequenz in der Zelle binden und diese somit nachweisen.

Um neben der Lokalisation von Proteinen auch die Lokalisation von Poly(A)-mRNA in der Zelle zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit eine am 5'- und 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierte Sonde, bestehend aus 20 Desoxythymidinen (Cy3-Oligo(dT)<sub>20</sub>), verwendet. Die Sonde wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Die Zellen wurden dafür zunächst mit Primär- und Sekundärantikörpern (siehe Abschnitt 2.3.4) markiert und anschließend erneut mit 3,7 % Formaldehyd für 20 min bei 4 °C fixiert, um die entstanden Immunkomplexe zu vernetzen. Nach einer einstündigen Inkubation mit Prähybridisierungspuffer bei 42 °C erfolgte die Hybridisierung der Sonde in Puffer II bei 37 °C über Nacht. Die Präparate wurden anschließend zweimal mit Prähybridisierungspuffer (20 min, 37 °C) und PBS (30 min, RT) gewaschen und in ,ProLong® Gold Antifade'-Reagenz (Invitrogen, Carlsbad) eingebettet.

Prähybridisierungspuffer	Puffer II
40 % Formamid	0,5 ng/µl Cy3-Oligo(dT) <sub>20</sub>
12 % 20x SSC	10,9 % 20x SSC
	40 % Formamid
	0,08 µg/µl BSA
	25 ng/µl ssDNA
	25 ng/µl tRNA

### 2.3.6. Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

BiFC ist eine Methode um Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle zu visualisieren und zusätzlich den Ort der Interaktion zu identifizieren. Die BiFC-Methode basiert dabei auf der Assoziation zweier nicht-fluoreszierender Fragmente eines Fluoreszenzproteins zu einem fluoreszierenden Komplex. Um Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle nachzuweisen, fusioniert man die nicht-fluoreszierenden Fragmente an die zu untersuchenden Proteine. Kommt es in der Zelle zu einer Interaktion, so werden die nicht-fluoreszierenden Fragmente in räumliche Nähe gebracht und der funktionelle Fluorophor rekonstituiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die BiFC-Methode genutzt, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* unter Verwendung des Venus-Proteins (Variante des EYFP: *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) zu analysieren. Die zu untersuchenden Proteine wurden dabei mit je einer nichtfluoreszierenden Hälfte des Venusproteins (V1-FLAG entspricht der N- bzw. V2-HA der C-terminalen Hälfte) fusioniert. Die entsprechenden Plasmide wurden in HeLa-Zellen transfiziert und das BiFC-Signal 24 h nach der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (siehe 2.3.4). Der in den Plasmiden zusätzlich enthaltene FLAG- bzw. HA-tag ermöglichte die Expression der einzelnen Konstrukte unabhängig vom BiFC-Signal zu prüfen.

### 2.3.7. Proximity Ligation Assay (PLA)

Der *Proximity Ligation Assay* dient dem Nachweis von Protein-Protein-Assoziation *in vivo* auf endogener Ebene. Dabei werden die Zielproteine zunächst mit spezifischen Primärantikörpern unterschiedlicher Spezies markiert und anschließend mit sog. PLA-Sonden inkubiert. Bei den PLA-Sonden handelt es sich um Oligonukleotid-markierte Sekundärantikörper welche an die Primärantikörper binden. Befinden sich die Proteine in räumlicher Nähe, so können die Oligonukleotide der Sekundärantikörper durch eine Ligationsreaktion zirkulär verbunden werden. Die Zugabe fluoreszierender Nukleotide und einer Polymerase führt dann zur Amplifikation der zirkulären DNA und die Produkte können als Fluoreszenzsignal in der Zelle detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das PLA-System Duolink II von Olink AB (Uppsala, Schweden) genutzt, dabei kamen eine Anti-Kaninchen-PLUS- und eine Anti-Maus-MINUS-Sonde zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Olink AB, Uppsala, Schweden).

### 2.3.8. Messung der Zellproliferation mittels BrdU-Einbau

BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin) ist ein Thymidinanalogon. Es wird von der Zelle aufgenommen und während der Synthesephase anstatt des 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphats (dTTP) in die DNA eingebaut (PORSTMANN T. *et al.* 1985). Unter Verwendung eines Peroxidase-konjugierten-BrdU-Antikörpers kann die Menge an eingebautem BrdU in der Zelle detektiert und mittels Mikroplattenlesegerät ‚Multiskan RC Microplate Reader‘ (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm quantifiziert werden.

Zur Analyse der eingebauten BrdU-Menge wurden  $0,5 \cdot 10^4$  HaCaT-Zellen mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert und in 100  $\mu$ l Kulturmedium, als Triplikat, in die Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte eingesät. Mit Hilfe des ‚BrdU colorimetric Cell Proliferation ELISA‘-Kits (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) konnte die Menge an eingebautem BrdU 24, 48, 72 und 96 h nach der Transfektion, entsprechend den Angaben des Herstellers, untersucht werden. Alle Messwerte wurden auf den 24-h-Wert normalisiert, um Unterschiede in den eingesäten Zellzahlen auszuschließen. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne die Zugabe von BrdU verwendet. Die daraus resultierenden Messwerte wurden als Hintergrund von den eigentlichen Messwerten subtrahiert.

### 2.3.9. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet (siehe auch Abschnitt 2.3.1).

Die Zellvitalität bezeichnet den Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl. Um diese zu bestimmen, wurden die Zellen der Kultur sowie des Kulturüberstandes vor dem Auszählen mit 0,25 % Trypanblau gefärbt. Tote Zellen werden durch den Diazofarbstoff blau markiert, wohingegen lebende Zellen den Farbstoff ausschließen und unter dem Lichtmikroskop weiß erscheinen.

## 2.4. Biochemische Methoden

### 2.4.1. Isolierung von Proteinen

Die Isolierung von Proteinen aus den Zellen erfolgte, indem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in den entsprechenden Lysepuffern aufgenommen wurden. Zum Aufschluss wurde die Zellsuspension mit einer Kanüle ( $\varnothing$  0,45 mm) homogenisiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Abtrennung von Zelltrümmern und ungelöster Proteine erfolgte durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 14000 g und 4 °C. Von den Proben wurde vor der entsprechenden Verwendung eine Proteinbestimmung (siehe 2.4.2) durchgeführt.

RIPA-Lysepuffer	Nicht-denaturierender Puffer	SDS-Puffer
50 mM Tris-HCl; pH 7,4	20 mM Tris-HCl; pH 8	25 mM Tris-HCl; pH 7,4
150 mM NaCl	137 mM NaCl	1 % (w/v) SDS
1 mM EDTA	10 % (w/v) Glycerol	
1 mM EGTA	1 % (w/v) NP-40	
1 % (w/v) NP-40	2 mM EDTA	
0,25 % Natriumdesoxycholat	10 µg/ml Aprotinin	
10 µg/ml Aprotinin	10 µg/ml Leupeptin	
10 µg/ml Leupeptin	1 mM Pefabloc	
1 mM Pefabloc		

### 2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das ‚MicroBC Assay: Protein Quantitation Kit‘ (Interchim, Montluçon, Frankreich) nach den Angaben des Herstellers verwendet, welches auf einer Biuret-Reaktion basiert. Zur Erstellung einer Kalibrierungsgerade wurden BSA-Lösungen (BSA: *bovine serum albumin*) bekannter Konzentration (2,5–100 µg/ml) verwendet.

### 2.4.3. SDS-PAGE

In der vorliegenden Arbeit wurde die SDS-PAGE (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) (LAEMMLI U. K. 1970) zur Auftrennung von Proteinen verwendet. Dabei kamen 7,5–15 %ige Polyacrylamid-Gele zum Einsatz. 20–80 µg Protein in 24 µl des entsprechenden Lysepuffers wurden mit 8 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Neben den Proteinproben wurde 10 µl Proteinmarker (‚Unstained Protein Molecular Weight Marker‘ bzw. ‚Prestained Protein Marker‘; Fermentas, St. Leon-Rot) auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die

Elektrophorese erfolgte bei 90 V für 120 min in Elektrophoresepuffer. Im Anschluss wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbt oder auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman, Dassel) übertragen (siehe Abschnitt 2.4.5).

**4x SDS-Probenpuffer**

8 % (w/v) SDS  
250 mM Tris-HCl; pH 6,8  
30 % (v/v) Glycerol  
10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

**Elektrophoresepuffer**

25 mM Tris-HCl; pH 8,8  
19,2 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS

**Sammelgelpuffer**

0,5 M Tris-HCl; pH 6,8

**Trenngelpuffer**

1,5 M Tris-HCl; pH 8,8

**2.4.4. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen**

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, welcher sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und dadurch nahezu alle Proteine färbt. Für eine Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau wurden die Polyacrylamid-Gele in der Lösung aufgekocht und weitere 5 min mit der Lösung inkubiert. Um den ungebundenen Farbstoff zu entfernen wurden die Gele mehrmals in Entfärber-Lösung gekocht.

**Coomassie-Lösung**

0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250  
9,2 % (v/v) Essigsäure  
45 % (v/v) Methanol

**Entfärber-Lösung**

7,5 % (v/v) Essigsäure  
5 % (v/v) Methanol

**2.4.5. Western Blot**

Der Western Blot nach dem *Semi-Dry*-Verfahren (Aufbau siehe Tab. 11) wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Proteine von Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulosemembranen zu übertragen. Der Proteintransfer erfolgte bei 1 mA pro cm<sup>2</sup>-Membran für 2 h und wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Nach der Entfärbung der Membran mit TBST wurden freie Proteinbindestellen durch eine Inkubation in 5 % (w/v) Milchpulver<sup>5</sup>/TBST (1 h, RT) abgeblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers (siehe Tab. 16) in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST bzw. 5 % (w/v) BSA/TBST bei 4 °C über Nacht (je nach den Angaben des Herstellers). Nach drei 10-minütigen Waschschritten in TBST wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (siehe Tab. 17) für 1 h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBST erfolgte die Detektion des Antikörpers mittels Chemilumineszenz (CL). Die Membran wurde mit CL-Lösung (1:1 Mischung aus CL-Lösung I und II) inkubiert und das emittierte Licht durch einen lichtempfindlichen Film (Fujifilm, Düsseldorf) detektiert.

<sup>5</sup> Milchpulver Sucofin von Edeka, Hamburg

<p><b>TBST</b>          10 mM Tris-HCl; pH 7,6          1 % (v/v) Tween-20          100 mM NaCl</p>	<p><b>Ponceau-S-Lösung</b>          2 % (w/v) Ponceau S          30 % (w/v) TCA          30 % (w/v) Sulfosalizylsäure</p>	<p><b>CL-Lösung I</b>          25 mM Luminol          0,4 mM Cumarinsäure          100 mM Tris-HCl; pH 8,5</p> <p><b>CL-Lösung II</b>          0,02 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>          100 mM Tris-HCl; pH 8,5</p>
<p><b>Blotpuffer I</b>          0,3 M Tris-HCl; pH 10,4          20 % (v/v) Methanol</p>	<p><b>Blotpuffer II</b>          25 mM Tris-HCl; pH 10,4          20 % (v/v) Methanol</p>	<p><b>Blotpuffer III</b>          25 mM Tris-HCl; pH 9,4          20 % (v/v) Methanol          40 mM ε-Aminocapronsäure</p>

**Tab. 11 Schematischer Aufbau eines *Semi-Dry-Western-Blots***

Kathode
3 Lagen Whatmanpapier in Blotpuffer I
3 Lagen Whatmanpapier in Blotpuffer II
Nitrocellulosemembran, in Blotpuffer II inkubiert
SDS-Polyacrylamid-Gel
3 Lagen Whatmanpapier in Blotpuffer 3
Anode

**2.4.6. Metabolische Markierung von Zellen mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin**

Um den Einfluss von Plakophilin 3 auf die globale Proteinsyntheserate kultivierter Zellen qualitativ und quantitativ zu analysieren, wurden Proteine durch den Einbau von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. HEK-293-Zellen wurden dafür mit einem Plakophilin-3-Plasmid bzw. mit einem Kontroll-Plasmid transfiziert. Die Zellen einer 2-cm-Kulturschale wurden 24 h nach der Transfektion zweimal mit methioninfreiem Medium (Invitrogen, Carlsbad) gewaschen und anschließend mit 1 ml methioninfreiem Medium für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden dem Medium 50 µCi L-[<sup>35</sup>S]-Methionin zugesetzt und die Zellen damit 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und unter Verwendung von SDS-Puffer (siehe 2.4.1) Proteinextrakte hergestellt. Die Proteinkonzentration in den Extrakten wurde wie unter 2.4.2 beschrieben bestimmt. Die Proteinextrakte (10 µg) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Nach der Färbung wurden die Polyacrylamid-Gele fixiert und getrocknet. Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie bei -80 °C.

**Fixierer**

- 50 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

### 2.4.7. Expression von GST- bzw. His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen

Zur Expression von GST- (Glutathion-S-Transferase) bzw. His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden Plasmide in die jeweiligen *E.-coli*-Stämme transformiert (siehe Transformation 2.2.12 bzw. Tab. 12 für eine Übersicht). Die Bakterienkolonien wurden in 10 ml 2x YT-Medium resuspendiert und die OD<sub>600 nm</sub> bestimmt. Je nach Expression wurde eine Hauptkultur von 200–900 ml 2x YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit der Bakteriensuspension auf eine OD<sub>600 nm</sub> von 0,05 eingestellt (siehe Tab. 12). Die Hauptkultur (HK) wurde bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,4 schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte ggf. die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM bzw. 0,5 mM IPTG und die weitere Inkubation bei der in Tab. 12 angegebenen Temperatur über Nacht (T<sub>ÜN</sub>). Lediglich für die Expression von GST-Plakophilin-1 wurde die Hauptkultur auf eine OD<sub>600 nm</sub> von 0,01 eingestellt und diese für 16 h bei 20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG für 4 h bei 20 °C.

Die Bakterien wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 5000 g und 4 °C pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Zur Analyse wurden das Pellet in Bakterien-Lysepuffer aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 1 % (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 versetzt und 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Abtrennung ungelöster Proteine und Zelltrümmer erfolgte durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 14000 g und 4 °C. Das dabei entstandene Pellet sowie die lösliche Fraktion wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und durch SDS-PAGE und Western Blot auf die Expression des jeweiligen Proteins hin untersucht.

**Tab. 12 Übersicht zur Expression von GST- und His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen**

Fusionsprotein	<i>E.-coli</i> -Stamm	V <sub>HK</sub> [ml]	IPTG-Induktion	T <sub>ÜN</sub> [°C]
GST-Plakophilin-1	BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3) RIL	900	1 mM	20 °C
GST-Plakophilin-3	ArcticExpress <sup>™</sup> (DE3) RIL	200	0,5 mM	13 °C
GST-eIF4A1	BL21 (DE3)	200	1 mM	20 °C
GST	BL21 (DE3)	200	1 mM	20 °C
His <sub>6</sub> -Plakophilin-3	BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3) RIL	800	-	20 °C
His <sub>6</sub> -eIF3c (einschließlich aller His <sub>6</sub> -eIF3c-Fragmente)	SHuffle <sup>™</sup> T7 Express	500	-	20 °C
His <sub>6</sub> -eIF3f	ArcticExpress <sup>™</sup> (DE3) RIL	200	-	13 °C
His <sub>6</sub> -eIF4E	BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3) RIL	200	1 mM	30 °C
His <sub>6</sub> -eIF4G-Fragmente	ArcticExpress <sup>™</sup> (DE3) RIL	200	-	13 °C

Fusionsprotein	<i>E.-coli</i> -Stamm	V <sub>HK</sub> [ml]	IPTG-Induktion	T <sub>ÜN</sub> [°C]
His <sub>6</sub> -eIF4B	BL21-CodonPlus® (DE3) RIL	200	1 mM	30 °C
His <sub>6</sub> -PABP	BL21-CodonPlus® (DE3) RIL	200	1 mM	30 °C

**Bakterien-Lysepuffer**

50 mM Tris-HCl; pH 7,5  
 150 mM NaCl  
 1 mM EDTA  
 10 % (v/v) Glycerol  
 10 µg/ml Aprotinin  
 10 µg/ml Leupeptin  
 1 mM Pefabloc  
 1 mM DTT

**2.4.8. Reinigung von Plakophilin 3**

Der Zellaufschluss sowie alle weiteren Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zur Reinigung von His<sub>6</sub>-Plakophilin-3 wurden 5 g des Bakterienpellets in 40 ml Aufschluss-Puffer durch einen Ultra-Turrax T25 (IKA, Staufen) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Hochdruckdispersion mittels Gaulin Micron Lab 40 (APV, Lübeck) bei 600 bar (drei Zyklen). Zelltrümmer und ungelöste Proteine wurden durch Zentrifugation (30 min, 15000 g) entfernt. Die Ni-NTA-Sepharose-Säule (10 ml, HIS Trap™ HP; GE Healthcare, Uppsala, Schweden) wurde mit 10 Säulenvolumen (SV) Puffer (95 % Puffer A + 5 % Puffer B) äquilibriert und anschließend mit dem Zellextrakt bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen. Um ungebundenes Protein zu entfernen, wurde die Säule dann mit 10 SV Puffer (95 % Puffer A + 5 % Puffer B) gewaschen. Die Elution von Plakophilin 3 erfolgte über einen Gradienten von 0–500 mM Imidazol über 40 SV. Es wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt und diese anschließend durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Plakophilin 3 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und auf eine äquilibrierte (10 SV, 95 % Puffer C + 5 % Puffer D) HiTrap™-SP-HP-Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) geladen. Nach dem Waschen der Säule (10 SV, 95 % Puffer C + 5 % Puffer D) erfolgte die Elution über einen Gradienten von 0–2 M NaCl über 20 SV. Die 1-ml-Fraktionen wurden erneut analysiert und Plakophilin 3 enthaltende Fraktionen bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

**Aufschluss-Puffer**

25 mM Imidazol  
 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 150 mM NaCl  
 10 µg/ml Aprotinin  
 10 µg/ml Leupeptin  
 1 mM Pefabloc  
 1 mM DTT  
 pH 7,5

**Puffer A**

25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 500 mM NaCl  
 10 % (v/v) Glycerol  
 2 mM DTT  
 pH 7,5

**Puffer B**

25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 500 mM NaCl  
 500 mM Imidazol  
 2 mM DTT  
 pH 7,5

<b>Puffer C</b>	<b>Puffer D</b>
20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA
10 % (v/v) Glycerol	10 % (v/v) Glycerol
2 mM DTT	2 mM DTT
pH 8,5	2 M NaCl
	pH 8,5

#### **2.4.9. Präzipitation von transient exprimierten FLAG- bzw. - GFP-Fusionsproteinen**

Um die transient exprimierten FLAG- bzw. GFP-Fusionsproteine zu präzipitieren wurden die Zellen zunächst wie unter 2.4.1. beschrieben lysiert (1 ml Puffer pro 10-cm-Kulturschale). Für die FLAG-Immunpräzipitationen wurde das Zelllysate mit 20 µl äquilibrierter FLAG-Agarose bzw. für die GFP-Immunpräzipitationen mit 20 µl äquilibrierter Protein-A-Agarose und 5 µg Anti-EGFP-Antikörper (Anti-EGFP-Kaninchen; Invitrogen, Carlsbad) für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Proteine mit einem GFP-tag wurden alternativ dazu unter Verwendung von 20 µl GFP-Trap<sup>®</sup>\_A (ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried) präzipitiert. Anschließend wurde die Agarose fünfmal mit dem entsprechenden Lysepuffer gewaschen. Die Elution der präzipitierten Proteine erfolgte durch Zugabe von 25 µl 2x SDS-Probenpuffer. Die Präzipitate wurden unter Verwendung von SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

#### **2.4.10. GST-pulldown**

Der GST-pulldown dient dem Nachweis einer spezifischen Interaktion zwischen zwei Proteinen *in vitro*. Ein Protein wird dabei über einen GST-tag (Glutathion-S-Transferase-tag) in einer Enzym-Substrat-Reaktion an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Die Protein-Sepharose wird anschließend mit *E.-coli*-Zelllysate inkubiert. Gebundene Proteine können durch eine SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* wurden die zu untersuchenden Proteine in *E. coli* wie unter 2.4.7. beschrieben exprimiert. Für einen GST-pulldown wurde das Pellet einer 10-ml-Bakterienkultur ( $OD_{600\text{ nm}}=1$ ) in 1 ml Bakterien-Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Lysate wurden mit 1 % (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Unlösliche Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min, 14000 g, 4 °C) abgetrennt. Die Glutathion-Sepharose (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wurde durch dreimaliges Waschen mit Bakterien-Lysepuffer äquilibriert.

Um das jeweilige GST-Fusionsprotein an der Glutathion-Sepharose zu immobilisieren, wurden 20 µl der Sepharose mit 1 ml Bakterienlysate mit oder ohne 50 µg/ml RNase A für 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Danach wurde die Sepharose dreimal mit Bakterien-Lysepuffer gewaschen um ungebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml *E.-coli*-Lysate des jeweiligen His<sub>6</sub>-Fusionsproteins zur Protein-Sepharose gegeben und 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Bakterien-Lysepuffer wurden die gebundenen

Proteine mit 25 µl 2x SDS-Ladepuffer eluiert und unter Verwendung von SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

#### 2.4.11. Präzipitation mit 7-Methyl-GTP-Sepharose

Die 7-Methyl-GTP-Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um Bestandteile des Translationsinitiationskomplexes zu präzipitieren. Dafür wurden die entsprechenden Zellen ggf. mit Plasmid-DNA bzw. siRNA transfiziert. Zur Präzipitation wurden die Zellen (wie unter 2.4.1. beschrieben) in *cap*-Präzipitationspuffer lysiert (500 µl Puffer pro 10-cm-Kulturschale). Das Zelllysate wurde anschließend für 2 h bei 4 °C mit 20 µl äquilibrierter 7-Methyl-GTP-Sepharose (7-Methylguanosin-5'-triphosphat-Sepharose) rotierend inkubiert (die Äquilibration erfolgte durch zweimaliges Waschen mit *cap*-Lysepuffer und einmaliges Waschen mit *cap*-Waschpuffer). Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit 500 µl *cap*-Waschpuffer gewaschen. Die Elution der präzipitierten Proteine erfolgte spezifisch durch die Zugabe von 20 µl 7-Methylguanosin-5'-triphosphat (20 mM) für 1 h auf Eis. Die Eluate wurden unter Verwendung von SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

##### ***cap*-Lysepuffer**

20 mM MOPS; pH 7,2 (mit KOH eingestellt)  
 25 mM KCl  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 2 mM Benzamidin  
 2 mM EGTA  
 10 % (v/v) Glycerol  
 10 µg/ml Aprotinin  
 10 µg/ml Leupeptin  
 1 mM Pefabloc  
 0,5 mM DTT  
 0,4 % (w/v) Na-Desoxycholsäure  
 0,1 mM GTP

##### ***cap*-Waschpuffer**

20 mM MOPS; pH 7,2 (mit KOH eingestellt)  
 20 mM KCl  
 2 mM Benzamidin  
 1 mM Magnesiumacetat  
 0,25 % (v/v) NP-40  
 0,1 mM GTP  
 7 mM β-Mercaptoethanol

#### 2.4.12. Hefe-Dihybrid-System

Das Hefe-Dihybrid-System dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Das System basiert auf dem GAL4-Transkriptionsfaktor der Hefe, welcher genetisch in zwei funktionelle Domänen untergliedert werden kann. Eine DNA-Bindedomäne (GAL4-BD), welche an die sog. *upstream activation sequence* (UAS) bindet und eine Aktivierungsdomäne (GAL4-AD), welche den RNA-Polymerase-II-Komplex zur Transkription der *downstream* der UAS liegenden Gene veranlasst. Normalerweise befinden sich beide Domänen auf einer Polypeptidkette, sie sind aber auch dann wirksam, wenn sie durch zwei interagierende Proteine, an welche sie fusioniert sind, über nicht-kovalente Protein-Protein-Interaktion zusammengebracht werden. Dadurch können Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. Die einzelnen Domänen sind in der Hefe nicht aktiv.

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden die cDNAs der zu untersuchenden Proteine als Fusionsplasmide entweder mit der GAL4-BD (pGBKT7 bzw. pBD) oder mit der GAL4-AD (pGADT7) generiert (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich). Die Transformation der verwendeten Hefestämme (siehe 2.1.3) sowie die Selektion wurde nach den Angaben des ‚Yeast Protocols Handbook‘ von Clontech durchgeführt.

Um putative Plakophilin-3-Interaktionspartner unter Verwendung des Hefe-Dihibrid-Systems zu identifizieren, wurde ein Screening mit der Plakophilin-3-Kopfdomäne und einer normalisierten humanen cDNA-Bibliothek (Clontech) nach den Angaben des ‚Matchmaker Pretransformed Libraries User Manual‘ von Clontech durchgeführt. Die Hefe-DNA wurde wie unter 2.2.15 beschrieben isoliert und dann in den elektrokompetenten *E.-coli*-Stamm KC8 transformiert. Anschließend wurden die Zellen auf M9-Agar ohne Leucin selektiert. Bei der Transformation von *E. coli* wird statistisch nur ein Plasmid aufgenommen. Die Selektion auf Leucin ermöglichte dabei *E.-coli*-Zellen, welche das Plakophilin-3-Kopf-pBD-Plasmid enthielten, das für ein Tryptophan- und nicht für ein Leucin-Auxotrophiegen kodiert, von *E.-coli*-Zellen zu separieren, welche Genbankplasmide trugen, da diese Plasmide für ein Leucin-Auxotrophiegen kodieren. Die isolierten Plasmid-DNAs wurden anschließend sequenziert und damit putative Plakophilin-3-Interaktionspartner identifiziert.

Als Reporteragen für die Interaktionsanalysen diente *his3* und für das Screening zusätzlich *ade2*. Ein Wachstum der Hefen auf SD-Agar ohne Histidin bzw. Adenin zeigt somit eine Protein-Protein-Interaktion an. Um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse zu verringern, wurden die entsprechenden Plasmide einzeln in die Hefe transformiert und ihr Wachstum auf SD-Agar ohne Histidin überprüft. Des Weiteren wurde das Wachstumsverhalten der mit Fusionsplasmid und Leervektor transformierten Hefen verglichen, um negative Effekte auf das Wachstum durch die Plasmide auszuschließen.

#### **2.4.13. Dichtegradientenzentrifugation**

Die Dichtegradientenzentrifugation ist eine physikalische Trennmethode. Durch Ultrazentrifugation können Makromoleküle auf Grund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften im Dichtegradienten getrennt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dichtegradientenzentrifugation genutzt, um polysomale von monosomaler RNA zu trennen. Es wurde ein 5-stufiger Sucrosegradient (2 ml 15 % Sucrose; 2 ml 22,5 % Sucrose; 2 ml 30 % Sucrose; 2 ml 37,5 %, 2 ml 45 % Sucrose) verwendet. Je Gradient wurden ca.  $8-10 \cdot 10^6$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin von den Kulturschalen abgelöst und anschließend mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml 1x Gradientenpuffer mit 0,5 % (v/v) NP-40. Das Zelllysate wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 14000 g zentrifugiert, um Zelltrümmer und ungelöste Proteine abzutrennen. Auf den

Sucrosegradienten wurden 800 µl Lysat aufgetragen und für 2 h bei 285000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient unter Verwendung eines Gradientenfraktionierers der Firma BRANDEL (Gaithersburg, Maryland, USA) fraktioniert. Die RNA der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe der TRIzol-Methode isoliert (siehe 2.2.1).

**10x Gradientenpuffer**

100 mM HEPES

1,5 M KCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

pH 7,4

#### 2.4.14. Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse wurde als Doppelbestimmung angefertigt. Je Probe wurden zwei 10-cm-Kulturschalen mit Maus-Keratinocyten mit einer spezifischen Plakophilin-1- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet. Ein Teil der Zellen diente dazu, sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene, den *knockdown* von Plakophilin 1 zu prüfen (Western Blot siehe 2.4.5 und Isolierung von RNA siehe 2.2.1). Mit dem zweiten Teil der Zellen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Die RNA der monosomalen und polysomalen Fraktion wurde mit TRIzol isoliert (siehe 2.2.1). In einem zweiten Reinigungsschritt wurde die RNA mit 0,6 Vol. 5 M Ammoniumacetat und 4,5 Vol. 96 % Ethanol erneut gefällt. Die getrocknete RNA wurde in RNase/DNase freiem ddH<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Reinheit der RNA wurde mit dem Mikroplattenlesegerät ‚Infinite 200 PRO Nano Quant‘ der Firma Tecan (Männedorf, Schweiz) bestimmt.

Die Microarray-Analyse wurde von der ‚Core Unit DNA-Technologien‘ der Universität Leipzig (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung, Medizinische Fakultät Leipzig) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Knut Krohn durchgeführt. Für die Microarray-Analyse wurde ein ‚Illumina Mouse Whole Genome Ref8 v2 Expression Bead Chip‘ verwendet. 1 µl der RNA wurde unter Verwendung des ‚Epicentre TargetAmp™-Nano Labeling Kit for Illumina® Expression BeadChip‘ (Biozym, Hessisch Oldendorf) und der Reversen Transkriptase SuperScript™ III (Invitrogen, Carlsbad) in biotin-markierte cRNA nach Herstellerangaben transkribiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) aus der cRNA entfernt. Die cRNA wurde über Nacht mit dem ‚Illumina Mouse Whole Genome Ref8 v2 Expression Bead Chip‘ hybridisiert und mit Cy3 nach den Angaben des Herstellers gefärbt (Illumina, Santa Clara, Kalifornien, USA). Der Array wurde mit dem ‚iScan Microarray Scanner‘ (Illumina, Santa Clara, Kalifornien, USA) ausgelesen. Die Daten wurden unter Verwendung der Illumina-GenomeStudio-Software (Illumina, Santa Clara, Kalifornien, USA) von PD Dr. Knut Krohn bearbeitet und mit bzw. ohne Hintergrundkorrektur sowie mit bzw. ohne Quantil-Normalisierung exportiert. Zur Auswertung des Microarray wurden die Daten nach Quantil-Normalisierung und ohne Hintergrundkorrektur verwendet.

#### 2.4.15. Analyse der Translation *in vitro*

Um die Translation *in vitro* zu untersuchen, wurden die Plasmide pGEM-CAT-poly(A), pEMC2.1-CAT und pGEM-HCV-IRES-CAT (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ostareck-Lederer, RWTH Aachen) verwendet, welche für die CAT-Sequenz (CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase) kodieren. Außerdem wurde ein CrPV-Luc-SREmin-pA-N40 Plasmid (zur Verfügung gestellt von B. Moritz, Martin-Luther-Universität Halle) eingesetzt, welches für die Luciferase-Sequenz (Luc) und ein mutiertes *smaug recognition element* (SRE) kodiert.

Um die Plasmide *in vitro* zu transkribieren, wurden diese zunächst mit den Restriktionsendonukleasen HindIII (pGEM-CAT-poly(A), pGEM-HCV-IRES-CAT, CrPV-Luc-SREmin-pA-N40) bzw. PstI (pEMC2.1-CAT) linearisiert. Die linearisierte cDNA wurde anschließend unter Verwendung des ‚MEGAscript T7 Kit‘ der Firma Ambion (Austin, Texas, USA) nach Herstellerangaben transkribiert, wobei für die Transkription des CrPV-Plasmids die T3-RNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon Rot) verwendet wurde. Die RNA wurde anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Qualität sowie die erfolgreiche Transkription wurden durch das Auftragen der RNA auf ein Agarosegel überprüft.

Die Translation der RNA *in vitro* erfolgte unter Verwendung eines mit Mikrokokken-Nuklease behandelten Kaninchen-Retikulozyten-Lysats (Promega, Mannheim). 2  $\mu\text{l}$  Plakophilin-3 (in entsprechender Konzentration) wurden zusammen mit 9  $\mu\text{l}$  Master-Mix für 5 min bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde 1  $\mu\text{l}$  der entsprechenden RNA zugesetzt und der Ansatz für 90 min bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Inaktivierung der Translation erfolgte durch die Zugabe von 12  $\mu\text{l}$  RNase-STOP für 15 min bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden die Proben mit 8  $\mu\text{l}$  4x SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekocht. 20  $\mu\text{l}$  Probe wurden in einem 12,5 %igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend fixiert und getrocknet. Die Analyse der *in vitro* translatierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### Master-Mix

8,75  $\mu\text{l}$  Kaninchen-Retikulozyten-Lysat  
5  $\mu\text{l}$  Kit-Aminosäure-Mix ohne Methionin  
5  $\mu\text{l}$  EasyTag™ L- $^{35}\text{S}$ -Methionin

##### RNase-STOP

50  $\mu\text{g/ml}$  RNase A  
10 mM EDTA; pH 7,9

#### 2.4.16. Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders vermerkt, Quantifizierungen anhand von mindestens drei unabhängigen Experimente durchgeführt. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken in den Diagrammen dargestellt. Der zweiseitige heteroskedastische Student's t-Test wurde zur Bestimmung der Signifikanz zwischen zwei Populationen genutzt (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,0005$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Funktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in der Regulation der Translation

Plakophilin 1 und Plakophilin 3 (PKP1 und PKP3) wurden als Bestandteile des desmosomalen Plaques identifiziert und umfassend charakterisiert (Übersicht in HATZFELD M. 2007). Neben der Lokalisation in Desmosomen konnte für beide Proteine jedoch auch eine zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden (BONNE S. *et al.* 2003; HOFMANN I. *et al.* 2006; WOLF A. *et al.* 2010). Erste Hinweise über eine mögliche Funktion der Plakophiline im Zytoplasma lieferten Hofmann und Kollegen. Sie konnten Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in sogenannten *stress granules*, zytoplasmatischen Aggregaten von inaktiven Translationsinitiationskomplexen, nachweisen (HOFMANN I. *et al.* 2006). Außerdem zeigten sie, dass Plakophilin 3 mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (zum Beispiel FXR1 und PABP) assoziieren kann. Unsere Arbeitsgruppe identifizierte den eukaryontischen Initiationsfaktor 4A1 (eIF4A1) als Interaktionspartner für Plakophilin 1 und konnte zudem einen stimulierenden Einfluss von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 auf die *cap*-abhängige Translation belegen (WOLF A. *et al.* 2010).

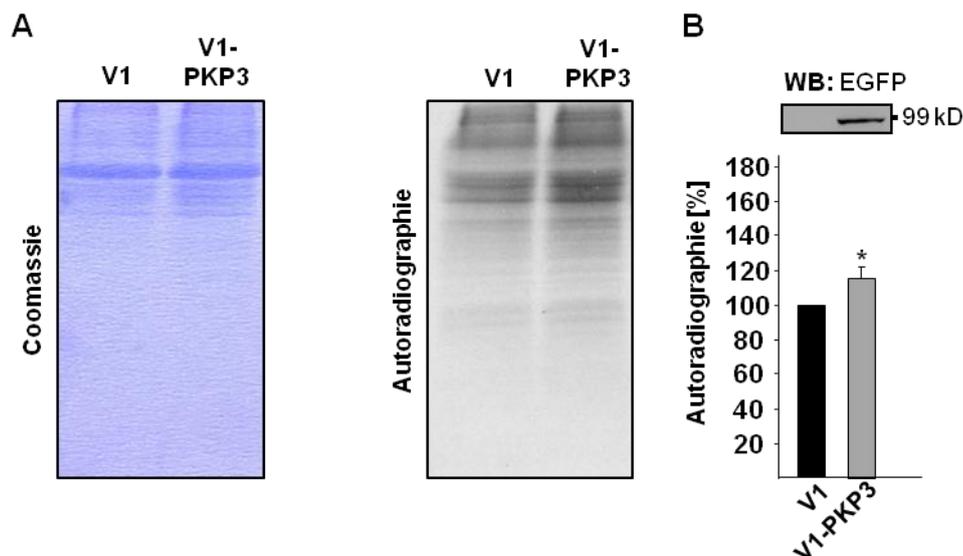
Die vorhandenen Daten deuteten darauf hin, dass neben Plakophilin 1 auch Plakophilin 3 eine Funktion in der Regulation der Translation erfüllt. Welcher Mechanismus dieser Regulation jedoch zu Grunde liegt und ob beide Plakophiline mit weiteren Initiationsfaktoren assoziieren können, blieb bislang allerdings ungeklärt.

##### 3.1.1. Plakophilin 3 stimuliert die globale Proteinsynthese

Da bereits gezeigt werden konnte, dass der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 die globale Proteinsynthese reduziert (A. Wolf, persönliche Korrespondenz), wurde im Folgenden der Einfluss der Plakophilin-3-Überexpression auf die globale Proteinsynthese untersucht. Damit sollte geprüft werden, ob die Überexpression von Plakophilin 3 den zum *knockdown* qualitativ umgekehrten Effekt in der Zelle hervorruft.

Plakophilin 3 wurde dafür als Fusionsprotein mit dem Venus1-Protein in HEK-293-Zellen überexprimiert. Als Kontrolle diente die Expression des Venus1-Proteins. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für 15 min in methioninfreiem Medium inkubiert und anschließend für 1 h mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Die Detektion neu synthetisierter Proteine erfolgte mittels Autoradiographie (siehe Abb. 5 A). Die Überexpression von Plakophilin 3 wurde durch einen Western Blot überprüft (siehe Abb. 5 B).

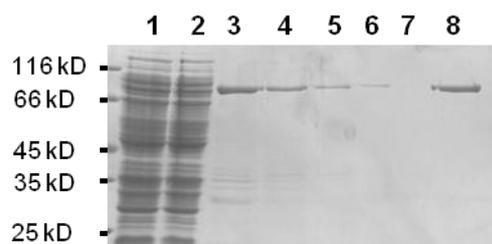
Wie die Quantifizierung in Abb. 5 B zeigt, führt die Überexpression von Plakophilin 3 zu einer Erhöhung der globalen Proteinsynthese um ca. 14 % im Vergleich zur Kontrolle. Damit konnte zumindest qualitativ ein zum *knockdown* von Plakophilin 3 gegenteiliger Effekt in der Zelle hervorgerufen werden.



**Abb. 5 Die Überexpression von Plakophilin 3 stimuliert die globale Proteinsynthese.** (A) HEK-293-Zellen wurden mit pVenus1-FLAG-Plakophilin-3 (V1-PKP3) bzw. pVenus1-FLAG (V1) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 15 min mit methioninfreiem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte für 1 h die metabolische Markierung mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin. Die Zellen wurden dann in SDS-Puffer lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der neu synthetisierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie. (B) Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Coomassie-Färbung). Die Kontrolle (V1) wurde auf 100 % gesetzt. Die Überexpression von Venus1-Plakophilin-3 wurde mittels Western Blot überprüft. Dabei wurde Venus1-Plakophilin-3 mit einem Anti-EGFP-Antikörper detektiert, welcher spezifisch Venus1 nachweisen kann. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*,  $p \geq 0,05$ .

### 3.1.2. Der Einfluss von Plakophilin 3 auf die Translation *in vitro*

In der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien zeigten, dass neben Plakophilin 1 auch Plakophilin 3 die *cap*-abhängige Translation stimulieren kann (WOLF A. *et al.* 2010). Um nun zu prüfen, ob Plakophilin 3 auch einen Einfluss auf die *cap*-unabhängige Translation hat und um zu testen, welche Initiationsfaktoren Plakophilin 3 für die Stimulation der Translation benötigt, wurden anschließend Translationsstudien *in vitro* durchgeführt. Dafür wurde zunächst rekombinantes Plakophilin 3 als Fusionsprotein mit einem His<sub>6</sub>-tag aus *E.-coli*-Zellen nativ gereinigt (siehe 2.4.8). Die erfolgreiche Reinigung wurde mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 6).

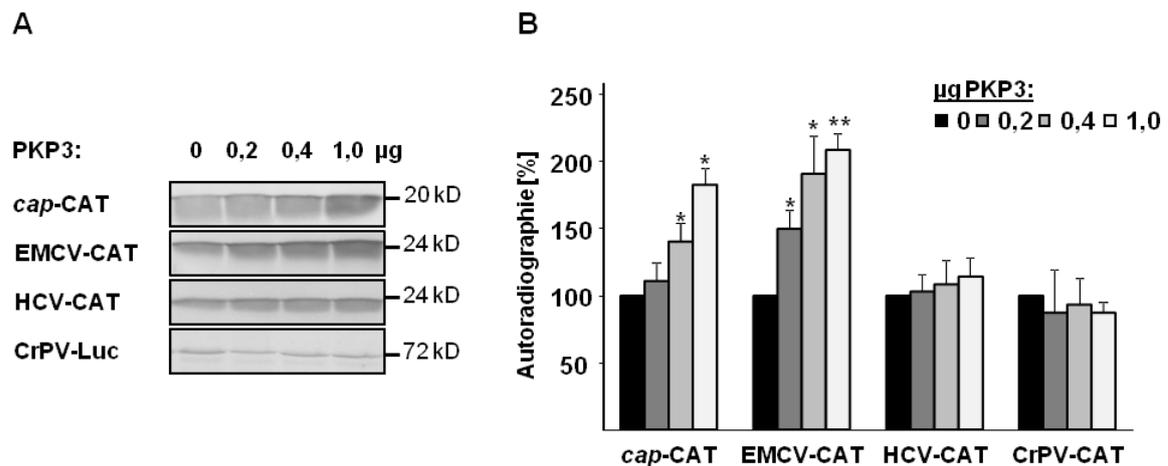


**Abb. 6 Reinigung von Plakophilin 3.** Plakophilin 3 wurde als Fusionsprotein mit einem His<sub>6</sub>-tag im *E.-coli*-Stamm BL21-CodonPlus® (DE3) RIL exprimiert und anschließend mittels Ni-NTA und Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Die SDS-PAGE zeigt die folgenden Fraktionen: (1) Lysat, (2) Durchfluss der Ni-NTA-Säule, (3-5) Elutionsfraktion der Ni-NTA-Säule, (6) verdünntes Plakophilin 3 vor der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC), (7) Durchfluss der IEC, (8) gereinigtes Plakophilin 3 nach IEC.

Um zunächst den Effekt von Plakophilin 3 auf die *cap*-abhängige Translation *in vitro* zu validieren, wurde *cap*-CAT-poly(A)-mRNA in Retikulozytenlysaten in Gegenwart unterschiedlicher Mengen von gereinigtem Plakophilin 3 und L-[<sup>35</sup>S]-Methionin translatiert. Zur Kontrolle wurde Puffer anstatt Plakophilin 3 verwendet. Das gebildete Produkt wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Wie das Autoradiogramm und die Quantifizierung in Abb. 7 zeigen, konnte mit steigender Konzentration an Plakophilin 3 eine Stimulation der *cap*-abhängigen Translation *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen damit die vorangegangenen Translationsstudien mit einem Luciferase-Reportersystem (WOLF A. *et al.* 2010) und zeigen darüber hinaus, dass Plakophilin 3 die *cap*-abhängige Translation konzentrationsabhängig stimulieren kann.

Um zu prüfen ob Plakophilin 3 auch die *cap*-unabhängige Translation regulieren kann, wurde anschließend die Translation verschiedener viraler mRNAs untersucht, da diese die Translation *cap*-unabhängig, über bestimmte IRES-Strukturen vermitteln. Zunächst wurde die IRES des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) verwendet, da diese alle Initiationsfaktoren außer eIF4E für die Translation benötigt (PESTOVA T. V. *et al.* 1996a; PESTOVA T. V. *et al.* 1996b). Die EMCV-CAT-mRNA wurde ebenso wie die *cap*-CAT-poly(A)-mRNA in Retikulozytenlysaten in Gegenwart unterschiedlicher Plakophilin-3-Mengen und L-[<sup>35</sup>S]-Methionin translatiert. Es zeigte sich, dass auch die EMCV-IRES-abhängige Translation mit zunehmender Konzentration an Plakophilin 3 stimuliert wird (siehe Abb. 7).

Zudem stellte sich die Frage, ob und welche Initiationsfaktoren absolut essentiell sind, damit Plakophilin 3 die Translation stimulieren kann. Um dies zu untersuchen wurde zum einen die Hepatitis-C-Virus-IRES (HCV-IRES), welche in Abhängigkeit von eIF3, der 40S-Untereinheit des Ribosoms und der Met-tRNA<sup>Met</sup>-eIF2-GTP translatiert wird (PESTOVA T. V. *et al.* 1998) und zum anderen die Cricket-Paralysis-Virus-IRES (CrPV-IRES), welche keine Initiationsfaktoren für die Translation benötigt (JAN E. und SARNOW P. 2002), verwendet. Die entsprechende RNA (HCV-CAT-mRNA bzw. CrPV-Luc-SREmin-pA-N40-mRNA) wurde erneut in Gegenwart unterschiedlicher Plakophilin-3-Mengen und L-[<sup>35</sup>S]-Methionin in Retikulozytenlysaten translatiert. Wie Abb. 7 zeigt, konnte mit zunehmender Konzentration an Plakophilin 3 keine statistisch signifikante Stimulation der HCV- und CrPV-IRES-abhängigen Translation detektiert werden. Damit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass Plakophilin 3 sowohl die *cap*-abhängige, als auch die *cap*-unabhängige, EMCV-IRES-vermittelte Translation konzentrationsabhängig stimulieren kann, jedoch keinen Einfluss auf die Translation der HCV- und CrPV-IRES hat. Die Daten deuten somit darauf hin, dass Plakophilin 3 eIF4A1, eIF4B und/oder eIF4G benötigt, um die Translation zu initiieren.



**Abb. 7 Plakophilin 3 stimuliert die *cap*- und die EMCV-abhängige Translation *in vitro*.** *cap*-CAT-poly(A)-mRNA (*cap*-CAT), EMCV-CAT-mRNA (EMCV-CAT), HCV-CAT-mRNA (HCV-CAT) und CrPV-Luc-SREmin-pA-N40-mRNA (CrPV-Luc) wurden *in vitro* in Kaninchen-Retikulozytenlysat mit steigender Menge an gereinigtem rekombinantem Plakophilin 3 für 1,5 h bei 30 °C translatiert. Zur Kontrolle wurde Puffer anstatt Plakophilin 3 verwendet. **(A)** Die verschiedenen Proben wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. **(B)** Die Quantifizierung der Autoradiogramme zeigt, dass Plakophilin 3 sowohl die *cap*- als auch die EMCV-abhängige Translation *in vitro*, jedoch nicht die HCV- und CrPV-IRES-abhängige Translation, stimuliert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. \*,  $p \geq 0,05$ ; \*\*,  $p \geq 0,005$ .

### 3.1.3. Plakophilin 3 beeinflusst die Proliferation und die Zellgröße

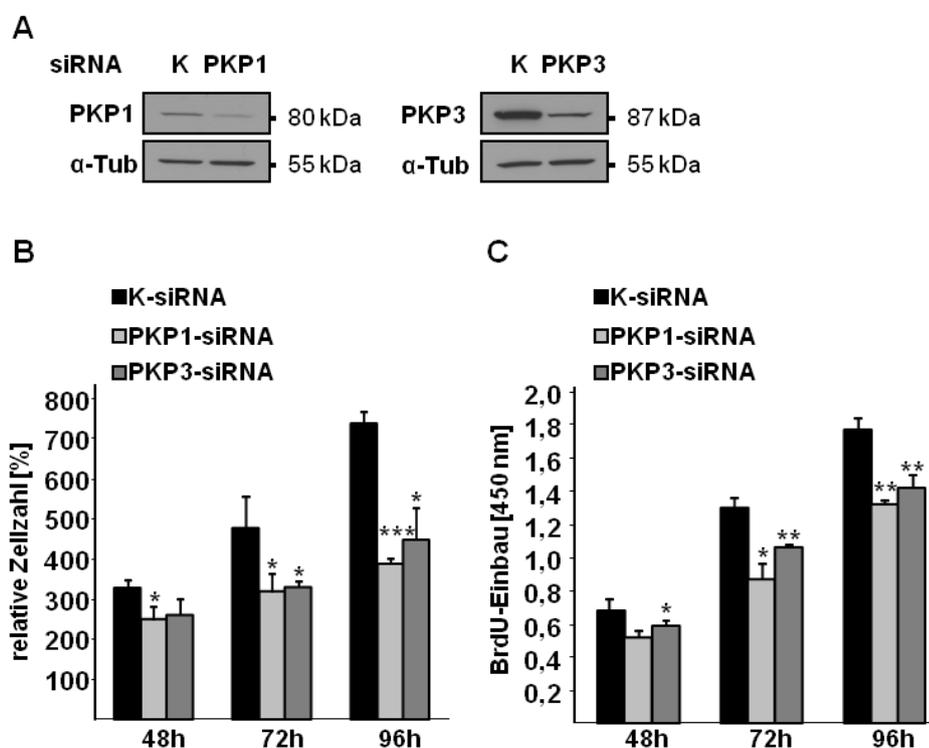
Da die Regulation der Translation an das Zellwachstum und die Zellgröße gekoppelt ist (FINGAR D. C. *et al.* 2002; MA X. M. und BLENIS J. 2009) kann eine veränderte Translationsrate das Wachstum von Zellen beeinflussen und damit zum Beispiel zur Tumorentstehung beitragen (Übersicht in DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004).

Da die vorangegangenen Ergebnisse und die Daten aus der Literatur (WOLF A. *et al.* 2010) belegen, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 die Translation stimulieren können und da für Plakophilin 1 bereits ein Effekt auf die Zellproliferation beschrieben wurde (WOLF A. *et al.* 2010), sollte im Nachfolgenden untersucht werden, ob auch Plakophilin 3 einen Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellgröße hat.

Um einen möglichen Einfluss von Plakophilin 3 auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen mit Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellzahl wurde 24, 48, 72 und 96 h nach der Transfektion mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wurde auf den jeweiligen 24-h-Wert normalisiert, um Unterschiede beim Plattieren der Zellen auszuschließen. Um den Einfluss von Plakophilin 3 auf die Zellzahl mit dem von Plakophilin 1 vergleichen zu können, wurden die Zellen zudem mit Plakophilin-1-siRNA transfiziert. Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft (siehe Abb. 8 A). Die Quantifizierung der Zellzahl (siehe Abb. 8 B) zeigte, dass bereits 48 h nach Transfektion der Plakophilin-3-siRNA ein verringertes Zellwachstum (circa 80 %) im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen detektiert werden konnte. Dieser Effekt verstärkte sich 72 h (circa 70 %) und 96 h (circa 60 %) nach der Transfektion.

Die Daten zeigen außerdem, dass der Einfluss von Plakophilin 3 auf die Zellzahl vergleichbar mit dem von Plakophilin 1 ist (siehe Abb. 8 B).

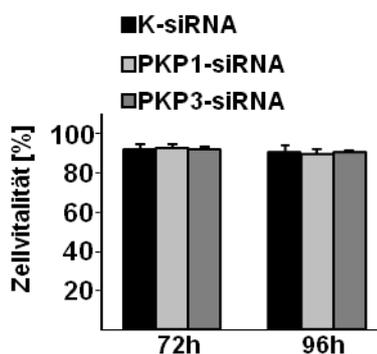
Die Reduktion der Zellzahl könnte zum einen in Korrelation mit einer verminderten Proliferationsrate und zum anderen mit einer erhöhten Apoptoserate stehen. Um dies zu überprüfen, wurde in den Zellen der Einbau des Thymidinanalogs 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) gemessen. BrdU wird nur von lebenden Zellen während der S-Phase in die DNA eingebaut (PORSTMANN T. *et al.* 1985), wodurch apoptotische Zellen nicht mit erfasst werden. Die Menge an eingebauten BrdU wurde kolorimetrisch quantifiziert. Auch in diesem Fall wurde zur Normalisierung der entsprechende 24-h-Wert verwendet. Wie in Abb. 8 C zu erkennen ist, konnte sowohl nach *knockdown* von Plakophilin 1 als auch nach *knockdown* von Plakophilin 3 eine verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen beobachtet werden.



**Abb. 8 Reduktion der Zellzahl und der Proliferation nach *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3.** HaCaT-Zellen wurden mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. **(A)** Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft. Die Zellzahl **(B)** und die Proliferationsrate **(C)** wurden nach 24, 48, 72 und 96 h bestimmt. Um Unterschiede beim Aussäen der Zellen auszugleichen wurden die Messwerte auf den 24-h-Wert normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. \*,  $p \geq 0,05$ ; \*\*,  $p \geq 0,005$ ; \*\*\*,  $p \geq 0,0005$ .

Um zu untersuchen, ob die Vitalität der Zellen, der Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl, und somit die Apoptoserate, durch den *knockdown* von Plakophilin 1 oder Plakophilin 3 beeinflusst wird, wurde die Zellvitalität 72 h und 96 h nach der Transfektion mit der jeweiligen siRNA mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.9).

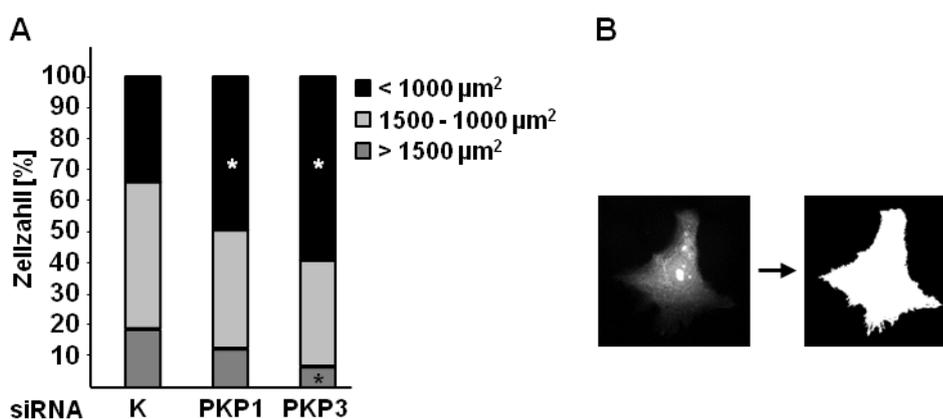
Wie in Abb. 9 zu erkennen ist, führte der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Zellvitalität.



**Abb. 9 Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität.** HaCaT-Zellen wurden mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h und 96 h nach der Transfektion wurde der Anteil lebender und toter adhärenter Zellen, sowie der Anteil toter Zellen im Kulturüberstand mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Anschließend wurde die Zellvitalität, der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl, bestimmt. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 keinen Einfluss auf die Zellvitalität hatte, sondern dass das verminderte Zellwachstum aus einer verringerten Proliferationsrate der Zellen resultiert.

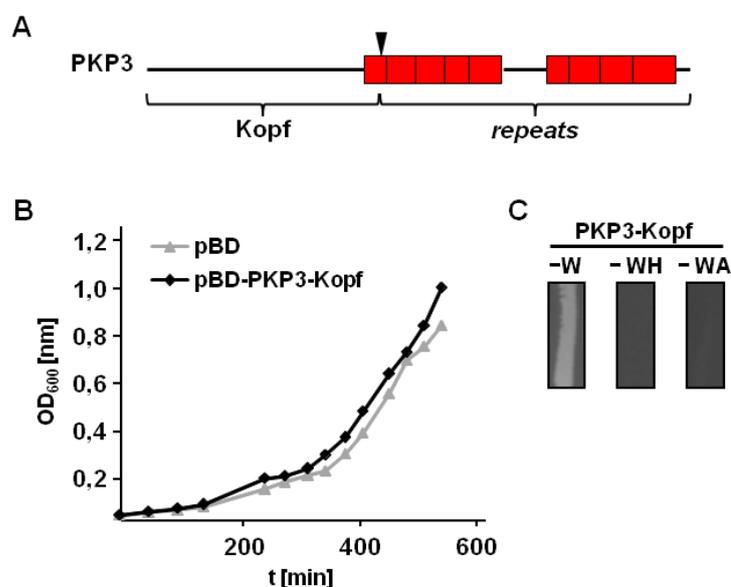
Um zu untersuchen, ob Plakophilin 1 und Plakophilin 3 auch einen Einfluss auf die Zellgröße haben, wurden HaCaT-Zellen mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA und pEGFP transfiziert und 72 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert. Die Zellgröße wurde anhand des GFP-Fluoreszenzsignals mikroskopisch und unter Verwendung der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss, Jena) bestimmt (siehe Abb. 10 B). Zur Quantifizierung wurde die Zellgröße von durchschnittlich 100 transfizierten Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass nach *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, der Anteil kleiner Zellen ( $<1000 \mu\text{m}^2$ ) zunahm und der Anteil großer Zellen ( $>1500 \mu\text{m}^2$ ) abnahm (siehe Abb. 10 A). Die Daten zeigen somit, dass beide Plakophiline einen Einfluss auf die Zellgröße haben.



**Abb. 10 Plakophilin 1 und Plakophilin 3 haben einen Einfluss auf die Zellgröße.** (A) HaCaT-Zellen wurden mit pEGFP und Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde die Zellgröße anhand des GFP-Fluoreszenzsignals unter Verwendung der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss, Jena) bestimmt. Die Zellen wurden nach der Größe in drei Gruppen eingeteilt und der relative Anteil an der Gesamtzellzahl bestimmt. Zur Quantifizierung wurde aus drei unabhängigen Experimenten die Zellgröße von mindestens 100 Zellen pro Experiment bestimmt. \*,  $p \geq 0,05$ . (B) Beispielhafte Darstellung zur Bestimmung der Zellgröße anhand der Fläche der GFP-Fluoreszenz.

### 3.2. Identifizierung neuer Plakophilin-3-Interaktionspartner

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 zeigen, dass neben Plakophilin 1 auch Plakophilin 3 die Translation und die Proliferation beeinflussen kann. Da für Plakophilin 1 bereits eIF4A1 als Interaktionspartner identifiziert wurde (WOLF A. *et al.* 2010), stellte sich die Frage, mit welchen Translationsinitiationsfaktoren Plakophilin 3 wechselwirken kann. Da durch Interaktionsanalysen in Hefe bereits zwei Untereinheiten des eIF3-Komplexes (eIF3c und eIF3f) als putative Interaktionspartner für Plakophilin 1 und Plakophilin 3 identifiziert worden waren (M. Hatzfeld, persönliche Korrespondenz), sollte nachfolgend ein Hefe-Dihybrid-Screening mit der Plakophilin-3-Kopfdomäne (Abb. 11 A) angefertigt werden, um weitere mögliche Kandidaten zu identifizieren. Das Screening wurde mit der N-terminalen Kopfdomäne von Plakophilin 3 angefertigt, da eine Vielzahl bereits bekannter Interaktionen, zum Beispiel die Interaktion mit Desmoglein 1 oder Desmoplakin (BONNE S. *et al.* 2003), aber auch die Interaktion mit eIF3, über diese Domäne vermittelt werden.



**Abb. 11 Die Plakophilin-3-Kopfdomäne ist nicht toxisch und zeigt keine Autoaktivierung.** (A) Schematische Abbildung der verwendeten Plakophilin-3-Fragmente. (B, C) Der Hefestamm AH109 wurde mit dem Leervektor (pBD) bzw. mit pBD-PKP3-Kopf transformiert. (B) Um zu prüfen, ob das pBD-PKP3-Kopf-Konstrukt schädlich für die Hefen ist, wurde das Wachstumsverhalten der transformierten Hefezellen verglichen. (C) Um zu prüfen, ob das PKP3-Kopf-Konstrukte autoaktivierend ist, wurden die damit transformierten Hefen auf Selektionsplatten ohne Tryptophan (-W) und auf Reporterplatten ohne Tryptophan und Histidin (-WH) bzw. ohne Tryptophan und Adenin (-WA) selektiert.

Für das Hefe-Dihybrid-Screening wurde die Plakophilin-3-Kopfdomäne als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne generiert (pBD-PKP3-Kopf). Eine mögliche Toxizität des Konstrukts, sowie eine mögliche Autoaktivierung der Reportergene *his3* und *ade2* wurden im Hefestamm AH109 überprüft. Wie in Abb. 11 B zu erkennen ist, zeigt der Hefestamm AH109, welcher mit dem pBD-Plakophilin-3-Kopf-Plasmid transformiert wurde, das gleiche Wachstumsverhalten wie der Hefestamm der mit dem Leervektor (pBD)

transformiert wurde. Dies zeigt, dass sich das pBD-Plakophilin-3-Kopf-Plasmid nicht negativ auf das Wachstum der Hefen auswirkt. Für den Test auf Autoaktivierung (siehe Abb. 11 C) wurden Hefen, welche das Plakophilin-3-Kopf-Konstrukt exprimieren, auf Selektionsplatten ohne Tryptophan (-W) bzw. auf Reporterplatten (-WH; -WA) selektiert. Da auf den Reporterplatten kein Wachstum der transformierten Hefen zu erkennen ist, kann eine mögliche Autoaktivierung ausgeschlossen werden.

Zur Identifizierung putativer Plakophilin-3-Interaktionspartner wurde ein Screening mit einer normalisierten humanen cDNA-Bibliothek durchgeführt. Die „Beute“-Konstrukte der cDNA-Bibliothek wurden als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne im Hefestamm Y187 exprimiert. Das bereits genannte Plakophilin-3-Kopf-„Köder“-Konstrukt wurde im Hefestamm AH109 exprimiert. Anschließend erfolgte für 24 h ein *mating* der beiden Hefestämme. Die diploiden Hefen wurden zur Selektion von Protein-Protein-Interaktionen auf Agar ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin (-WLAH) ausplattiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA der „Beute“-Konstrukte isoliert und durch Sequenzierung analysiert (siehe Abschnitt 2.4.12). Neben eine Vielzahl an Proteinen, die u. a. eine Funktion in der mRNA-Prozessierung und Transkription erfüllen, wurde der bereits bekannte Translationsinitiationsfaktor eIF3f sowie der Translationsinitiationsfaktor eIF4A1 als putativer Interaktionspartner für Plakophilin 3 identifiziert. Dieser Befund war überraschend, da in vorangegangenen Hefe-Dihybrid-Studien in der Arbeitsgruppe keine Interaktion zwischen Plakophilin 3 und eIF4A1 nachgewiesen werden konnte.

### **3.3. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 sind Bestandteil des Translationsinitiationskomplexes**

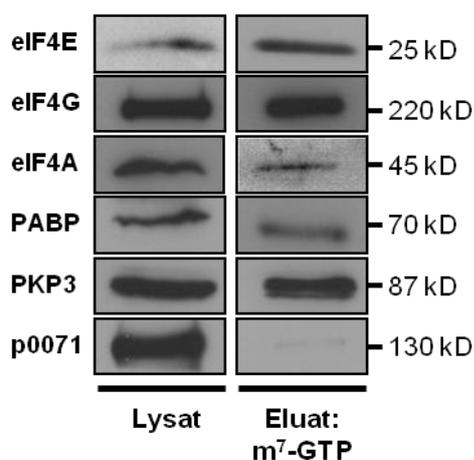
Die Daten aus Abschnitt 3.1 und 3.2 zeigen, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 einen Einfluss auf die Regulation der Translation haben, und dass sie mit Proteinen der Translationsmaschinerie in der Hefe assoziieren können. Für Plakophilin 1 konnte bereits eine Assoziation mit dem *cap*-mRNA-Bindekomplex und dem eukaryontischen Initiationsfaktor 4A1 (eIF4A1) nachgewiesen werden (WOLF A. et al. 2010), ob jedoch auch Plakophilin 3 zu diesem Komplex gehört war bisher unbekannt. Der *cap*-mRNA-Bindekomplex, als Bestandteil des Translationsinitiationskomplexes, enthält neben eIF4A1 und eIF4B, das *cap*-Bindeprotein eIF4E, das Gerüstprotein eIF4G sowie das Poly(A)-Bindeprotein PABP (JACKSON R. J. et al. 2010).

#### **3.3.1. Plakophilin 3 kann mit 7-Methyl-GTP-Sepharose präzipitiert werden**

Um zu untersuchen, ob auch Plakophilin 3 eine Komponente des *cap*-mRNA-Bindekomplexes darstellt, wurde im Folgenden eine Präzipitation mit 7-Methyl-GTP-Sepharose durchgeführt, welche eine Affinitätsreinigung von *cap*-mRNA-Bindeproteinen ermöglicht. Dafür wurde HaCaT-Zelllysat 2 h mit 7-Methyl-GTP-Sepharose inkubiert.

Anschließend erfolgte eine spezifische Elution der gebundenen Proteine mit 7-Methyl-GTP für 1 h auf Eis. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, konnte Plakophilin 3 spezifisch mit Komponenten des *cap*-mRNA-Bindekomplexes (eIF4E, eIF4G, eIF4A und PABP) eluiert werden. Um die Spezifität dieser Assoziation besser beurteilen zu können, wurde auch das Vorhandensein von p0071, eines verwandten Armadillo-*repeat*-Proteins, im Komplex überprüft. p0071 ist nach den bisherigen Erkenntnissen nicht an der Regulation der Translation, sondern an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (KEIL R. *et al.* 2007; WOLF A. *et al.* 2006). Es zeigte sich, dass p0071 im Zelllysat sehr gut, im Eluat jedoch kaum detektiert werden konnte.



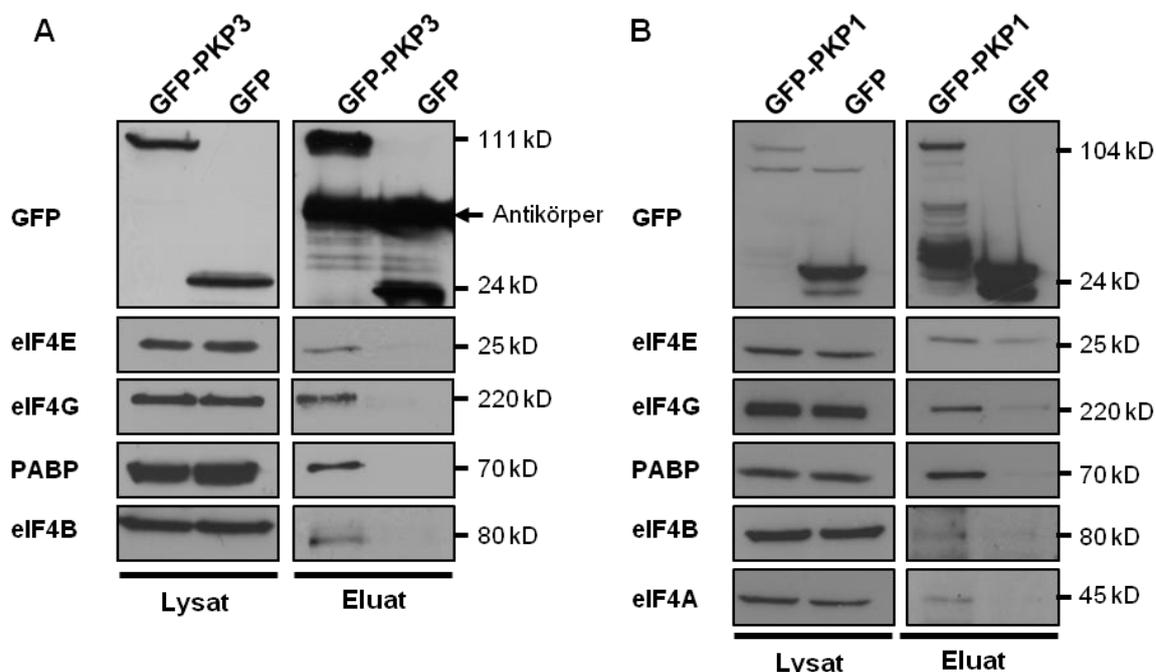
**Abb. 12 Plakophilin 3 kann mit 7-Methyl-GTP-Sepharose präzipitiert werden.** HaCaT-Zelllysat wurde 2 h mit 7-Methyl-GTP-Sepharose inkubiert. Anschließend erfolgte die spezifische Elution der gebundenen Proteine durch die Zugabe von 7-Methyl-GTP für 1 h auf Eis. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Es zeigte sich, dass Plakophilin 3 zusammen mit eIF4E, eIF4G, eIF4A und PABP präzipitiert werden konnte. p0071 hingegen, ein verwandtes Armadillo-*repeat*-Protein, konnte im Eluat kaum nachgewiesen werden.

Diese Daten zeigen somit, dass neben Plakophilin 1 auch Plakophilin 3 eine Komponente des *cap*-mRNA-Bindekomplexes darstellt.

### 3.3.2. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 präzipitieren mit Komponenten des *cap*-mRNA-Bindekomplexes

Um die Spezifität der Assoziation von Plakophilin 3, aber auch von Plakophilin 1, mit den verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren in einem unabhängigen System zu prüfen, wurden anschließend Präzipitationsexperimente durchgeführt. Dafür wurden beide Plakophiline als Fusionsproteine mit EGFP in HEK-293-Zellen exprimiert. Die Transfektion der Zellen mit pEGFP diente als Kontrolle. Die Zellen wurden 24 h (PKP3) bzw. 48 h (PKP1) nach der Transfektion mit nicht-denaturierendem Puffer (siehe 2.4.1) lysiert und eine GFP-Präzipitation unter Verwendung von EGFP-Antikörpern und Protein-A-Agarose (für PKP3) bzw. GFP-Trap<sup>®</sup>\_A (für PKP1) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.9). Die gebundenen Proteine wurden mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot

analysiert. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, konnten eIF4E, eIF4G, PABP und eIF4B zusammen mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3, jedoch nicht mit GFP, kopräzipitiert werden. Zudem konnte eine Assoziation zwischen Plakophilin 1 und eIF4A gezeigt werden. Die Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A konnte in diesem Fall nicht untersucht werden, da die schwere Kette des Anti-EGFP-Antikörpers im Überschuss vorlag und auf der gleichen Höhe wie eIF4A im SDS-Gel lief, so dass die Detektion von eIF4A nicht möglich war.



**Abb. 13 Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit Komponenten des *cap*-mRNA-Bindekomplexes.** HEK-293-Zellen wurden mit pEGFP-Plakophilin-1, pEGFP-Plakophilin-3 bzw. pEGFP transfiziert. Die Zellen wurden 24 h (PKP3) bzw. 48 h (PKP1) nach der Transfektion mit nicht-denaturierendem Puffer lysiert und anschließend wurde eine GFP-Präzipitation entweder mit Anti-EGFP-Antikörpern und Protein-A-Agarose (PKP3, **A**) oder mit GFP-Trap<sup>®</sup>\_A (PKP1, **B**) durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Präzipitation von EGFP diente dazu, eine unspezifische Bindung der Initiationsfaktoren an das EGFP bzw. an die Agarose zu prüfen.

Die Ergebnisse komplettieren somit die Präzipitationsstudien mit 7-Methyl-GTP-Sepharose (siehe Abschnitt 3.3.1) und zeigen, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 einen Komplex mit verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren *in vitro* bilden können.

Um neben den Präzipitationsstudien detailliertere Informationen über den Aufbau dieses Komplexes in Gegenwart von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 sowie über mögliche Bindungspartner der Plakophiline in diesem Komplex zu erhalten, wurde nachfolgend die Interaktion zu den einzelnen Initiationsfaktoren (eIF4E, eIF4G, eIF4A1, eIF4B, PABP und eIF3c) im Detail untersucht.

Dazu wurden das Hefe-Dihybrid-System, der GST-*pull*down sowie die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) und der *Proximity-Ligation-Assay* (PLA) genutzt.

### 3.3.3. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit eIF4E

eIF4E stellt eines der wichtigsten Proteine des Translationsinitiationskomplexes dar. Es bindet direkt an die 5'-*cap*-Struktur der mRNA und ermöglicht damit die Bindung von eIF4G und eIF4A1, wodurch ein aktiver eIF4F-Komplex gebildet werden kann (GRIFO J. A. *et al.* 1983). Obwohl eIF4E die globale Proteinsynthese reguliert, kann es auch selektiv die Translation von mRNAs begünstigen, welche u. a. eine Funktion in der Proliferation und im Überleben von Zellen haben, und damit zur Tumorentstehung beitragen (DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004; MAMANE Y. *et al.* 2007).

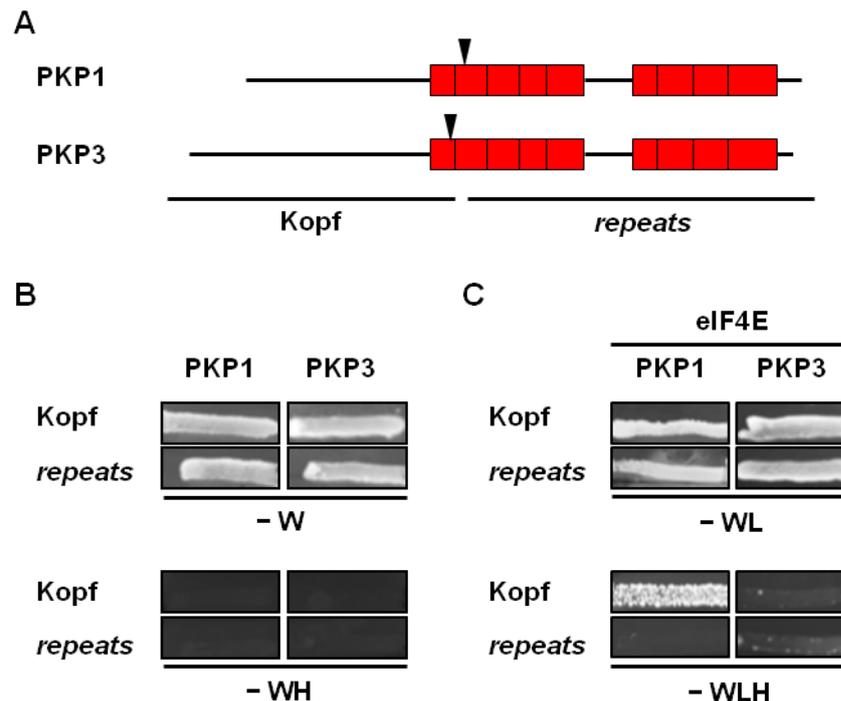
Da sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 die *cap*-abhängige Translation konzentrationsabhängig stimulieren können (siehe Abschnitt 3.1.2 und WOLF A. *et al.* 2010) und da beide Proteine, wie unter Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 gezeigt, mit eIF4E kopräzipitieren, wurde im folgenden die Assoziation mit eIF4E untersucht.

#### 3.3.3.1. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E mittels Hefe-Dihybrid-System

Um eine mögliche Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E zu prüfen wurden zunächst Hefe-Dihybrid-Analysen angefertigt. Dafür wurde zunächst das N-terminale Kopf- und das C-terminale *repeat*-Fragment von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 (siehe Abb. 14 A) als Fusionsprotein mit der GAL4-Bindedomäne (pBD-PKP1/3-Kopf/*repeats*) generiert und auf Autoaktivität getestet. Wie in Abb. 14 B zu erkennen ist, konnte kein Wachstum der transformierten Hefen auf -WH-Agar beobachtet werden, wodurch eine mögliche Autoaktivierung der verwendeten Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Konstrukte ausgeschlossen werden kann.

Um nun die Assoziation mit eIF4E zu untersuchen, wurde dieses als Fusionsplasmid mit der GAL4-Aktivierungsdomäne generiert (pGADT7-eIF4E) und anschließend in Kombination mit den einzelnen Plakophilin-Konstrukten in den Hefestamm YRG2 transformiert. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Agar ohne Tryptophan und Leucin (-WL) und auf Reporterplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (-WLH).

Wie in der Abb. 14 C zu erkennen ist, konnte für die Plakophilin-1-Kopfdomäne zusammen mit eIF4E ein Wachstum der Hefen auf Reporterplatten (-WLH) detektiert werden, was auf eine Assoziation der beiden Proteine schließen lässt. Für die beiden Plakophilin-3-Fragmente, sowie für Plakophilin-1-*repeats* und eIF4E konnte kein Wachstum und somit keine Assoziation unter Verwendung des Hefe-Dihybrid-Systems nachgewiesen werden.

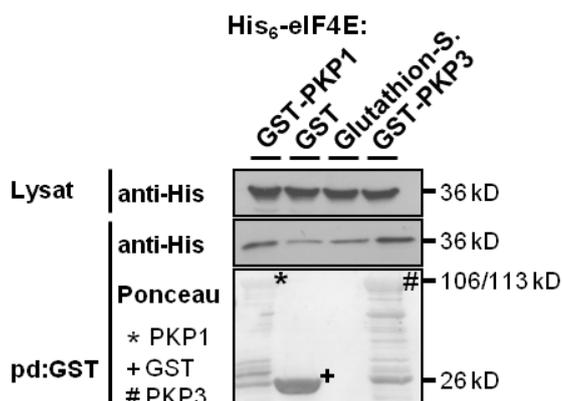


**Abb. 14 Hefe-Dihybrid-Analyse zur Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E.** **(A)** Schematische Darstellung der verwendeten Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Fragmente. **(B)** Der Hefestamm YRG2 wurde mit den angegebenen Plakophilin-Konstrukten (in pBD) transformiert und anschließend auf Agar ohne Tryptophan (-W) und zum Test auf Autoaktivität auf Agar ohne Tryptophan und Histidin (-WH) plattiert. Die einzelnen Plakophilin-Konstrukte zeigten keine Aktivierung des Reportergens *his3*. **(C)** YRG2-Zellen wurden mit den einzelnen Plakophilin-Konstrukten (in pBD) und pGADT7-eIF4E transformiert und anschließend auf Selektionsagar ohne Tryptophan und Leucin (-WL) plattiert. Der Nachweis der Assoziation erfolgte durch Wachstum der Hefen auf Reporterplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (-WLH).

### 3.3.3.2. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E mittels GST-pulldown

Um eine mögliche Assoziation der Plakophiline mit eIF4E in einem unabhängigen System zu untersuchen wurden anschließend GST-*pulldown* Experimente durchgeführt. Hierfür wurden Plakophilin 1 und Plakophilin 3 als GST-Fusionsproteine, ebenso wie GST in *E. coli* exprimiert und dann an Glutathion-Sepharose immobilisiert. eIF4E wurde als Fusionsprotein mit einem His<sub>6</sub>-tag ebenfalls in *E. coli* exprimiert und anschließend 1 h mit GST-Plakophilin bzw. GST, immobilisiert an Sepharose, inkubiert. Um eine unspezifische Bindung von eIF4E an die Sepharose zu prüfen, wurde es außerdem nur mit Glutathion-Sepharose inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Wie in Abb. 15 zu erkennen ist, konnte deutlich mehr eIF4E zusammen mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 präzipitiert werden als mit GST oder Glutathion-Sepharose alleine, was auf eine Assoziation der Proteine *in vitro* schließen lässt. Da eIF4E jedoch auch mit GST und Glutathion-Sepharose präzipitiert werden konnte, kann eine unspezifische Bindung des Proteins nicht vollständig ausgeschlossen werden.



**Abb. 15 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E im GST-pulldown.**

GST-Plakophilin-1, GST-Plakophilin-3 und GST wurden in *E. coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Die Glutathion-Sepharose wurde anschließend mit in *E. coli* exprimiertem His<sub>6</sub>-eIF4E für 1 h inkubiert. eIF4E wurde mittels Anti-His-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Um eine unspezifische Bindung von eIF4E an die Sepharose zu prüfen wurde es außerdem nur mit Glutathion-Sepharose (Glutathion-S.) inkubiert. Zur Kontrolle der eIF4E-Expression wurden 10 % vom Gesamtlisat eingesetzt.

### 3.3.3.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E *in vivo*

Die Präzipitationsexperimente (siehe Abschnitt 3.3.2) sowie die GST-pulldown-Daten (siehe Abschnitt 3.3.3.2) ließen eine Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E *in vitro* vermuten. Um zu untersuchen, ob die Proteine auch *in vivo* in einem Komplex vorliegen, wurden anschließend BiFC-Studien und ein *Proximity Ligation Assay* (PLA) durchgeführt.

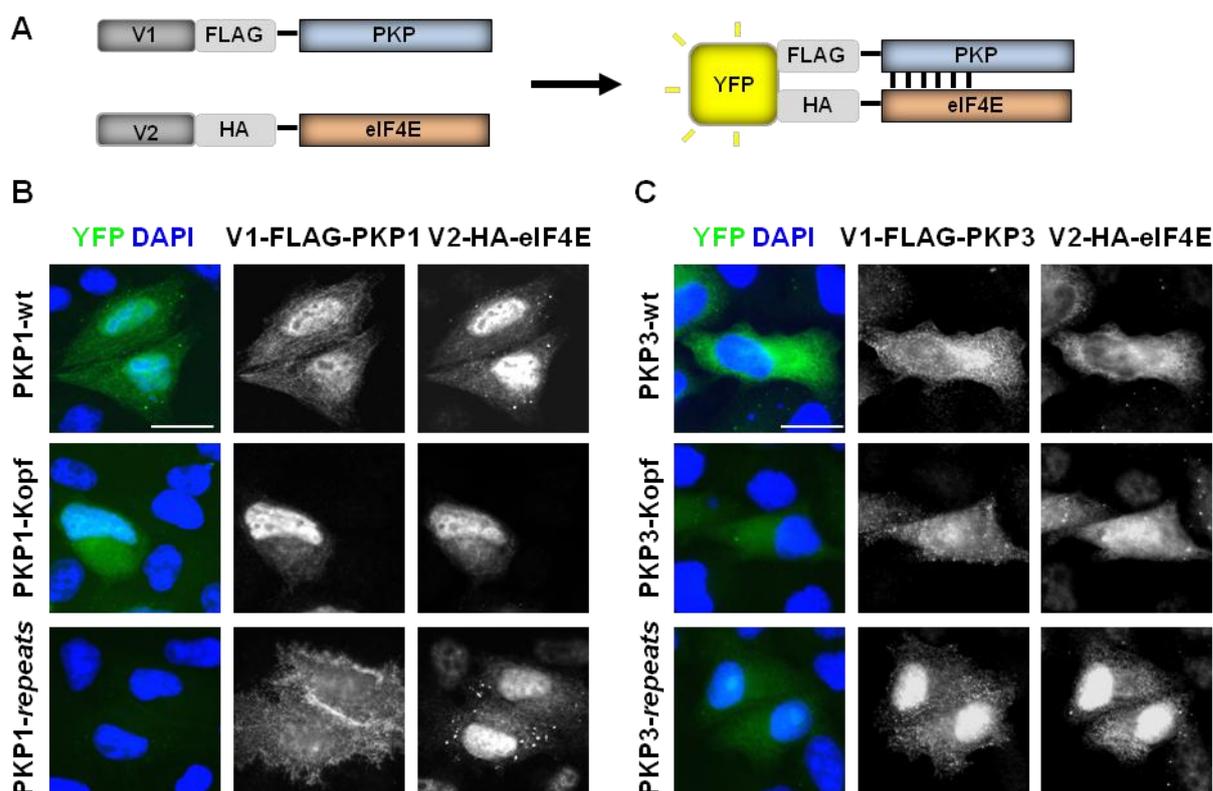
Für die BiFC-Analyse wurden Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Wildtyp (wt) sowie die Kopf- und *repeat*-Fragmente der Proteine als Fusionsplasmide mit der N-terminalen Hälfte (Venus1) und eIF4E als Fusionsplasmid mit der C-terminalen Hälfte (Venus2) des Venus-Proteins generiert und in HeLa-Zellen transfiziert. Kommt es in der Zelle zu einer Assoziation der exprimierten Proteine, so kommen die Venushälften in räumliche Nähe, das fluoreszierende Venusprotein wird rekonstituiert und ein BiFC-Signal (YFP-Signal) kann detektiert werden (siehe Abb. 16 A). Die Plakophilin-Konstrukte enthielten zusätzlich einen FLAG-tag, das eIF4E-Konstrukt einen HA-tag, wodurch mittels Antikörperfärbung die Expression der einzelnen Proteine überprüft werden konnte. Um die Intensität der YFP-Signale zwischen den einzelnen Plakophilin-Konstrukten direkt vergleichen zu können, wurde bei der mikroskopischen Analyse auf identische Belichtungszeiten sowie nachträglich auf eine identische Bildbearbeitung geachtet.

Die HeLa-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen den FLAG- und den HA-tag gefärbt. Die Detektion des YFP-Signals und die Kontrolle der erfolgreichen Transfektion erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Wie in Abb. 16 B zu erkennen ist, konnte ein deutliches zytoplasmatisches, aber auch ein nukleäres YFP-Signal für Plakophilin-1-wt + eIF4E und Plakophilin-1-Kopf + eIF4E nachgewiesen werden. Die Plakophilin-1-*repeat*-Domäne zeigte keine Assoziation mit eIF4E. Im Gegensatz dazu konnte für Plakophilin 3 (siehe Abb. 16 C) nur ein zytoplasmatisches YFP-Signal zwischen Plakophilin-3-wt + eIF4E nachgewiesen werden. Für die beiden

Plakophilin-3-Fragmente + eIF4E hingegen, konnte nur ein deutlich schwächer ausgeprägtes YFP-Signal detektiert werden. Die Färbungen gegen den FLAG- und den HA-tag belegen jedoch, dass die einzelnen Fragmente in den Zellen exprimiert wurden (siehe Abb. 16 B+C).

Die Ergebnisse der BiFC-Analyse zeigen damit, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 mit eIF4E *in vivo* assoziieren können. In Übereinstimmung mit den Hefedaten (siehe Abschnitt 3.3.3.1) assoziiert Plakophilin 1 mit eIF4E über seine N-terminale Kopfdomäne. Für Plakophilin 3 konnte die Assoziation nur mit dem Wildtyp-Protein und nicht mit den einzelnen Fragmenten nachgewiesen werden.



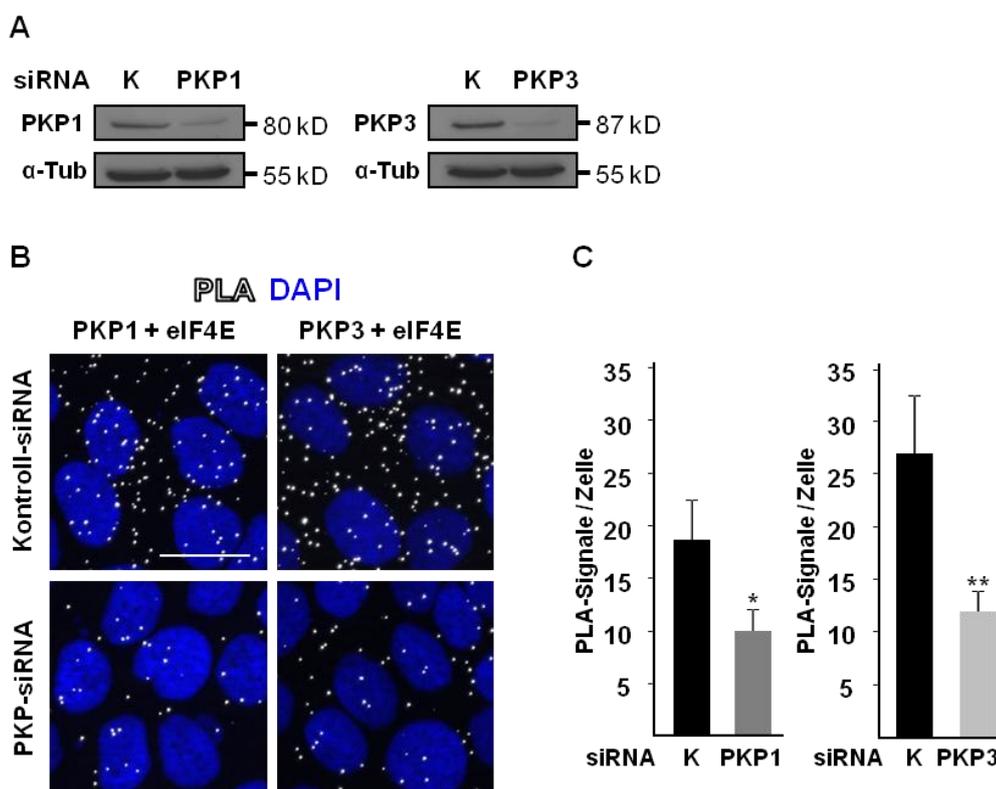
**Abb. 16 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E mittels BiFC.** (A) Schematische Darstellung des BiFC-Prinzips. (B, C) BiFC. HeLa-Zellen wurden mit Plakophilin-1- (B) und Plakophilin-3-Konstrukten (C) als Fusionsplasmide mit pVenus1-FLAG und mit pVenus2-HA-eIF4E transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit Antikörpern gegen den FLAG- und HA-tag gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Das YFP-Signal zeigt die Assoziation der Proteine *in vivo*. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Ein weitere Möglichkeit Protein-Protein-Assoziationen *in vivo* zu untersuchen bietet der *Proximity Ligation Assay*. Der Vorteil des Assays liegt im Gegensatz zur BiFC-Analyse darin, Proteinkomplexe mit Hilfe spezifischer Antikörper auf endogener Ebene nachzuweisen (siehe Abschnitt 2.3.7).

Um zu untersuchen, ob Plakophilin 1 und Plakophilin 3 auch endogen mit eIF4E in einem Komplex vorliegen, wurden HaCaT-Zellen mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF4E

markiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit spezifischen PLA-Sonden. Dies sind speziesspezifische Sekundärantikörper, welche an die Primärantikörper binden und mit fluoreszierenden Oligonukleotiden markiert sind. Befinden sich die Proteine in räumlicher Nähe, so können die Oligonukleotide in einer Ligationsreaktion verbunden und anschließend durch eine Polymerase amplifiziert werden. Das resultierende punktförmige Signal kann dann mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft (siehe Abb. 17 A).

Wie in Abb. 17 B zu erkennen ist, konnten sowohl für Plakophilin 1 + eIF4E als auch für Plakophilin 3 + eIF4E deutliche PLA-Signale in mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen detektiert werden. Nach *knockdown* von Plakophilin 1 reduzierte sich die Anzahl der Signale auf 53 % und nach *knockdown* von Plakophilin 3 auf 44 % des Kontrollniveaus, was die Quantifizierung der Signale pro Zelle in Abb. 17 C zeigt. Die PLA-Daten bestätigen somit die Ergebnisse aus den BiFC-Analysen und zeigen, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E *in vivo* im Komplex vorliegen.

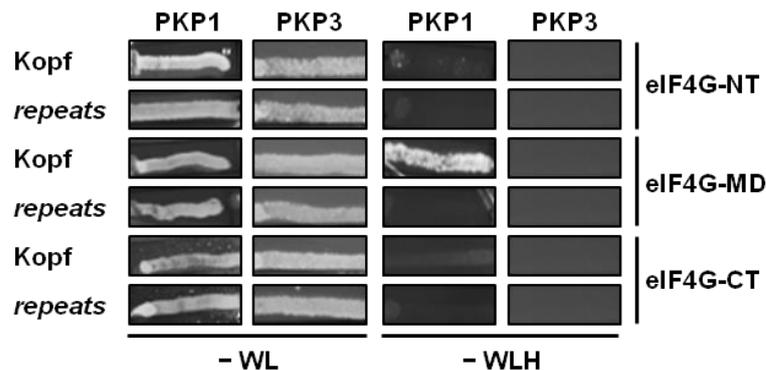


**Abb. 17 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E mittels PLA.** HaCaT-Zellen wurden mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. **(A)** Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft. **(B, C)** 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Anti-Plakophilin-1-, Anti-Plakophilin-3- und Anti-eIF4E-Antikörper markiert. Anschließend erfolgte die PLA-Reaktion und die DNA wurde mittels DAPI markiert. **(B)** Die punktförmigen Signale zeigen die Assoziation der Proteine *in vivo*. Die Anzahl der PLA-Signale wurde mikroskopisch analysiert. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m. **(C)** Die Quantifizierung der PLA-Signale pro Zelle erfolgte mikroskopisch anhand der DAPI-Markierung und wurde unter Verwendung der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens 350 Zellen. \*,  $p \geq 0,05$ ; \*\*,  $p \geq 0,005$ .



generiert und anschließend mit den jeweiligen Plakophilin-Konstrukten in den Hefestamm YRG2 transformiert.

Wie in Abb. 19 zu erkennen ist, konnte anhand des Hefewachstums auf –WLH-Agar eine Assoziation zwischen Plakophilin-1-Kopf und der mittleren Domäne von eIF4G nachgewiesen werden. Für Plakophilin 3 konnte keine Assoziation zu den einzelnen eIF4G-Fragmenten detektiert werden.



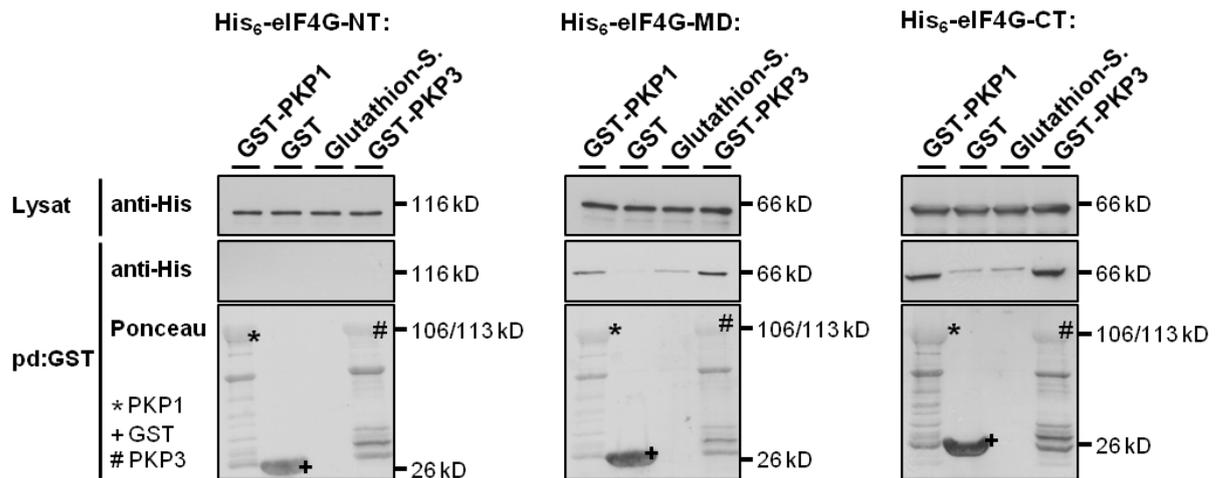
**Abb. 19 Nachweis der Assoziation von eIF4G mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mittels Hefe-Dihybrid-System.** YRG2-Zellen wurden mit den angegebenen eIF4G- (in pGADT7) und den angegebenen Plakophilin-Konstrukten (in pBD) transformiert und auf Agar ohne Tryptophan und Leucin (–WL) selektiert. Der Nachweis der Assoziation erfolgte durch Wachstum der Hefen auf Reporterplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (–WLH).

#### 3.3.4.2. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G mittels GST-pulldown

Um die Assoziation der Proteine in einem unabhängigen System zu überprüfen, wurden anschließend GST-*pulldown*-Experimente, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, durchgeführt.

Während Plakophilin 1 und Plakophilin 3 als Fusionsproteine mit einem GST-*tag* in *E. coli* exprimiert wurden, erfolgte die Expression der eIF4G-Fragmente als Fusionsproteine mit einem His<sub>6</sub>-*tag*.

Wie Abb. 20 zeigt, konnte sowohl die mittlere Domäne, als auch der C-Terminus von eIF4G deutlich mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 kopräzipitiert werden, während im Vergleich nur eine sehr schwache Bindung von eIF4G-MD und eIF4G-CT an die Glutathion-Sephrose bzw. GST beobachtet werden konnte. Für den N-Terminus von eIF4G konnte keine Kopräzipitation mit Plakophilin 1 oder Plakophilin 3 detektiert werden. Die Ergebnisse aus dem GST-*pulldown* deuten damit darauf hin, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 mit eIF4G *in vitro* assoziieren können.



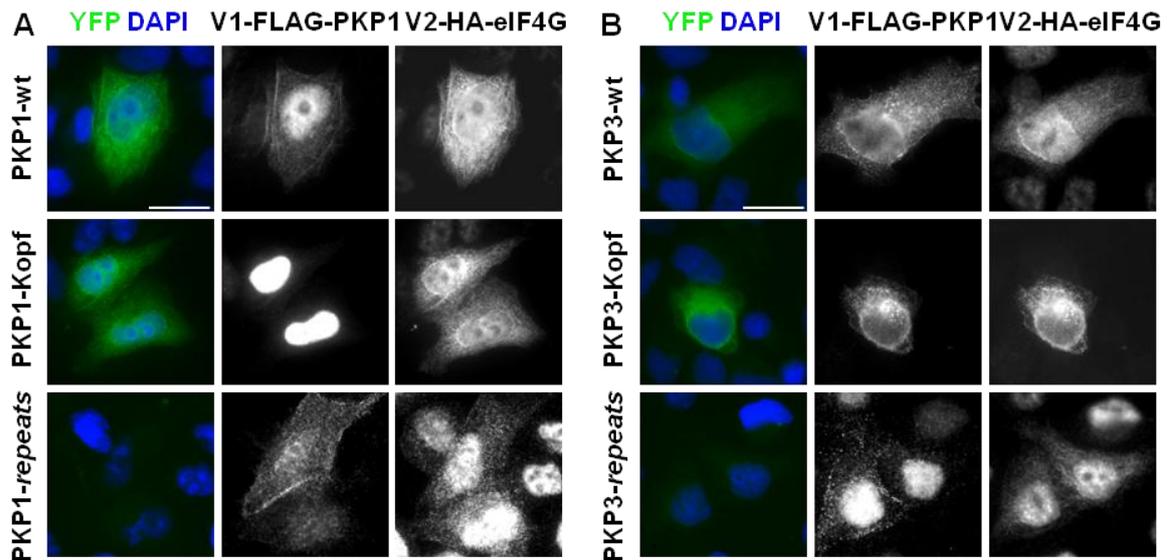
**Abb. 20 Nachweis der Assoziation von eIF4G mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mittels GST-pulldown.** In *E. coli* exprimierte GST-Plakophilin-1, GST-Plakophilin-3 oder GST wurde an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Die Sepharose wurde anschließend mit His<sub>6</sub>-eIF4G-Fragmenten (als *E. coli*-Lysat) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die eIF4G-Fragmente wurden mittels Anti-His-Antikörper im Western Blot detektiert. Um eine unspezifische Bindung der eIF4G-Fragmente an die Sepharose zu prüfen, wurden diese außerdem nur mit Glutathion-Sepharose (Glutathion-S.) inkubiert. Zur Kontrolle der eIF4G-Expression wurden 10 % vom Gesamtlisat eingesetzt.

### 3.3.4.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G *in vivo*

Da die Ergebnisse aus den Präzipitationsstudien (siehe Abschnitt 3.3.2) und den GST-pulldown-Experimenten (siehe Abschnitt 3.3.4.2) eine Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G *in vitro* zeigen und da auch die Assoziation von Plakophilin 1 und eIF4G mittels Hefe-Dihybrid-Analyse (siehe Abschnitt 3.3.4.1) nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden die BiFC-Analyse und der *Proximity Ligation Assay* genutzt, um zusätzliche Informationen über die Assoziation der Proteine *in vivo* zu erhalten.

Für die BiFC-Analysen wurden die bereits unter 3.3.3.3 erwähnten Plakophilin-Konstrukte (Venus1-FLAG-PKP-wt/Kopf/*repeats*) zusammen mit Venus2-HA-eIF4G in HeLa-Zellen exprimiert und die BiFC-Analyse, wie unter 3.3.3.3 beschrieben, durchgeführt.

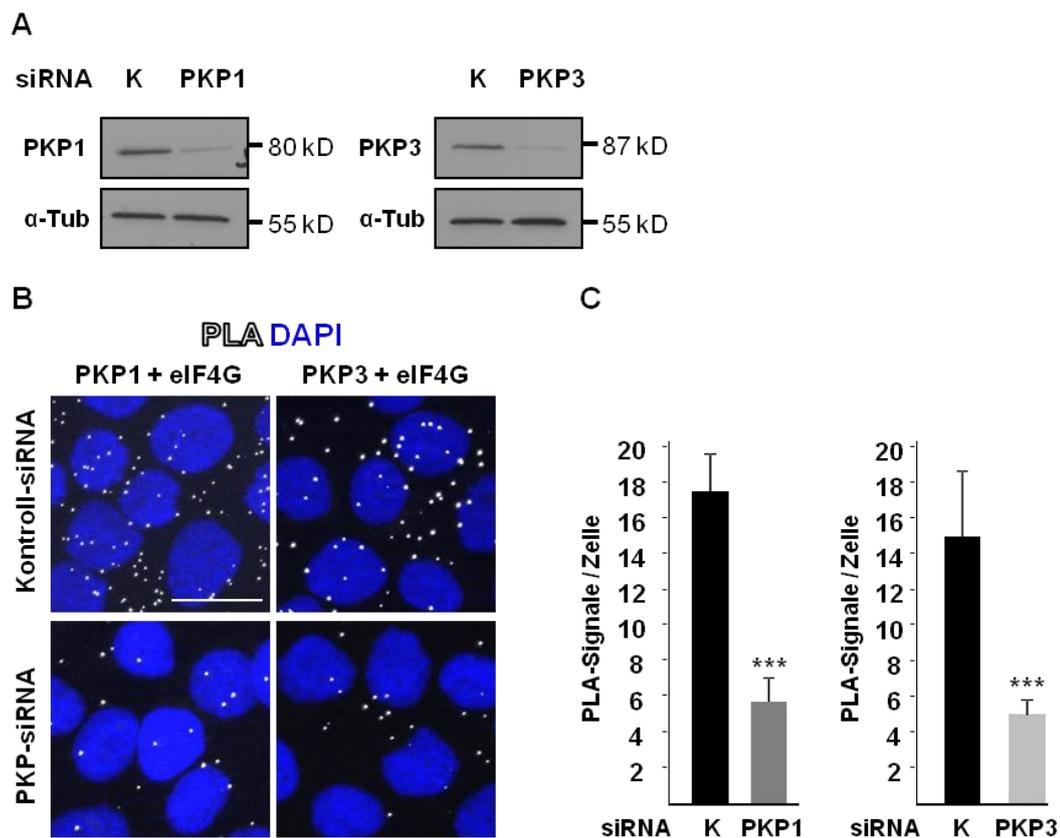
Wie in Abb. 21 zu erkennen ist, konnte ein deutliches zytoplasmatisches YFP-Signal für eIF4G + Plakophilin-1-wt und eIF4G + Plakophilin-3-wt sowie für eIF4G + Plakophilin-1-Kopf und eIF4G + Plakophilin-3-Kopf detektiert werden. Kein YFP-Signal konnte für eIF4G + Plakophilin-1-*repeats* und eIF4G + Plakophilin-3-*repeats* nachgewiesen werden, obwohl die Antikörperfärbungen deutlich zeigen, dass die einzelnen Konstrukte von den Zellen exprimiert wurden. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 *in vivo* mit eIF4G assoziieren können und dass diese Assoziation über die Kopfdomäne von Plakophilin 1 bzw. Plakophilin 3 vermittelt wird.



**Abb. 21 Nachweis der Interaktion von eIF4G mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mittels BiFC.** Plakophilin-1- (**A**) bzw. Plakophilin-3-Konstrukte (**B**) wurden als Fusionsproteine mit Venus1-FLAG zusammen mit Venus2-HA-eIF4G in HeLa-Zellen exprimiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen den FLAG- und den HA-tag gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Das YFP-Signal zeigt die Assoziation der Proteine *in vivo*. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Neben den BiFC-Analysen wurde auch ein *Proximity Ligation Assay* (siehe 2.3.7) durchgeführt um die Assoziation der Plakophiline mit eIF4G *in vivo* auf endogener Ebene zu untersuchen. Dazu wurden HaCaT-Zellen mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert, 48 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert, anschließend mit Anti-Plakophilin-1-, Anti-Plakophilin-3- und Anti-eIF4G-Antikörper markiert und in der bereits unter 3.3.3.3 beschriebenen Weise analysiert. Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft (siehe Abb. 22 A).

Wie in Abb. 22 B zu erkennen, konnten deutliche PLA-Signale für Plakophilin 1 + eIF4G aber auch für Plakophilin 3 + eIF4G in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen detektiert werden. Die Quantifizierung der Signale pro Zelle zeigt, dass diese nach *knockdown* von Plakophilin 1 auf 33 % und nach *knockdown* von Plakophilin 3 auf 30 % des Kontrollniveaus reduziert waren (siehe Abb. 22 C). Somit unterstützen die Ergebnisse aus dem *Proximity Ligation Assay* die Resultate der BiFC-Analyse und zeigen, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 *in vivo* mit eIF4G in einem Komplex vorliegen.



**Abb. 22 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G mittels PLA.** HaCaT-Zellen wurden mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. **(A)** Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot kontrolliert. **(B, C)** 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Anti-Plakophilin-1-, Anti-Plakophilin-3- und Anti-eIF4G-Antikörper markiert. Anschließend erfolgten die PLA-Reaktion und die Markierung der DNA mittels DAPI. **(B)** Die punktförmigen Signale zeigen die Assoziation der Proteine *in vivo*. Die Anzahl der PLA-Signale wurde mikroskopisch analysiert. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m. **(C)** Die Quantifizierung der PLA-Signale pro Zelle erfolgte mikroskopisch anhand der DAPI-Markierung unter Verwendung der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens 350 Zellen. \*\*\*,  $p \geq 0,0005$ .

Zusammenfassend konnte die Assoziation von Plakophilin 1 und eIF4G *in vitro* (Immunpräzipitation, GST-*pull-down*) und *in vivo* (Hefe-Dihybrid-System, BiFC, PLA) mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Assoziation über die Kopfdomäne von Plakophilin 1 vermittelt wird.

Für Plakophilin 3 konnte die Assoziation *in vitro* mittels Immunpräzipitation sowie mittels GST-*pull-down* und *in vivo* mittels BiFC und PLA nachgewiesen werden. In der Hefe-Dihybrid-Analyse zeigte sich keine Assoziation zwischen den Proteinen. Die BiFC-Analysen weisen darauf hin, dass auch die Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4G über die Kopfdomäne von Plakophilin 3 vermittelt wird, auch wenn diese Assoziation mittels Hefe-Dihybrid-System nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse aus dem GST-*pull-down* zeigen, dass die mittlere Domäne und der C-Terminus von eIF4G einen Komplex mit den Plakophilinen bilden können.

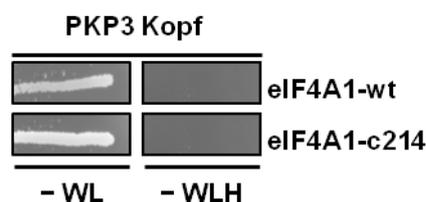
### 3.3.5. Plakophilin 3 assoziiert nur schwach mit eIF4A1

Nachdem eine Assoziation zwischen Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit dem Gerüstprotein eIF4G des Translationsinitiationskomplexes nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend eine mögliche Assoziation von Plakophilin 3 mit eIF4A1 geprüft. In der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien im Hefestamm YRG2 konnten keine Assoziation zwischen den Proteinen belegen, lediglich eine Interaktion zwischen Plakophilin 1 und eIF4A1 konnte nachgewiesen werden (WOLF A. *et al.* 2010). Da eIF4A1 aber im Hefe-Dihybrid-Screening als putativer Interaktionspartner für die Plakophilin-3-Kopfdomäne identifiziert worden war (siehe Abschnitt 3.2), wurde eine mögliche Assoziation mit den im Screening verwendeten Hefestämmen (AH109 und Y187) erneut überprüft.

#### 3.3.5.1. Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 mittels Hefe-Dihybrid-System

Um eine mögliche Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 zu prüfen, wurden zunächst Interaktionsstudien unter Verwendung des Hefe-Dihybrid-Systems angefertigt. Dazu wurden ein im Labor vorhandenes eIF4A1-wt-Konstrukt und der im Screening identifizierte cDNA-Klon von eIF4A1 (eIF4A1-c214, Volllängenklon) verwendet. Beide Konstrukte lagen als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne vor und wurden im Hefestamm Y187 exprimiert. Das bereits unter 3.2 erwähnte Plakophilin-3-Kopf-Konstrukt (pBD-PKP3-Kopf) wurde hingegen im Hefestamm AH109 exprimiert. Anschließend wurde ein *mating* zwischen den erfolgreich transformierten Hefestämmen durchgeführt und die Klone auf Selektionsagar ohne Tryptophan und Leucin (-WL) ausplattiert. Der Nachweis der Interaktion erfolgte auf Reporterplatten (-WLH).

Das *mating* der Hefestämmen war erfolgreich, was sich anhand des Hefewachstums auf -WL-Agar erkennen ließ (siehe Abb. 23). Eine Assoziation zwischen der Plakophilin-3-Kopfdomäne und eIF4A1-wt bzw. eIF4A1-c214 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da kein Wachstum auf den Reporterplatten zu verzeichnen war (siehe Abb. 23).



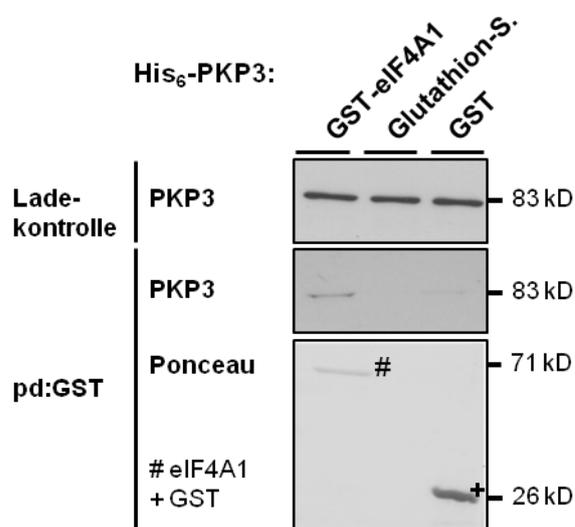
**Abb. 23 Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 mittels Hefe-Dihybrid-System.** Der Hefestamm Y187 wurde mit pGADT7-eIF4A1-wt bzw. mit der cDNA von Klon 214 (eIF4A1-c214, Volllängenklon) transformiert. Der Hefestamm AH109 wurde mit pBD-Plakophilin-3-Kopf transformiert. Anschließend erfolgte ein *mating* der beiden Hefestämmen, dessen Erfolg durch das Wachstum der Hefen auf Selektionsagar ohne Tryptophan und Leucin (-WL) geprüft wurde. Die Analyse der Assoziation erfolgte auf Reporterplatten durch den Nachweis der Histidin-Auxotrophie (-WLH).

### 3.3.5.2. Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 *in vitro* mittels GST-pulldown

Um die Assoziation zwischen Plakophilin 3 und eIF4A1 in einem unabhängigen System zu prüfen, wurden GST-pulldown-Analysen, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, durchgeführt.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen GST-pulldown-Experimenten wurde hier Plakophilin 3 als Fusionsprotein mit einem His<sub>6</sub>-tag und eIF4A1 als Fusionsprotein mit einem GST-tag eingesetzt, da diese Proteine rekombinant und gereinigt in der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen und somit der Einfluss anderer zellulärer Proteine minimiert werden konnte.

Wie in Abb. 24 zu erkennen, konnte im Vergleich mit Glutathion-Sepharose bzw. GST deutlich mehr His<sub>6</sub>-Plakophilin-3 zusammen mit GST-eIF4A1 präzipitiert werden. Die Ergebnisse aus dem GST-pulldown deuten somit darauf hin, dass eine schwache Assoziation zwischen Plakophilin 3 und eIF4A1 besteht.



**Abb. 24 Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 mittels GST-pulldown.** In *E. coli* exprimiertes und anschließend gereinigtes GST-eIF4A1 bzw. GST wurde an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Anschließend wurde es mit gereinigtem His<sub>6</sub>-Plakophilin-3 für 1 h bei 4 °C inkubiert. Um eine unspezifische Bindung von Plakophilin 3 an die Sepharose zu prüfen, wurde es außerdem nur mit Glutathion-Sepharose (Glutathion-S.) inkubiert. Die Detektion von Plakophilin 3 erfolgte im Western Blot mittels Anti-His-Antikörper. Die Ladekontrolle entspricht circa 10 % des eingesetzten gereinigten Plakophilin 3.

### 3.3.5.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 *in vivo*

Die in der Arbeitsgruppe (WOLF A. *et al.* 2010) und unter Abschnitt 3.3.5.1 durchgeführten Hefe-Dihybrid-Analysen zeigten keine Assoziation zwischen Plakophilin 3 und eIF4A1, jedoch der GST-pulldown (siehe 3.3.5.2). Um Informationen über die Assoziation der Proteine *in vivo* zu erhalten, wurden zusätzlich BiFC-Analysen und ein *Proximity Ligation* Assay durchgeführt.

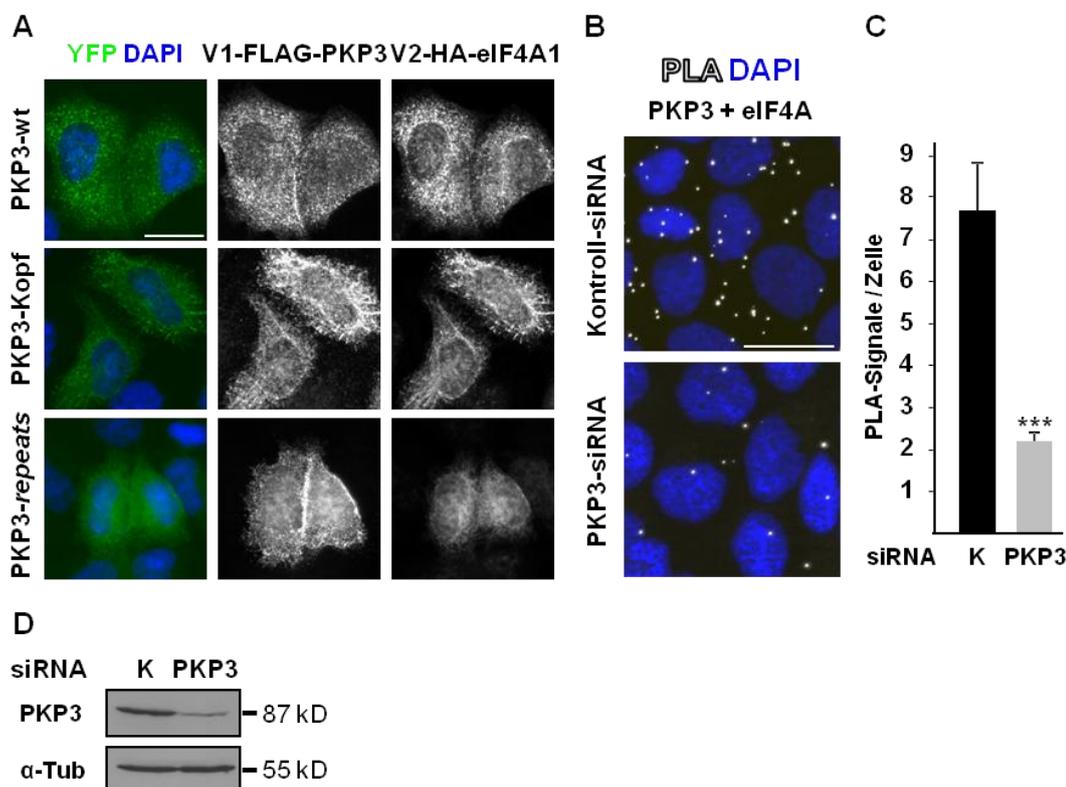
Für die BiFC-Analysen wurden die bereits unter 3.3.3.3 beschriebenen Plakophilin-3-Fragmente als Fusionsplasmide mit der N-terminalen Hälfte (Venus1) und eIF4A1 als Fusionsplasmid mit der C-terminalen Hälfte (Venus2) des Venusproteins generiert und in HeLa-Zellen transfiziert. Anschließend wurde die BiFC-Analyse, wie unter 3.3.3.3 beschrieben, durchgeführt.

Wie in Abb. 25 A zu erkennen, konnte eine Assoziation von eIF4A1 mit Plakophilin-3-wt, mit Plakophilin-3-Kopf und mit Plakophilin-3-repeats nachgewiesen werden.

Somit deuten auch die BiFC-Analysen darauf hin, dass Plakophilin 3 und eIF4A1 *in vivo* in einem Komplex vorliegen können.

Da die BiFC-Analyse eine exogene Expression der einzelnen Proteine erfordert, wurde zur Validierung der Assoziation *in vivo* ein *Proximity Ligation Assay* in HaCaT-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit Plakophilin-3- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert, 48 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert, mit einem Anti-Plakophilin-3- und einem Anti-eIF4A-Antikörper markiert und anschließend wie unter 2.3.7 beschrieben analysiert.

Wie in Abb. 25 B zu erkennen ist, konnten in mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine Vielzahl von PLA-Signalen zwischen Plakophilin 3 und eIF4A detektiert werden. Die Anzahl der PLA-Signale pro Zelle wurden durch den *knockdown* von Plakophilin 3 im Vergleich zur Kontrolle auf 42 % reduziert, was die Quantifizierung (siehe Abb. 25 C) verdeutlicht. Der *knockdown* von Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot kontrolliert (siehe Abb. 25 D).



**Abb. 25 Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 *in vivo*.** (A) BiFC. HeLa-Zellen wurden mit Plakophilin-3-Konstrukten als Fusionsplasmide mit pVenus1-FLAG und mit pVenus2-HA-eIF4A1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit Antikörpern gegen den FLAG- und HA-tag gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Das YFP-Signal zeigt die Assoziation der Proteine *in vivo*. (B-D) PLA. HaCaT-Zellen wurden mit Plakophilin-3- und Kontroll-siRNA transfiziert. (B, C) 48h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Anti-Plakophilin-3- und Anti-eIF4A-Antikörper markiert und der *Proximity Ligation Assay* durchgeführt. Die DNA wurde mit DAPI markiert. (B) Die punktförmigen Signale zeigen die Assoziation der Proteine *in vivo*. Die Anzahl der PLA-Signale wurde mikroskopisch analysiert. (C) Die Quantifizierung der PLA-Signale pro Zelle wurde anhand der DAPI-Markierung unter Verwendung der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens 350 Zellen. \*\*\*,  $p \geq 0,0005$ . (D) Der *knockdown* von Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft. (A, B) Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m.

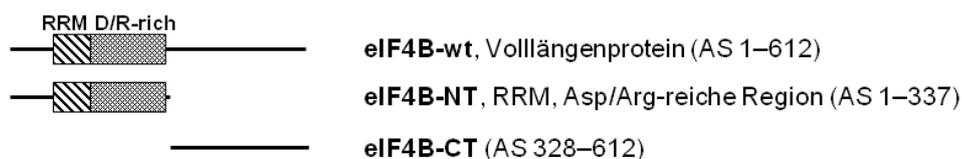
Vergleicht man die Ergebnisse der Assoziationsstudien von eIF4A1 mit den bisher untersuchten Initiationsfaktoren (eIF4E, eIF4G) so konnte im *GST-pulldown* nur eine schwache Assoziation von eIF4A1 und Plakophilin 3 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der BiFC-Analysen und des *Proximity Ligation Assays* unterstützen die Vermutung, dass die Proteine in einem Komplex vorliegen, auch wenn im Hefesystem keine Assoziation detektiert werden konnte.

### 3.3.6. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit eIF4B

eIF4B stellt einen wichtigen Kofaktor bei der Regulation der Translation dar. Obwohl eIF4B keine eigene katalytische Aktivität aufweist, stimuliert es die RNA-Bindung sowie die Helikase- und ATPase-Aktivität von eIF4A1 (GRIFO J. A. *et al.* 1984; ROGERS G. W., JR. *et al.* 2001; ROZEN F. *et al.* 1990). Da die vorangegangenen Daten implizieren, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 mit eIF4A1 in einem Komplex vorliegen und da beide Plakophiline auch nachweislich die EMCV-abhängige Translation stimulieren, sollte im Folgenden geprüft werden, ob auch eine Assoziation mit eIF4B, dem Kofaktor von eIF4A1, möglich ist.

eIF4B besitzt N-terminal ein RNA-bindendes Motiv (RRM, *RNA recognition motif*) sowie eine Aspartat- und Arginin-reiche Region. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass vor allem der C-Terminus von eIF4B an der RNA-Bindung sowie an der Stimulation der eIF4A1-Helikaseaktivität beteiligt ist (METHOT N. *et al.* 1994).

Um die Bindungsstelle der Plakophiline an eIF4B eingrenzen zu können, wurde daher zunächst ein N-terminales und ein C-terminales Fragment von eIF4B generiert. Diese sind in Abb. 26 schematisch dargestellt.

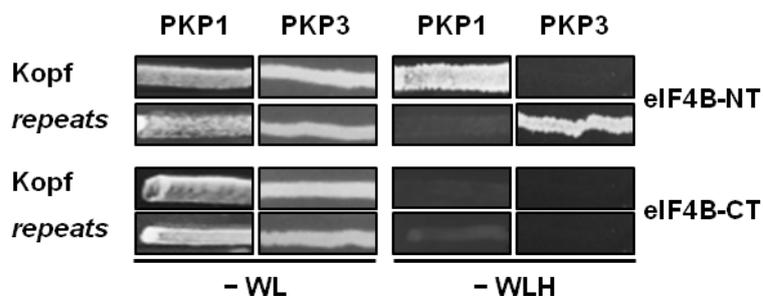


**Abb. 26 Schematische Darstellung der eIF4B-Fragmente.** Der N-Terminus von eIF4B (eIF4B-NT, AS 1–337) enthält ein RNA-bindendes-Motiv (RRM, *RNA recognition motif*) sowie eine Aspartat- und Arginin-reiche Region. Der C-Terminus (eIF4B-CT) umfasst die Aminosäuren 328–612.

#### 3.3.6.1. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B mittels Hefe-Dihybrid-System

Um die Assoziation von Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF4B zu untersuchen und um die Bindungsstelle auf eine bestimmte Region im jeweiligen Protein einzugrenzen, wurden die eIF4B-Fragmente als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne generiert, (pGADT7-eIF4B-NT/CT) mit den bereits unter 3.3.3.1 beschriebenen Plakophilin-Kopf- und -repeat-Konstrukten in YRG2-Zellen exprimiert und eine Hefe-Dihybrid-Analyse angefertigt.

Wie in Abb. 27 zu erkennen, konnte nach Transformation der einzelnen Konstrukte sowohl für Plakophilin 1 und eIF4B als auch für Plakophilin 3 und eIF4B ein Wachstum der Hefen auf Reporterplatten (-WLH) detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass der N-Terminus von eIF4B einerseits mit der Plakophilin-1-Kopfdomäne und andererseits mit der Plakophilin-3-repeat-Domäne wechselwirken kann. Eine Assoziation des eIF4B-C-Terminus mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 konnte nicht nachgewiesen werden.

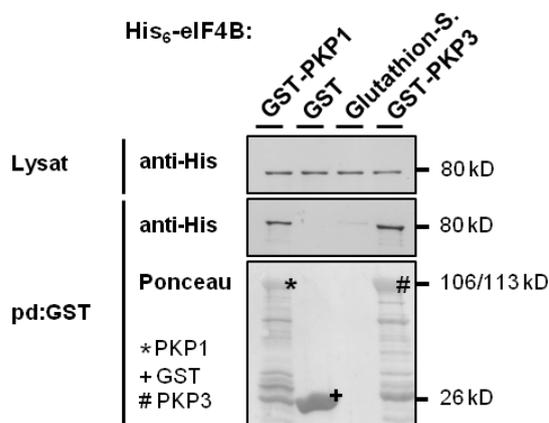


**Abb. 27 Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B im Hefe-Dihybrid-System.** YRG2-Zellen wurden mit den einzelnen Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Konstrukten (in pBD) sowie den einzelnen eIF4B-Fragmenten (in pGADT7) transformiert und auf Agar ohne Tryptophan und Leucin (-WL) selektiert. Der Nachweis der Assoziation erfolgte durch Wachstum der Hefen auf Reporterplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (-WLH).

### 3.3.6.2. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B *in vitro* mittels GST-pulldown

Die vorangegangenen Daten aus der Hefe-Dihybrid-Analyse lassen eine Assoziation zwischen Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF4B vermuten. Um diese in einem unabhängigen System zu prüfen, wurden ebenfalls GST-pulldown-Analysen, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, durchgeführt. Dafür wurden Plakophilin 1 und Plakophilin 3 als Fusionsproteine mit einem GST-tag und eIF4B als Fusionsprotein mit einem His<sub>6</sub>-tag in *E. coli* exprimiert.

Die Abb. 28 zeigt, dass eIF4B sowohl mit Plakophilin 1, als auch mit Plakophilin 3 kopräzipitiert werden konnte. Eine unspezifische Bindung des Proteins an GST- bzw. Glutathion-Sepharose konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 28 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B im GST-pulldown.** GST-Plakophilin-1, GST-Plakophilin-3 und GST wurden in *E. coli* exprimiert und anschließend an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Die Sepharose wurde dann für 1 h bei 4 °C mit His<sub>6</sub>-eIF4B (als *E.-coli*-Lysat) inkubiert. Um eine unspezifische Bindung von eIF4B an die Sepharose zu prüfen, wurde es zusätzlich mit Glutathion-Sepharose (Glutathion-S.) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und unter Verwendung der SDS-PAGE und des Western Blots analysiert. Die Detektion von eIF4B erfolgte im Western Blot mittels Anti-His-Antikörper. Zur Kontrolle der eIF4B-Expression wurden 10 % vom Gesamtlisat eingesetzt.

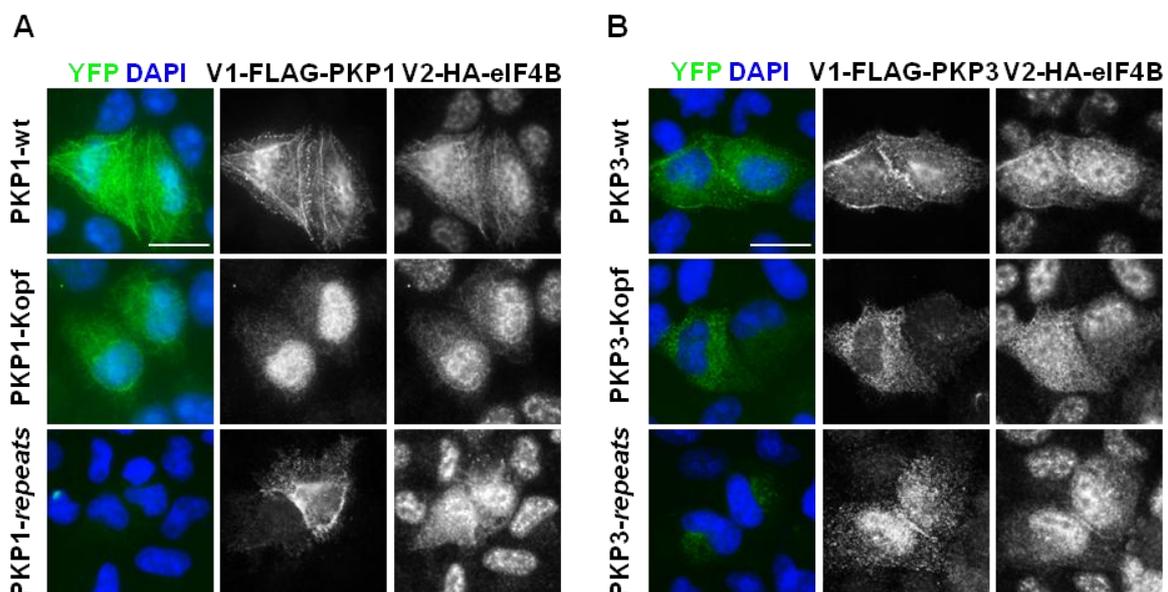
Diese Daten bestätigen somit die Interaktionsanalysen aus der Hefe und zeigen, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B *in vitro* assoziieren können.

### 3.3.6.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B *in vivo*

Da die vorangegangenen Hefe- und GST-*pull-down*-Daten sowie die Immunpräzipitations-experimente (siehe Abschnitt 3.3.2) auf eine Assoziation von eIF4B mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 schließen lassen wurde anschließend geprüft, ob die Proteine auch *in vivo* in einem Komplex vorliegen. Dazu wurden BiFC-Analysen und ein *Proximity Ligation Assay* angefertigt.

Um die BiFC-Analysen durchzuführen wurden HeLa-Zellen mit den bereits unter 3.3.3.3 beschriebenen pVenus1-FLAG-Plakophilin-Plasmiden und pVenus2-HA-eIF4B transfiziert und ebenso analysiert.

Wie in Abb. 29 A zu erkennen ist, wurde für Plakophilin-1-wt + eIF4B, aber auch für Plakophilin-1-Kopf + eIF4B ein deutliches, zytoplasmatisches YFP-Signal in den Zellen detektiert. Für Plakophilin-1-*repeats* + eIF4B konnte kein YFP-Signal nachgewiesen werden, obwohl die Färbungen gegen den FLAG- und HA-*tag* deutlich zeigen, dass beide Proteine in der Zelle exprimiert vorlagen. Dies lässt darauf schließen, dass die Assoziation von Plakophilin 1 und eIF4B über die Kopfdomäne von Plakophilin 1 vermittelt wird.

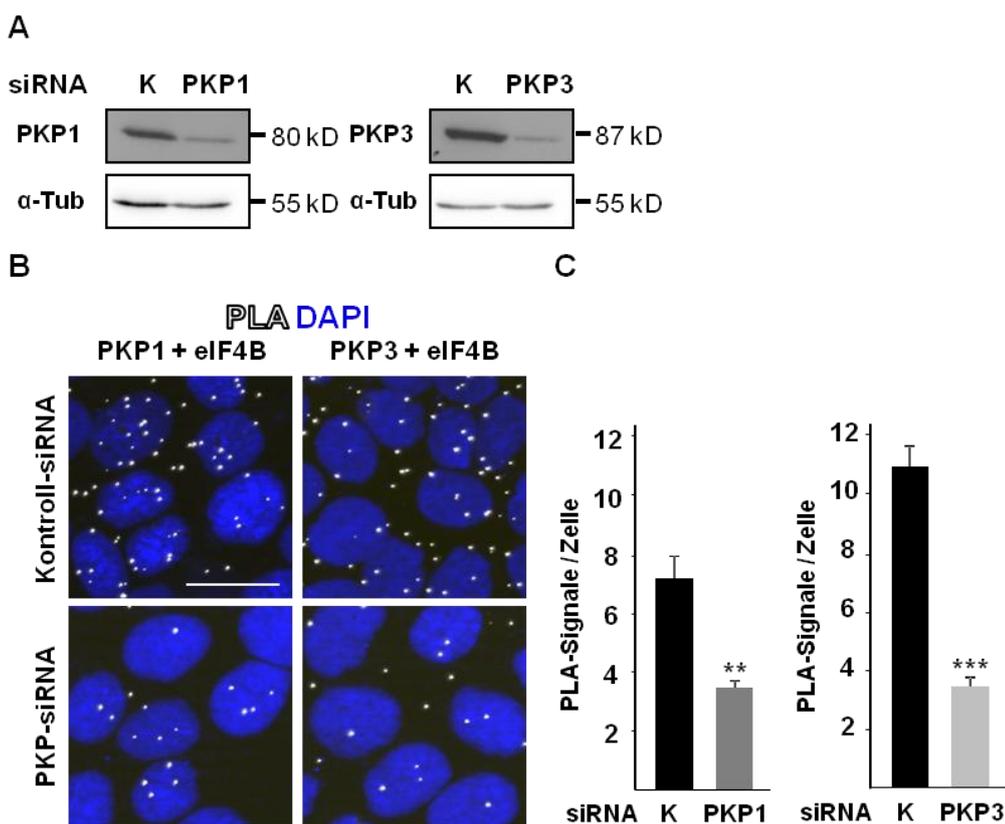


**Abb. 29 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B mittels BiFC.** Plakophilin-1- (A) und Plakophilin-3-Konstrukte (B) wurden als Fusionsproteine mit Venus1-FLAG zusammen mit Venus2-HA-eIF4B in HeLa-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen den FLAG- und den HA-*tag* gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Das YFP-Signal zeigt die Assoziation der Proteine *in vivo*. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Auch für Plakophilin-3-wt + eIF4B, sowie für Plakophilin-3-Kopf + eIF4B konnte ein zytoplasmatisches YFP-Signal in den Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 29 B),

welches im Vergleich mit Plakophilin 1 jedoch etwas schwächer ausgeprägt war. Für Plakophilin-3-*repeats* + eIF4B konnte, im Vergleich zum Wildtyp und zur Kopfdomäne, ein schwächeres Signal detektiert werden. Die Daten der BiFC-Analyse weisen somit auch für Plakophilin 3 und eIF4B auf eine, durch die Plakophilin-3-Kopfdomäne vermittelte, Assoziation hin.

Um auch auf endogener Ebene die Assoziation der Plakophiline mit eIF4B zu prüfen, wurde anschließend ein *Proximity Ligation Assay* durchgeführt. Dafür wurden HaCaT-Zellen mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nachdem die Zellen 48 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert wurden, erfolgte die Markierung mit spezifischen Antikörpern gegen Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF4B sowie die PLA-Reaktion (siehe 2.3.7). Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft (siehe Abb. 30 A). Die mikroskopische Analyse zeigte, dass in mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen deutliche PLA-Signale, sowohl für Plakophilin 1 + eIF4B als auch für Plakophilin 3 + eIF4B detektiert werden konnten (siehe Abb. 30 B).



**Abb. 30 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B mittels PLA.** HaCaT-Zellen wurden mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. **(A)** Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft. **(B, C)** Zur mikroskopischen Analyse wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF4B gefärbt. Anschließend erfolgte die PLA-Reaktion. Die DNA wurde mit DAPI markiert. **(B)** Die punktförmigen Signale zeigen die Assoziation der Proteine *in vivo*. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m. **(C)** Die Quantifizierung der PLA-Signale pro Zelle erfolgte anhand der DAPI-Markierung unter Verwendung der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens 350 Zellen. \*\*,  $p \geq 0,005$ ; \*\*\*,  $p \geq 0,0005$ .

Dies lässt darauf schließen, dass die Proteine in einem Komplex in der Zelle vorliegen. Nach *knockdown* von Plakophilin 1 bzw. Plakophilin 3 wurden im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen hingegen deutlich weniger PLA-Signale in der Zelle beobachtet. Wie die Quantifizierung in Abb. 30 C zeigt, war die Anzahl der PLA-Signale pro Zelle nach *knockdown* von Plakophilin 1 auf 48 % und nach *knockdown* von Plakophilin 3 auf 31 % des Kontrollniveaus reduziert.

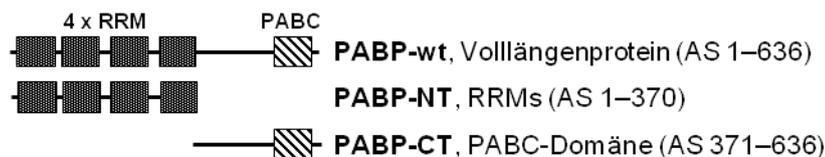
Für die Assoziation von eIF4B mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 lässt sich zusammenfassend feststellen, dass zusätzlich zu den Präzipitationsexperimenten eine Assoziation zwischen den Proteinen sowohl *in vitro* (GST-*pull-down*) als auch *in vivo* (Hefe-Dihybrid-System, BiFC, PLA) nachgewiesen werden konnte. Die Assoziation von Plakophilin 1 und eIF4B scheint über die N-terminale Kopfdomäne von Plakophilin 1 vermittelt zu werden, was sowohl die Hefe-Dihybrid- als auch die BiFC-Daten belegen. Für Plakophilin 3 hingegen, deuten die Hefe-Dihybrid-Analysen auf eine durch die *repeat*-Domäne und die BiFC-Analysen auf eine durch die Kopfdomäne vermittelte Assoziation hin.

### 3.3.7. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit PABP

PABP stellt neben eIF4E, eIF4A1, eIF4G und eIF4B einen weiteren wichtigen Bestandteil des *cap*-mRNA-Bindekomplexes dar. Es bildet mit eIF4G und eIF4E einen trimeren Komplex, welcher durch die gleichzeitige Bindung der 5'-*cap*- und 3'-Schwanz-Region die Bildung einer zirkulären RNA-Struktur bewirkt (WELLS S. E. *et al.* 1998). Dies wiederum stimuliert die Translation, indem u. a. die Rekrutierung der 40S-Untereinheit des Ribosoms gefördert wird (MANGUS D. A. *et al.* 2003).

Vorangegangene Studien zeigten zudem, dass Plakophilin 3 mit PABP kopräzipitiert werden kann und dass beide Proteine zusammen mit Plakophilin 1 in sogenannten *stress granules*, zytoplasmatischen Aggregaten von inaktiven Translationsinitiationskomplexen, vorliegen können (HOFMANN I. *et al.* 2006). Daher war es von Interesse eine mögliche Assoziation der Proteine näher zu untersuchen.

Um die Bindungsstelle der Plakophiline an PABP genauer charakterisieren zu können, wurden daher zwei Fragmente des Proteins generiert, welche in Abb. 31 schematisch dargestellt sind. Das N-terminale Fragment enthält vier RNA-Erkennungsmotive (RRMs, *RNA recognition motifs*) und das C-terminale Fragment die PABC-Domäne (Poly(A)-Bindeprotein C-terminale Domäne).



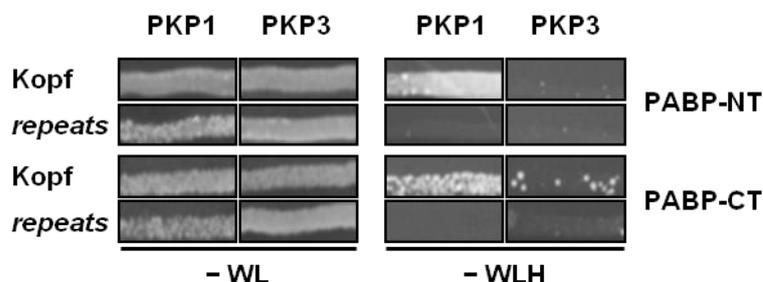
**Abb. 31 Schematische Darstellung der PABP-Fragmente.** Der N-Terminus von PABP (PABP-NT) umfasst die vier RNA-bindenden Motive (RRMs *RNA recognition motifs*) und der C-Terminus (PABP-CT) enthält die sog. PABC-Domäne (Poly(A)-Bindepotein C-terminale Domäne).

### 3.3.7.1. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP mittels Hefe-Dihybrid-System

Um die Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP untersuchen zu können wurden zunächst Hefe-Dihybrid-Analysen wie unter 3.3.3.1 beschrieben angefertigt, wobei die einzelnen PABP-Fragmente als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert wurden.

Wie das Wachstum der Hefezellen auf –WLH-Agar in Abb. 32 erkennen lässt, konnte eine Assoziation der Plakophilin-1-Kopfdomäne sowohl mit dem N-Terminus als auch mit dem C-Terminus von PABP detektiert werden. Die *repeat*-Domäne von Plakophilin 1 zeigte im Gegensatz dazu keine Interaktion mit den PABP-Fragmenten.

Für Plakophilin 3 konnte ein sehr schwaches Wachstum der Hefen nach Transformation der Kopfdomäne und dem PABP-C-Terminus detektiert werden. Die Daten aus der Hefe-Dihybrid-Analyse deuten somit lediglich auf eine Assoziation von Plakophilin 1 und PABP hin.



**Abb. 32 Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP mittels Hefe-Dihybrid-System.** YRG2-Zellen wurden mit den einzelnen Plakophilin- (in pBD) und PABP-Konstrukten (in pGADT7) transformiert und auf Agar ohne Tryptophan und Leucin (–WL) selektiert. Der Nachweis der Assoziation erfolgte durch Wachstum der Hefen auf Reporterplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (–WLH).

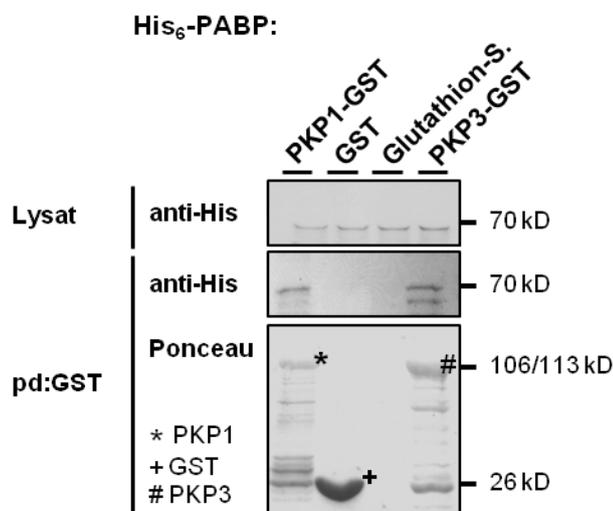
### 3.3.7.2. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1, Plakophilin 3 und PABP mittels GST-pulldown

Da die vorangegangenen Hefe-Dihybrid-Daten sowie die Immunpräzipitationsexperimente (siehe Abschnitt 3.3.2 und HOFMANN I. *et al.* 2006) eine Assoziation der Plakophiline mit PABP vermuten lassen, wurde anschließend der GST-*pulldown* genutzt, um diese in einem unabhängigen System zu prüfen.

Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurden als Fusionsproteine mit einem GST-*tag*, PABP als Fusionsprotein mit einem His<sub>6</sub>-*tag* in *E. coli* exprimiert und der GST-*pull-down* anschließend, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass PABP sowohl mit Plakophilin 1 als auch mit Plakophilin 3 kopräzipitiert werden konnte (siehe Abb. 33). Eine unspezifische Bindung von PABP an die Glutathion-Sepharose bzw. an GST konnte nicht detektiert werden.

Diese Daten unterstützen somit die durchgeführten Immunpräzipitationsanalysen (siehe 3.3.2) sowie die von Hofmann und Kollegen durchgeführten Experimente (HOFMANN I. *et al.* 2006) und belegen, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP *in vitro* assoziieren können.



**Abb. 33 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP *in vitro* mittels GST-*pull-down*.** GST-Plakophilin-1, GST-Plakophilin-3 und GST wurden in *E. coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Die Sepharose wurde anschließend mit His<sub>6</sub>-PABP (als *E. coli*-Lysat) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Um eine unspezifische Bindung von PABP an die Sepharose zu prüfen, wurde es außerdem nur mit Glutathion-Sepharose (Glutathion-S.) inkubiert. PABP wurde mittels Anti-His-Antikörper im Western Blot detektiert. Zur Kontrolle der PABP-Expression wurden 10 % vom Gesamtlisat eingesetzt.

### 3.3.7.3. Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP *in vivo*

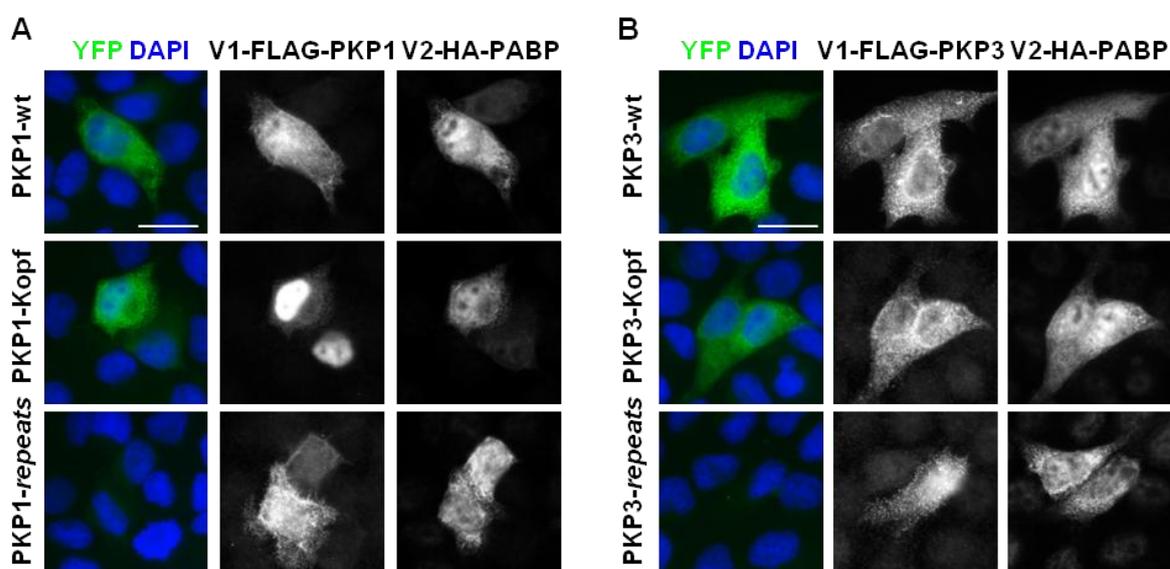
Da die vorangegangenen Ergebnisse und auch die Präzipitationsexperimente (siehe Abschnitt 3.3.2) eine Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 *in vitro* zeigen, wurde anschließend geprüft, ob die Proteine auch *in vivo* in einem Komplex vorliegen können. Dazu wurden BiFC-Analysen sowie der *Proximity Ligation Assay* genutzt.

Für die BiFC-Analysen wurden HeLa-Zellen mit den bereits unter 3.3.3.3 beschriebenen Plakophilin-Konstrukten (pVenus1-FLAG-PKP-wt/Kopf/*repeats*) und pVenus2-HA-PABP transfiziert und anschließend ebenso analysiert.

Die Ergebnisse in Abb. 34 A zeigen, dass sowohl für Plakophilin-1-wt + PABP als auch für Plakophilin-1-Kopf + PABP ein zytoplasmatisches YFP-Signal detektiert werden konnte, was darauf hindeutet, dass die Assoziation zwischen Plakophilin 1 und PABP über die N-

terminale Kopfdomäne von Plakophilin 1 vermittelt wird. Im Gegensatz dazu konnte nach der Expression von Plakophilin-1-*repeats* + PABP kein YFP-Signal in den Zellen nachgewiesen werden, obwohl die Färbungen gegen den FLAG- und HA-*tag* zeigen, dass beide Proteine in der Zelle exprimiert vorlagen.

Auch für Plakophilin-3-wt + PABP sowie für Plakophilin-3-Kopf + PABP konnte ein deutliches, zytoplasmatisches YFP-Signal in den Zellen detektiert werden (siehe Abb. 34 B). Nach Expression der Plakophilin-3-*repeat*-Domäne und PABP wurde jedoch kein YFP-Signal beobachtet, obwohl auch hier die FLAG- und HA-*tag*-Färbungen zeigen, dass beide Proteine in der Zelle exprimiert vorlagen. Dies bedeutet, dass auch die Assoziation von Plakophilin 3 und PABP über die N-terminale Kopfdomäne von Plakophilin 3 vermittelt wird.

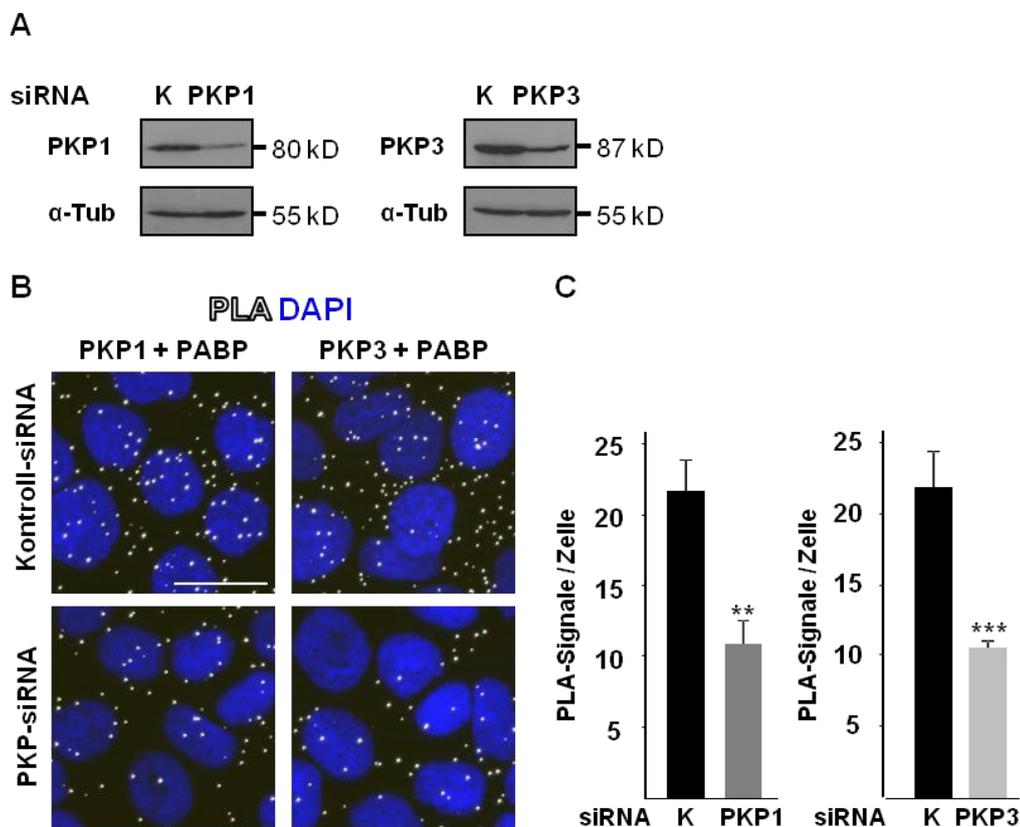


**Abb. 34 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP mittels BiFC.** Plakophilin-1- (A) und Plakophilin-3-Konstrukte (B) wurden als Fusionsproteine mit Venus1-FLAG zusammen mit Venus2-HA-PABP in HeLa-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen den FLAG- und den HA-*tag* gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Das YFP-Signal zeigt die Assoziation der Proteine *in vivo*. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m.

Um die Assoziation der Plakophiline mit PABP auch auf endogener Ebene untersuchen zu können, wurde anschließend ein *Proximity Ligation Assay* durchgeführt. Hierfür wurden HaCaT-Zellen mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Plakophilin 1, Plakophilin 3 und PABP markiert. Anschließend erfolgte die PLA-Reaktion (siehe 2.3.7).

Wie in Abb. 35 B zu erkennen ist, konnten in mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen deutliche PLA-Signale sowohl für Plakophilin 1 + PABP als auch für Plakophilin 3 + PABP nachgewiesen werden. Nach *knockdown* von Plakophilin 1 bzw. Plakophilin 3 (siehe Abb.

35 A) reduzierte sich die Anzahl der Signale pro Zelle auf ca. 50 % des Kontrollniveaus, was die Quantifizierung in Abb. 35 C zeigt.



**Abb. 35 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP mittels PLA.** HaCaT-Zellen wurden mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. **(A)** Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft. **(B, C)** 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Plakophilin 1, Plakophilin 3 oder PABP markiert. Anschließend erfolgten die PLA-Reaktion und die Markierung der DNA mit DAPI. **(B)** Die punktförmigen Signale zeigen die Assoziation der Proteine *in vivo*. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m. **(C)** Die Quantifizierung der PLA-Signale pro Zelle erfolgte anhand der DAPI-Markierung unter Verwendung der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens 350 Zellen. \*\*,  $p \geq 0,005$ ; \*\*\*,  $p \geq 0,0005$ .

Zusammenfassend konnte die Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in fünf unabhängigen Systemen (Immunpräzipitation, Hefe-Dihybrid-Analyse, GST-*pull-down*, BiFC, PLA) nachgewiesen werden. Für Plakophilin 1 deuten sowohl die Hefe-Dihybrid-Analysen als auch die BiFC-Studien darauf hin, dass die Assoziation mit PABP über die N-terminale Kopfdomäne von Plakophilin 1 vermittelt wird. Auch für Plakophilin 3 konnte eine durch die Kopfdomäne vermittelte Assoziation mit PABP detektiert werden, was die BiFC-Studien belegen. Im Hefe-Dihybrid-System allerdings konnte nur ein schwaches Wachstum der Hefezellen nachgewiesen werden, nachdem diese mit der Plakophilin-3-Kopfdomäne und dem C-Terminus von PABP transformiert worden waren.

### 3.3.8. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit eIF3c

Mit Hilfe eines Hefe-Dihybrid-Screenings für die Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Kopfdomäne konnten zwei Untereinheiten des eIF3-Komplexes, eIF3c und eIF3f, als putative Interaktionspartner für Plakophilin 1 und Plakophilin 3 identifiziert und mittels Hefe-Dihybrid-Analyse bestätigt werden (M. Hatzfeld und A. Wolf, persönliche Korrespondenz). Der eIF3-Komplex stellt den größten an der Translation beteiligten Proteinkomplex dar. Er vermittelt u. a. die Bindung der mRNA an den 43S-Präinitiationskomplex, indem er eine Brücke zu eIF4G bildet (DONG Z. und ZHANG J. T. 2006; LEFEBVRE A. K. *et al.* 2006). In Säugetieren besteht der Komplex aus 13 nicht identischen Untereinheiten die von a bis m benannt werden (BROWNING K. S. *et al.* 2001; ZHOU C. *et al.* 2005). eIF3c ist zusammen mit eIF3a, -b, -g und -i in allen Eukaryonten stark konserviert und bildet den funktionellen Kern des eIF3-Komplexes (PHAN L. *et al.* 1998; VALASEK L. S. 2012; ZHOU C. *et al.* 2005), weshalb sich die nachfolgenden Untersuchungen auf diese Untereinheit konzentrierten.

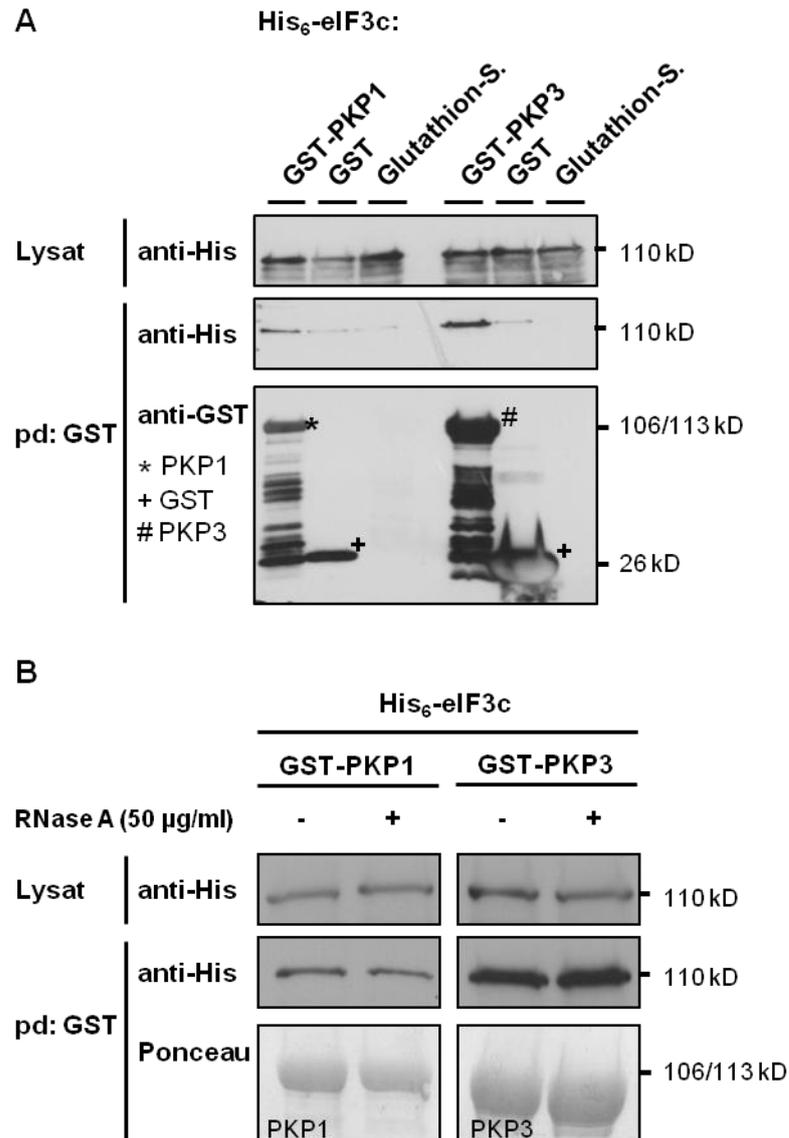
#### 3.3.8.1. Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels GST-pulldown

Um die Assoziation der Plakophiline 1 und 3 mit eIF3c näher zu untersuchen, wurden zunächst GST-pulldown-Analysen, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, angefertigt. Dazu wurden Plakophilin 1 und Plakophilin 3 als Fusionsproteine mit einem GST-tag und eIF3c als Fusionsprotein mit einem His<sub>6</sub>-tag in *E. coli* exprimiert.

Wie in Abb. 36 A zu erkennen ist, präzipitiert deutlich mehr eIF3c zusammen mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 als mit Glutathion-Sepharose bzw. GST, was auf eine Assoziation von eIF3c mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 schließen lässt.

eIF3c ist in der Lage *in vitro* an RNA zu binden (KOUBA T. *et al.* 2012) und auch die Plakophiline könnten auf Grund ihrer positiven Ladung (pI 9,3–10,1) (SCHMIDT A. und JAGER S. 2005) mit den Phosphatgruppen von Nukleinsäuren assoziieren. Um zu prüfen, ob die Assoziation zwischen den Plakophilinen und eIF3c nicht indirekt durch die Bindung an eine gemeinsame RNA vermittelt wird, wurde der GST-pulldown zusätzlich in Gegenwart von RNase A durchgeführt.

Wie in Abb. 36 B zu erkennen ist, präzipitiert eIF3c in gleichem Maße mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 unabhängig von einer Behandlung mit RNase A. Dies zeigt, dass die Assoziation zwischen den Proteinen *in vitro* direkt ist und nicht über die Bindung an eine gemeinsame RNA vermittelt wird.



**Abb. 36 Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels GST-pulldown. (A)** GST-Plakophilin-1, GST-Plakophilin-3 und GST wurden in *E. coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Die Sepharose wurde anschließend mit in *E. coli* exprimiertem His<sub>6</sub>-eIF3c für 1 h inkubiert. eIF3c wurde mittels Anti-His-Antikörper und PKP1, PKP3 und GST mittels Anti-GST-Antikörper im Western Blot detektiert. Um eine unspezifische Bindung von eIF3c an die Sepharose zu prüfen, wurde es außerdem nur mit Glutathion-Sepharose (Glutathion-S.) inkubiert. Zur Kontrolle der eIF3c-Expression wurden 10 % vom Gesamtlysate eingesetzt. **(B)** Um eine RNA-bedingte Assoziation der Plakophiline mit eIF3c zu untersuchen, wurde der GST-pulldown ebenfalls in Gegenwart von 50 µg/ml RNase A durchgeführt.

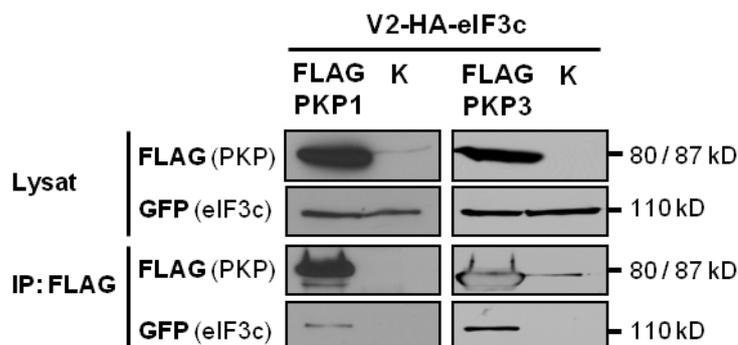
### 3.3.8.2. Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels Immunpräzipitation

In Abschnitt 3.3.8.1 konnte eine direkte Assoziation zwischen Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c gezeigt werden. Um die Assoziation der Proteine *in vitro* mit einem unabhängigen System zu bestätigen wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt.

Zunächst wurden Plakophilin 1 und Plakophilin 3 als Fusionsproteine mit einem FLAG-tag zusammen mit Venus2-HA-eIF3c in HEK-293-Zellen koexprimiert. Der Leervektor wurde als Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit RIPA-Puffer

lysiert und das Zelllysate 1 h mit Anti-FLAG-Agarose inkubiert. Anschließend wurden die Proteinkomplexe mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels Western Blot analysiert.

Wie in Abb. 37 zu erkennen, präzipitiert eIF3c zusammen mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3. Eine unspezifische Bindung von eIF3c an die Agarose konnte nicht detektiert werden.



**Abb. 37 Plakophilin 3 und Plakophilin 1 kopräzipitieren mit eIF3c.** HEK-293-Zellen wurden mit pcDNA3-FLAG-Plakophilin-1, -Plakophilin-3 oder dem Leervektor pcDNA5 (K) und pVenus2-HA-eIF3c transfiziert. Das Zelllysate wurde 24 h nach der Transfektion 1 h mit Anti-FLAG-Agarose inkubiert. Präzipitiertes Protein wurde mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels Western Blot analysiert. eIF3c wurde mit einem Anti-EGFP-Antikörper und die Plakophiline mit einem Anti-FLAG-Antikörper detektiert. Zur Kontrolle der eIF3c- und Plakophilin-Expression wurden 10 % vom Gesamtlysate eingesetzt.

Die *GST-pulldown*- und Immunpräzipitationsexperimente zeigen deutlich, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 *in vitro* einen Komplex mit eIF3c bilden können. Außerdem belegt der *GST-pulldown* in Gegenwart von RNase A, dass die Assoziation der Proteine direkt vermittelt ist und nicht über die Bindung an eine gemeinsame RNA erfolgt.

### 3.3.8.3. Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c *in vivo*

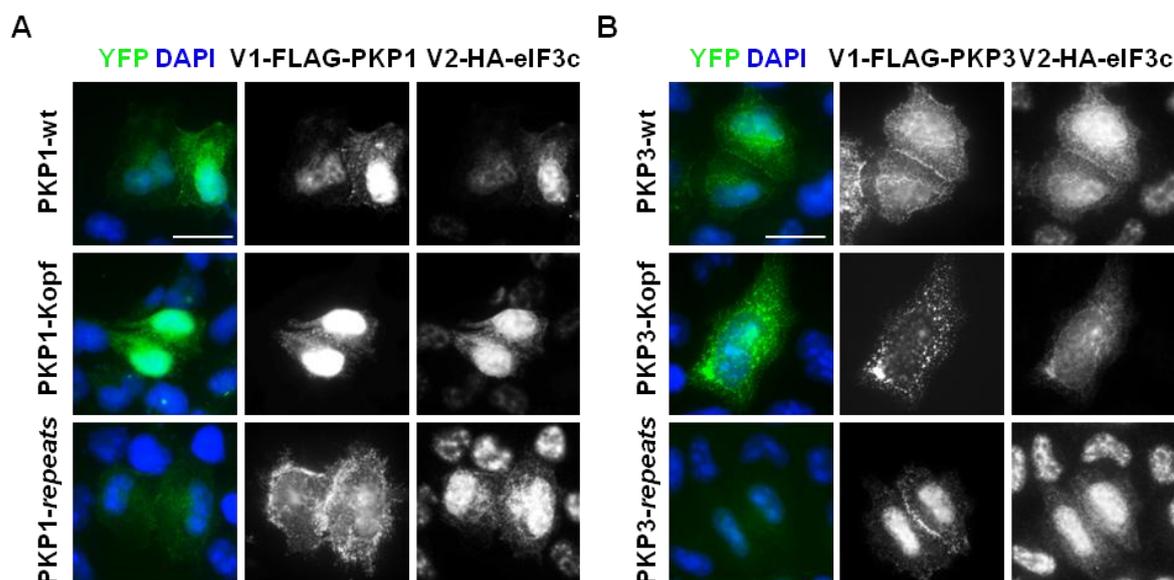
In Abschnitt 3.3.8.1 und 3.3.8.2 konnte eine direkte Assoziation der Plakophiline und eIF3c nachgewiesen werden. Um zu prüfen ob diese Assoziation auch *in vivo* besteht wurden BiFC- und PLA-Analysen durchgeführt.

Für die BiFC-Experimente wurden HeLa-Zellen mit den bereits unter 3.3.3.3 beschriebenen pVenus1-FLAG-Plakophilin-Konstrukten und mit pVenus2-HA-eIF3c transfiziert und anschließend in der beschriebenen Art und Weise analysiert.

Wie in Abb. 38 zu erkennen ist, konnte sowohl für Plakophilin-1-wt als auch für Plakophilin-3-wt + eIF3c, sowie für die Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Kopfdomäne + eIF3c ein zytoplasmatisches YFP-Signal detektiert werden. Für die Plakophilin-1- und die Plakophilin-3-*repeat*-Domäne + eIF3c wurde im Vergleich dazu ein deutlich schwächeres YFP-Signal nachgewiesen. Die Färbungen gegen den FLAG- und den HA-*tag* zeigen aber, dass die Proteine in der Zelle exprimiert vorlagen.

Diese Daten belegen, dass sowohl der Wildtyp als auch die Kopfdomäne von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 *in vivo* einen Komplex mit eIF3c bilden. Zudem zeigen die

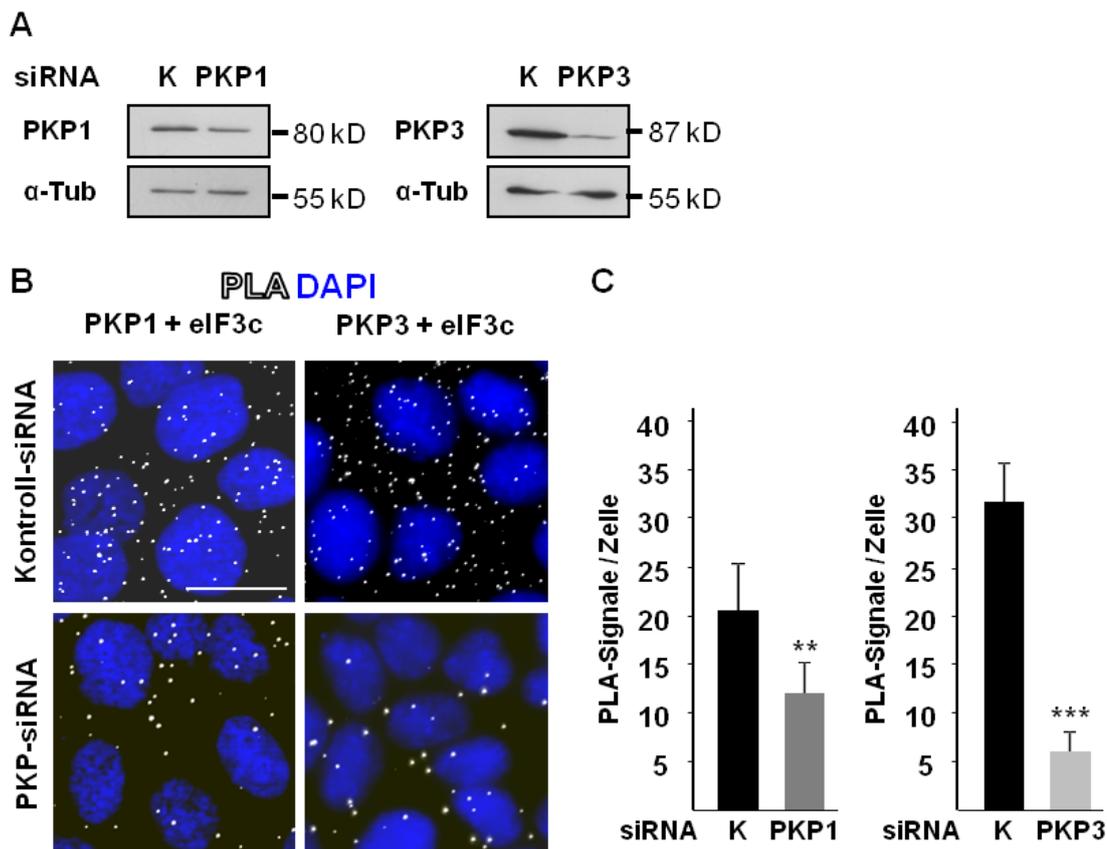
Ergebnisse, dass die Assoziation der Proteine über die N-terminale Kopfdomäne der Plakophiline vermittelt wird, was auch die in der Arbeitsgruppe durchgeführten Interaktionsstudien in Hefe bestätigen (M. Hatzfeld und A. Wolf, persönliche Korrespondenz).



**Abb. 38 Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels BiFC.** HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Plakophilin-1- (A) oder Plakophilin-3-Konstrukten (B) (in pVenus1-FLAG) und mit pVenus2-HA-eIF3c transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen den FLAG- und den HA-tag gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Das YFP-Signal zeigt die Assoziation der Proteine *in vivo*. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Um die Assoziation der Plakophiline mit eIF3c *in vivo* auch auf endogener Ebene zu prüfen, wurde anschließend ein *Proximity Ligation Assay* durchgeführt. Hierfür wurden HaCaT-Zellen mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Formaldehyd fixiert, mit spezifischen Antikörpern gegen Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c markiert und die PLA-Reaktion durchgeführt (siehe 2.3.7). Der erfolgreiche *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft (siehe Abb. 39 A).

Wie in Abb. 39 B zu erkennen, konnten in mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen deutliche PLA-Signale sowohl für Plakophilin 1 + eIF3c als auch für Plakophilin 3 + eIF3c detektiert werden. Der *knockdown* von Plakophilin 1 führte zu einer Reduktion der Signale auf 58 % des Kontrollniveaus, der *knockdown* von Plakophilin 3 sogar zu einer Reduktion der Signale auf 19 % des Kontrollniveaus, was die Quantifizierung der Signale pro Zelle in Abb. 39 C zeigt. Diese Ergebnisse bestätigen damit, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c in einem Komplex *in vivo* vorliegen.



**Abb. 39 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels PLA.** HaCaT-Zellen wurden mit Plakophilin-1-, Plakophilin-3- oder Kontroll-siRNA transfiziert. **(A)** Der *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde mittels Western Blot überprüft. **(B, C)** Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion fixiert, mit Antikörpern gegen Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c markiert und die PLA-Reaktion durchgeführt. **(B)** Die Zellen wurden mikroskopisch analysiert. Die punktförmigen Signale zeigen die Assoziation der Proteine *in vivo*. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m **(C)** Die Quantifizierung der PLA-Signale pro Zelle erfolgte anhand der DAPI-Markierung unter Verwendung der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss, Jena). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens 350 Zellen. \*\*,  $p \geq 0,005$ ; \*\*\*,  $p \geq 0,0005$ .

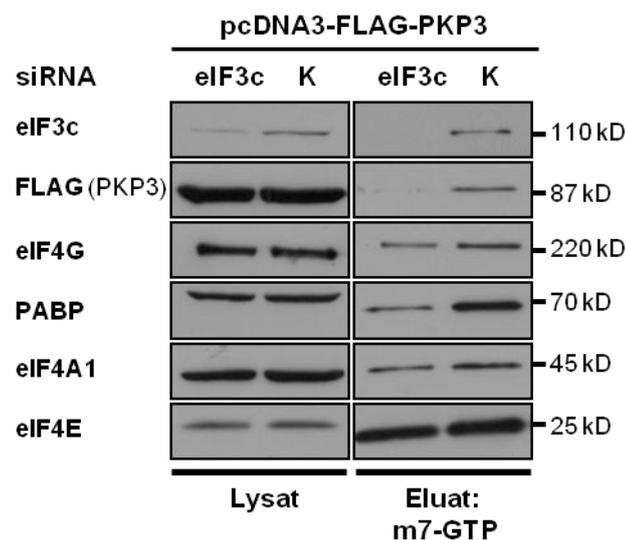
#### 3.3.8.4. Der Einfluss von eIF3c auf die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex

Die vorangegangenen Daten implizieren, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 mit eIF3c *in vitro* und *in vivo* einen Komplex bilden. Zudem konnte für beide Plakophiline eine Assoziation mit den Komponenten des Translationsinitiationskomplexes nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.3.2.). Für Plakophilin 1 ist bereits bekannt, dass es vermehrt durch eIF4A1 in diesen Komplex rekrutiert wird, da der *knockdown* von eIF4A1 in einer verminderten Anlagerung von Plakophilin 1 an den Translationsinitiationskomplex resultiert (WOLF A. *et al.* 2010). Somit stellte sich die Frage wie Plakophilin 3 in diesen Komplex gelangen kann.

Um zu prüfen, ob eIF3c für die Assoziation von Plakophilin 3 mit dem Translationsinitiationskomplex verantwortlich sein könnte, wurden Präzipitationen mit 7-Methyl-GTP-Sepharose durchgeführt. HeLa-Zellen wurden dafür zunächst mit eIF3c- bzw. Kontroll-siRNA und nach 24 h zusätzlich mit pcDNA3-FLAG-Plakophilin-3 transfiziert. Die

Zellen wurden 48 h nach Transfektion der siRNA – 24 h nach Transfektion der DNA – lysiert und anschließend mit 7-Methyl-GTP-Sepharose inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden spezifisch mit 7-Methyl-GTP eluiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Wie in Abb. 40 zu erkennen ist, konnte nach *knockdown* von eIF3c deutlich weniger Plakophilin 3 im Translationsinitiationskomplex detektiert werden als in mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen; die eIF4E-Menge war im Gegensatz dazu nicht beeinflusst. Es fällt jedoch auf, dass auch die Menge anderer Komponenten des Komplexes, wie zum Beispiel eIF4G und eIF4A1, nach *knockdown* von eIF3c verringert ist. Da eIF3c essentiell für die Bildung eines funktionsfähigen eIF3-Komplexes ist (MASUTANI M. *et al.* 2007) könnte der *knockdown* des Proteins den Aufbau eines intakten Initiationskomplexes stören. Dennoch kann festgestellt werden, dass sich das Fehlen von eIF3c am stärksten auf das Vorhandensein von Plakophilin 3 im Komplex auswirkt.



**Abb. 40 Einfluss von eIF3c auf die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex.** HeLa-Zellen wurden mit eIF3c- bzw. Kontroll-siRNA (K) transfiziert. 24 h nach der siRNA-Transfektion erfolgte die Überexpression von FLAG-Plakophilin-3. Die Zellen wurden 48 h nach der siRNA-Transfektion lysiert und eine Präzipitation mit 7-Methyl-GTP-Sepharose durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden mit 7-Methyl-GTP eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der *knockdown* von eIF3c verhindert die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex.

Die Daten aus Abschnitt 3.3.8 belegen mittels dreier unabhängiger Systeme, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c *in vitro* und *in vivo* assoziieren können. Zudem geben die Ergebnisse aus den Präzipitationsstudien mit 7-Methyl-GTP-Sepharose einen Hinweis darauf, dass eIF3c an der Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex beteiligt sein könnte.

### 3.3.9. Die PCI-Domäne von eIF3c ist verantwortlich für die Interaktion mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3

Die in Abschnitt 3.3.8 aufgeführten Daten zeigen, dass sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3 mit eIF3c interagieren und dass die Assoziation der Proteine über die Plakophilin-Kopfdomäne vermittelt wird. Interessanterweise besitzt eIF3c nur eine einzige Proteindomäne, die PCI-Domäne. Proteine mit dieser Domäne sind Bestandteil dreier großer Proteinkomplexe (Proteasom, COP9, Initiationsfaktor 3), daher der Name. Die PCI-Domäne vermittelt Interaktionen im jeweiligen Komplex aber auch mit anderen Proteinen (HOFMANN K. und BUCHER P. 1998; KIM T. *et al.* 2001; PICK E. *et al.* 2009; SCHEEL H. und HOFMANN K. 2005). Es wäre also denkbar, dass die PCI-Domäne auch an der Bindung zu Plakophilin 1 und Plakophilin 3 beteiligt ist.

Um zu prüfen ob die Assoziation zwischen den Plakophilinen und eIF3c über die PCI-Domäne vermittelt wird, wurden zunächst drei eIF3c-Fragmente generiert: ein N-terminales Fragment (eIF3c-NT), welches die PCI-Domäne nicht enthält, ein C-terminales Fragment (eIF3c-CT), welches die PCI-Domäne einschließt, und die PCI-Domäne selbst (eIF3c-PCI). Die Fragmente sind in Abb. 41 schematisch dargestellt.



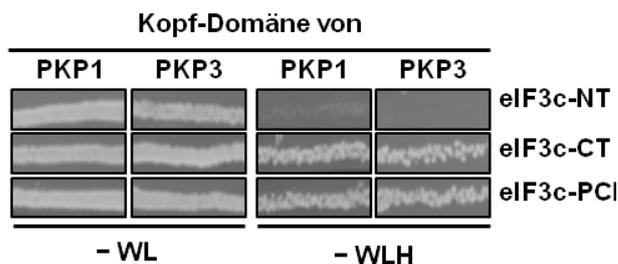
**Abb. 41 Schematische Darstellung der eIF3c-Fragmente.** Der N-Terminus von eIF3c (eIF3c-NT) umfasst die ersten 711 Aminosäuren des Proteins und der C-Terminus (eIF3c-CT) die letzten 201 Aminosäuren einschließlich der PCI-Domäne. Die PCI-Domäne (eIF3c-PCI) selbst beinhaltet die Aminosäuren 712–846.

#### 3.3.9.1. Charakterisierung der Plakophilin-Bindungsstelle in eIF3c mittels Hefe-Dihybrid-System

Da, wie bereits erwähnt, die Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Kopfdomänen als Bindungsstelle für eIF3c identifiziert werden konnten, wurden nur diese genutzt, um die Bindungsstelle im eIF3c mittels Hefe-Dihybrid-Analyse näher zu charakterisieren. YRG2-Zellen wurden dazu mit den bereits unter 3.3.3.1 beschriebenen Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Kopf-Konstrukten (in pBD) und mit den eIF3c-Fragmenten (in pGADT7) transformiert.

Abb. 42 zeigt, dass nach der Expression des N-terminalen eIF3c-Fragments zusammen mit der Plakophilin-1- bzw. der Plakophilin-3-Kopfdomäne kein Wachstum der Hefen auf Reporterplatten (–WLH) zu detektieren war, was darauf schließen lässt, dass der N-Terminus von eIF3c nicht ausreicht um mit den Plakophilinen zu assoziieren. Wurde jedoch die jeweilige Plakophilin-Kopfdomäne mit dem C-Terminus bzw. mit der PCI-Domäne von eIF3c in die Hefe-Zellen transformiert, so konnte ein Wachstum auf den

Reporterplatten verzeichnet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die PCI-Domäne ausreicht um mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 zu assoziieren.



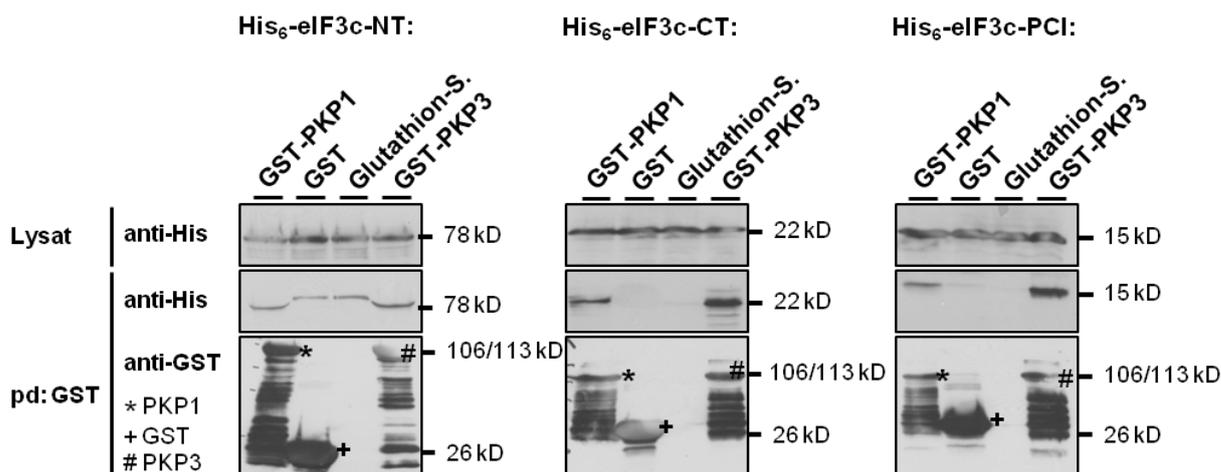
**Abb. 42 Identifizierung der Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Bindungsstelle in eIF3c mittels Hefe-Dihybrid-Analyse.** YRG2-Zellen wurden mit pBD-Plakophilin-1-Kopf bzw. -Plakophilin-3-Kopf und den einzelnen eIF3c-Fragmenten (in pGADT7) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Agar ohne Tryptophan und Leucin (-WL). Der Nachweis der Assoziation erfolgte auf Reporterplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (-WLH).

### 3.3.9.2. Charakterisierung der Plakophilin-Bindungsstelle in eIF3c mittels GST-pulldown und Immunpräzipitation

Um die vorangegangenen Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.9.1 zu überprüfen, wurden anschließend ein GST-pulldown und eine Immunpräzipitation durchgeführt.

Für den GST-pulldown wurden Plakophilin 1 und Plakophilin 3 als Fusionsproteine mit einem GST-tag und die eIF3c-Fragmente als Fusionsproteine mit einem His<sub>6</sub>-tag in *E. coli* exprimiert und der GST-pulldown, wie unter 3.3.3.2 beschrieben, durchgeführt.

Die GST-pulldown-Analysen in Abb. 43 zeigen, dass sowohl das C-terminale eIF3c-Fragment, welches die PCI-Domäne enthält, als auch die PCI-Domäne alleine deutlich mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 kopräzipitieren. Es konnte lediglich eine schwache Bindung an GST bzw. an die Glutathion-Sepharose detektiert werden. Der N-Terminus von eIF3c zeigt keine Assoziation mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3, er bindet an die Plakophiline in gleichem Maße wie auch an GST und Glutathion-Sepharose.

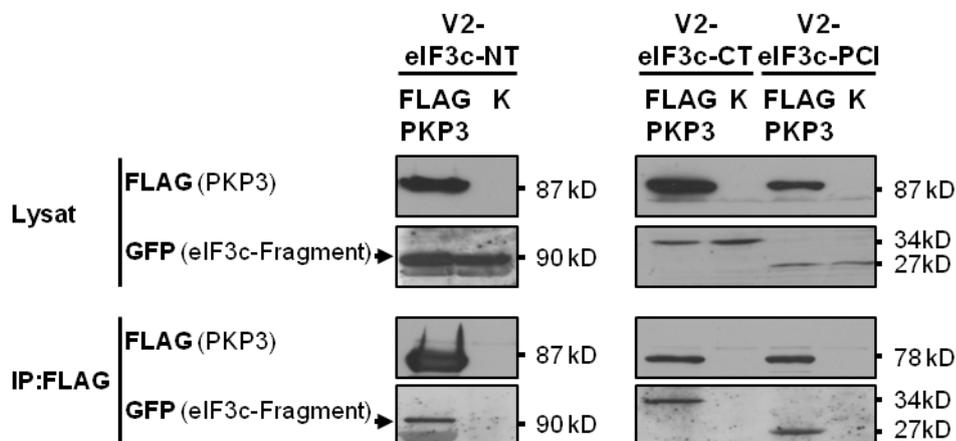


**Abb. 43 Identifizierung der Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Bindungsstelle in eIF3c mittels GST-pulldown.** GST-Plakophilin-1, GST-Plakophilin-3 bzw. GST wurden in *E. coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit His<sub>6</sub>-eIF3c-Fragmenten (als *E. coli*-Lysate). Die gebundenen Proteine wurden mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Um eine unspezifische Bindung der eIF3c-Fragmente an die Sepharose zu prüfen, wurden diese außerdem nur mit Glutathion-Sepharose (Glutathion-S.) inkubiert. Die eIF3c-Fragmente wurden mit einem Anti-His-Antikörper und PKP1, PKP3 sowie GST mit einem Anti-GST-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. 10 % des Gesamtlisates wurden eingesetzt, um die Expression der eIF3c-Fragmente zu prüfen.

Die Ergebnisse aus dem *GST-pulldown* bestätigen somit die vorangegangenen Hefeinteraktionsanalysen und zeigen ebenfalls, dass allein die PCI-Domäne von eIF3c ausreicht, um mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 zu assoziieren.

Für die Immunpräzipitation wurde FLAG-Plakophilin-3 mit den eIF3c-Fragmenten in HEK-293-Zellen koexprimiert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend 1 h mit Anti-FLAG-Agarose inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Um eine unspezifische Bindung der eIF3c-Fragmente an die Agarose auszuschließen, wurde das gleiche Experiment mit Lysaten von HEK-293-Zellen durchgeführt, welche statt mit pcDNA3-FLAG-Plakophilin-3 mit dem Leervektor pcDNA5 transfiziert wurden.

Wie in Abb. 44 zu erkennen, konnten alle drei eIF3c-Fragmente zusammen mit FLAG-Plakophilin-3 kopräzipitiert werden. Eine unspezifische Bindung der eIF3c-Fragmente an die Agarose konnte jedoch nicht beobachtet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass neben dem C-Terminus und der PCI-Domäne auch der N-Terminus von eIF3c in der Lage ist mit Plakophilin 3 zu assoziieren. Da allerdings Zelllysate verwendet wurde, könnte diese Assoziation auch indirekt durch ein eukaryontisches zytoplasmatisches Protein, vielleicht sogar durch endogenes eIF3c selbst, vermittelt worden sein. Die Immunpräzipitation zeigt jedoch, dass die isolierte PCI-Domäne ausreichend ist um mit Plakophilin 3 einen Komplex zu bilden.



**Abb. 44 Die eIF3c-Fragmente kopräzipitieren mit Plakophilin 3.** HEK-293-Zellen wurden mit pcDNA3-FLAG-Plakophilin-3 und den eIF3c-Fragmenten (in pVenus2-HA) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und 1 h mit Anti-FLAG-Agarose inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die eIF3c-Fragmente konnten aufgrund des Venus2-tags mittels Anti-EGFP-Antikörper und Plakophilin 3 aufgrund des FLAG-tags mittels Anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen werden. Lysate von HEK-293-Zellen, transfiziert mit dem Leervektor (pcDNA5, K) und den eIF3c-Konstrukten, wurden eingesetzt, um eine unspezifische Bindung der eIF3c-Fragmente an die Agarose zu prüfen.

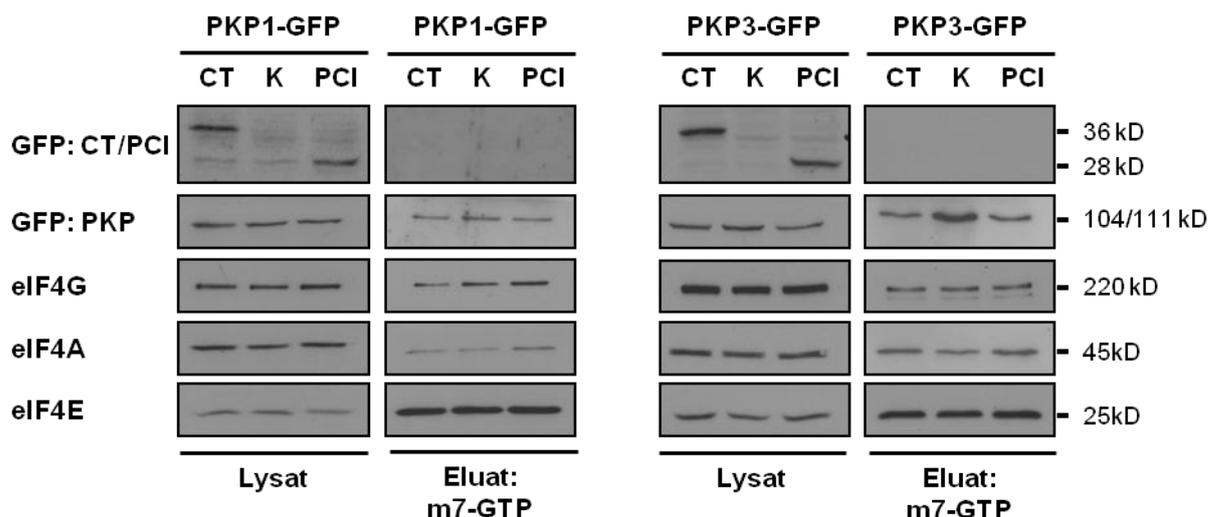
### 3.3.9.3. Die PCI-Domäne von eIF3c rekrutiert Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex

In Abschnitt 3.3.8.4 wurde beschrieben, dass der *knockdown* von eIF3c zu einer verminderten Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex führt. Da die vorangegangenen Experimente zeigen, dass die PCI-Domäne von eIF3c ausreicht um sowohl mit Plakophilin 1 als auch mit Plakophilin 3 einen Komplex zu bilden, wurde anschließend untersucht, welchen Einfluss die Überexpression der PCI-Domäne auf die Rekrutierung von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex hat.

EGFP-Plakophilin-1, EGFP-Plakophilin-3 sowie der C-Terminus bzw. die PCI-Domäne von eIF3c wurden dafür in HEK-293-Zellen koexprimiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und eine Präzipitation mit 7-Methyl-GTP-Sepharose durchgeführt. Um eine Aussage über die Rekrutierung der Plakophile in den Translationsinitiationskomplex unabhängig von der Überexpression der eIF3c-Fragmente treffen zu können, wurden EGFP-Plakophilin-1 und -Plakophilin-3 zusammen mit dem Leervektor transfiziert.

Wie in Abb. 45 zu erkennen ist, konnte die Überexpression des eIF3c-C-Terminus (CT) und der eIF3c-PCI-Domäne (PCI) im Zelllysat, jedoch nicht im Eluat der 7-Methyl-GTP-Sepharose detektiert werden. Die einzelnen eIF3c-Fragmente werden demzufolge nicht in den Translationsinitiationskomplex rekrutiert. Die Abb. 45 zeigt zudem, dass die Überexpression der beiden eIF3c-Fragmente keinen deutlichen Einfluss auf die Rekrutierung von Plakophilin 1 hat, da die Menge an eluiertem Plakophilin 1 sowohl in der Leervektortransfektion (K) als auch nach Überexpression der Fragmente gleich ist. Für Plakophilin 3 ist jedoch ein deutlicher Effekt nach Überexpression der eIF3c-Fragmente zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrolle (K) wird nach Überexpression des eIF3c-C-Terminus und der eIF3c-PCI-Domäne deutlich weniger Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex transportiert. Die Analyse anderer Initiationsfaktoren (eIF4G, eIF4A und eIF4E) zeigte zudem, dass dieser Effekt spezifisch für Plakophilin 3 ist, da deren Rekrutierung durch die Überexpression von eIF3c nicht beeinflusst wurde. Dies könnte bedeuten, dass die Überexpression der PCI-Domäne zu einer Komplexbildung mit Plakophilin 3 führt und damit dessen Anlagerung an den Translationsinitiationskomplex verhindert. In der Zelle könnte somit die PCI-Domäne von eIF3c für die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex verantwortlich sein.

Zusammenfassend zeigen die Daten aus drei unabhängigen Systemen, dass die PCI-Domäne alleine ausreichend ist um mit den Plakophilinen *in vitro* zu assoziieren. Zudem legen die Daten die Vermutung nahe, dass die PCI-Domäne von eIF3c für die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex verantwortlich ist.



**Abb. 45 Einfluss der PCI-Domäne auf die Rekrutierung von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex.** HEK-293-Zellen wurden mit pEGFP-Plakophilin-1, pEGFP-Plakophilin-3, pVenus2-eIF3c-CT (CT) bzw. pVenus2-HA-eIF3c-PCI (PCI) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit *cap*-Lysepuffer lysiert und eine Präzipitation mit 7-Methyl-GTP-Sepharose durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden mit 7-Methyl-GTP eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Um die Rekrutierung der Plakophiline unabhängig von der Expression der eIF3c-Fragmente untersuchen zu können, wurden diese zusammen mit dem Leervektor (pVenus2-HA) transfiziert (Kontrolle, K). Die Expression der Plakophiline sowie der eIF3c-Fragmente wurde unter Verwendung eines Anti-EGFP-Antikörpers analysiert. Die Überexpression des eIF3c-C-Terminus bzw. der eIF3c-PCI-Domäne vermindert die Rekrutierung von Plakophilin 3 (rechts), aber nicht die Rekrutierung von Plakophilin 1 (links), in den Translationsinitiationskomplex.

### 3.3.10. Zusammenfassung der Interaktionsstudien

Die nachfolgende Tabelle fasst die Interaktionsstudien aus den Abschnitten 3.3.3 - 3.3.9 in einer Übersicht zusammen.

**Tab. 13 Zusammenfassung der Interaktionsstudien.** Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Interaktionsstudien aus den Abschnitten 3.3.3 - 3.3.9. Positive Interaktionen sind mit '+', keine mit '-' gekennzeichnet. In Klammern ist die für die Interaktion verantwortliche Domäne von Plakophilin 1 bzw. Plakophilin 3 angegeben, sofern diese zugeordnet werden konnte. Die Interaktionsstudien zur Interaktion von Plakophilin 1 und eIF4A1 finden sich in WOLF A. *et al.* 2010. Die Hefe-Dihybrid-Studien zur Interaktion von Plakophilin 1/3 und eIF3c wurden von M. Hatzfeld und A. Wolf durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

	eIF4E		eIF4G		eIF4A1	
	PKP1	PKP3	PKP1	PKP3	PKP1	PKP3
<b>Hefe-Dihybrid-System</b>	+	-	+	-	+	-
<b>GST-pulldown</b>	+	+	+	+	+	+
<b>BiFC</b>	+	+	+	+	+	+
	(Kopf)		(Kopf)	(Kopf)	(Kopf)	(Kopf, repeats)
<b>PLA</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Immunpräzipitation</b>	+	+	+	+	+	nicht untersucht

	eIF4B		PABP		eIF3c	
	PKP1	PKP3	PKP1	PKP3	PKP1	PKP3
<b>Hefe-Dihybrid-System</b>	+	+	+	+	+	+
	(Kopf)	(repeats)	(Kopf)	(Kopf, aber schwach)	(Kopf)	(Kopf)
<b>GST-pulldown</b>	+	+	+	+	+	+
<b>BiFC</b>	+	+	+	+	+	+
	(Kopf)	(Kopf)	(Kopf)	(Kopf)	(Kopf)	(Kopf)
<b>PLA</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Immunpräzipitation</b>	+	+	+	+	+	+

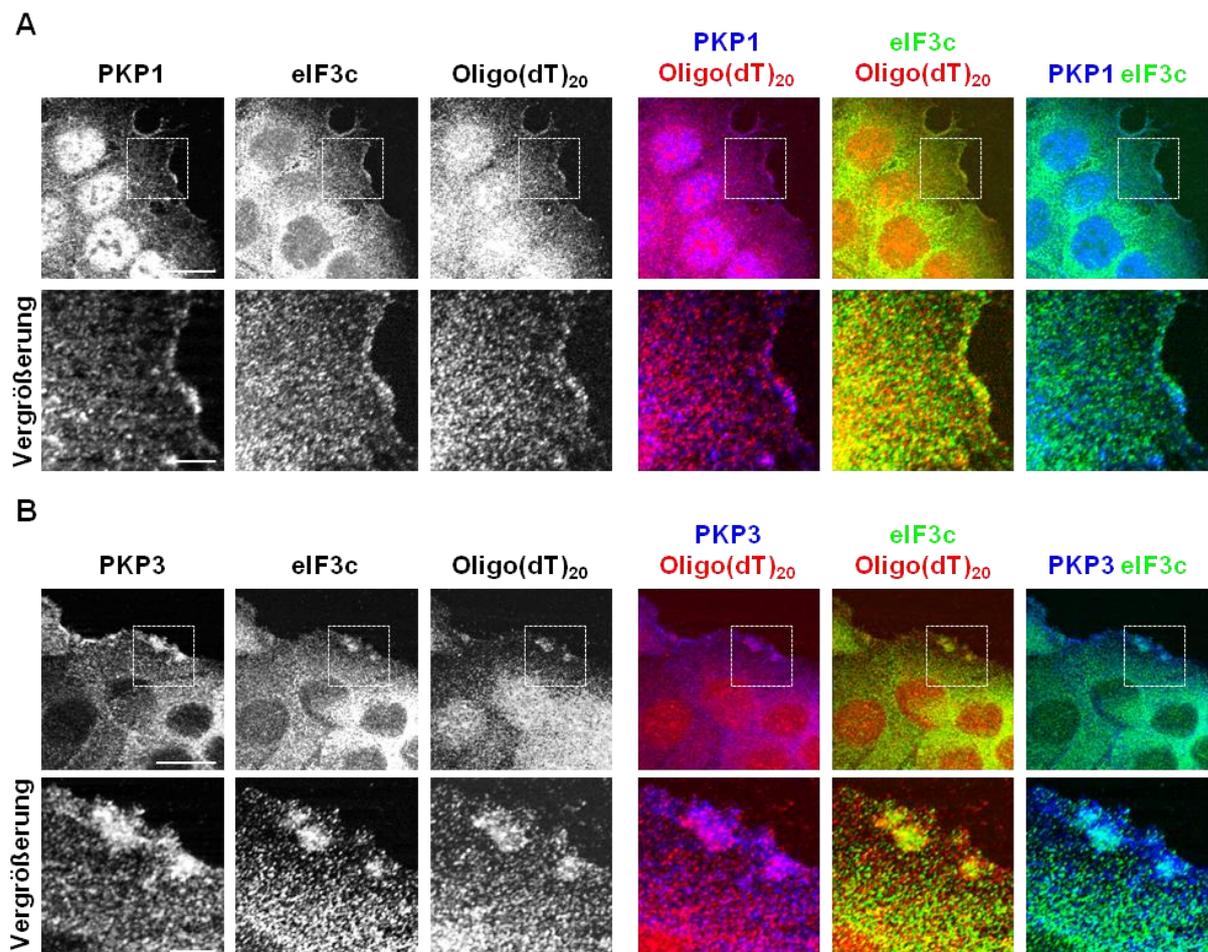
### 3.3.11. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 kolokalisieren mit mRNA

Die Daten aus den vorangegangenen Abschnitten zeigen deutlich, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit verschiedenen Initiationsfaktoren assoziieren können. In Voruntersuchungen zur Lokalisation von Plakophilin 3 fiel außerdem auf, dass das Protein nach Induktion einer Wunde verstärkt an den Wundgrenzflächen sowie an Zellausläufern mit eIF3c kolokalisiert. Da an Wundgrenzen ein erhöhter Proteinbedarf besteht, um die Wunde schließen zu können, muss die Translation und auch die Proliferation der Zellen in diesen Bereichen lokal stimuliert werden (MARTIN P. 1997). Im Rahmen dieser Arbeit und in vorangegangenen Studien (WOLF A. *et al.* 2010) konnte gezeigt werden, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 die Translation aber auch die Proliferation stimulieren können. Die verstärkte Lokalisation der Proteine an der Wundgrenzfläche ließ somit vermuten, dass die Plakophiline auch eine Funktion in der lokalen Translation erfüllen könnten.

Um zu prüfen, ob Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c an Wundgrenzflächen mit Poly(A)-mRNA kolokalisieren können und um damit weitere Hinweise über eine mögliche Funktion in der lokalen Translation zu erhalten, wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. HaCaT-Zellen wurden dazu auf Deckgläschen eingesät. Nach 48 h wurde eine 200- $\mu$ l-Pipettenspitze durch den konfluenten Zellrasen gezogen, um eine Wunde zu simulieren. Die Zellen wurden 6 h nach Wundinduktion mit Formaldehyd fixiert, mit Antikörpern gegen Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c markiert und eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit einer Cy3-Oligo(dT)<sub>20</sub>-Sonde durchgeführt. Die Lokalisationsanalyse der einzelnen Proteine sowie der Poly(A)-mRNA erfolgte mikroskopisch.

Wie in Abb. 46 deutlich zu erkennen ist, konnte eine verstärkte Lokalisation von Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c an den Zellgrenzen nachgewiesen werden. In diesen Bereichen konnte auch eine deutliche Kolokalisation mit Poly(A)-mRNA detektiert werden.

Die Ergebnisse unterstützen damit die Vermutung, dass beide Plakophiline eine Funktion in der lokalen Translation ausüben.



**Abb. 46 Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c kolokalisieren mit Poly(A)-mRNA.** HaCaT-Zellen wurden 6 h nach Induktion einer Wunde mit Formaldehyd fixiert und dann mit Antikörpern gegen Plakophilin 1 (**A**), Plakophilin 3 (**B**) und eIF3c markiert. Anschließend erfolgte zur Detektion von Poly(A)-mRNA eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung unter Verwendung einer Cy3-Oligo(dT)<sub>20</sub>-Sonde. Der Maßstab entspricht 20 µm und in den Vergrößerungen 5 µm.

### 3.4. Einfluss von Plakophilin 1 auf die Regulation bestimmter Ziel-mRNAs

Die vorangegangenen Daten belegen, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit einer Vielzahl von Initiationsfaktoren assoziieren und dadurch die globale Proteinsynthese und die eIF4E-abhängige (*cap*-abhängige) Translation stimulieren können. Darüber hinaus resultiert der *knockdown* der Proteine in einer verminderten Zellproliferation und Zellgröße ohne jedoch die Vitalität der Zellen zu beeinflussen. Zahlreiche Studien zeigten außerdem, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in bestimmten Tumoren verstärkt exprimiert werden (FURUKAWA C. *et al.* 2005; SANCHEZ-PALENCIA A. *et al.* 2011; VILLARET D. B. *et al.* 2000), wodurch sich die Migrationsfähigkeit und Invasivität der Zellen erhöht (FURUKAWA C. *et al.* 2005). Ähnliche Effekte konnten auch für eIF4E nachgewiesen werden. Eine verstärkte Expression von eIF4E in Tumoren begünstigt die Zellproliferation sowie die Translation bestimmter mRNAs, die für das Überleben der Zelle, das Zellwachstum aber auch für die Angiogenese verantwortlich sind (DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004;

MAMANE Y. *et al.* 2007). Mit Hilfe einer Microarray-Analyse sollte daher untersucht werden, ob auch die Plakophiline die Translation bestimmter mRNAs selektiv regulieren können. Da Plakophilin 1 *in vivo* einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Translation hat als Plakophilin 3 (WOLF A. *et al.* 2010), wurde für diese Analyse Plakophilin 1 verwendet.

Um den Plakophilin-1-spezifischen Einfluss besser untersuchen zu können, wurde eine Maus-Keratinocyten-Zelllinie eingesetzt, da diese im Vergleich mit humanen Keratinocyten einen sehr hohen Plakophilin-1- und einen niedrigen Plakophilin-3-Level aufweist. Die Maus-Keratinocyten wurden mit Plakophilin-1- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert, 48 h nach der Transfektion lysiert, eine Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.4.13) durchgeführt und der Einfluss des Plakophilin-1-*knockdowns* auf die Translation bestimmter mRNAs untersucht. Auf Grund der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der Partikel im Dichtegradienten konnten die Lysate so in eine monosomale, freie RNPs<sup>6</sup> und die 40S-, 60S- und 80S-Fractionen umfassende, und eine polysomale Fraktion aufgetrennt werden, die translationsaktive Ribosomen enthält. Somit konnte der Einfluss des Plakophilin-1-*knockdowns* auf translationsaktive mRNAs (polysomale mRNAs) und -inaktive mRNAs (monosomale mRNAs) untersucht werden. Die RNA der beiden Fraktionen wurde isoliert und zur Durchführung der Microarray-Analyse an die ‚Core Unit DNA-Technologien‘ der Universität Leipzig (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung, Medizinische Fakultät Leipzig, Arbeitsgruppe PD Dr. Knut Krohn) versendet. Die Microarray-Analyse wurde als Doppelbestimmung angefertigt und folgende RNA-Konzentrationen wurden eingesetzt: PKP1<sub>knockdown</sub>-Probe1-MS<sup>7</sup>: 368 ng/μl; PKP1<sub>knockdown</sub>-Probe1-PS<sup>8</sup>: 101 ng/μl; PKP1<sub>knockdown</sub>-Probe2-MS: 367 ng/μl; PKP1<sub>knockdown</sub>-Probe2-PS: 107 ng/μl; Kontrolle-Probe1-MS: 381 ng/μl; Kontrolle-Probe1-PS: 114 ng/μl; Kontrolle-Probe2-MS: 381 ng/μl; Kontrolle-Probe2-PS: 118 ng/μl.

Die Auswertung der Microarray-Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit und nach Anleitung von Prof. Dr. Hüttelmaier (Martin-Luther-Universität Halle, Institut für Molekulare Medizin). Um zu untersuchen, ob Plakophilin 1 die Translation bestimmter mRNAs begünstigt, wurde zunächst die relative Polysomenassoziation bestimmt. Zusätzlich dazu wurde der Gesamt-mRNA-Level<sup>9</sup> zwischen der Plakophilin 1<sub>knockdown</sub>- und der Kontroll-Probe verglichen. Für die Berechnung der genannten Werte wurde dabei der Mittelwert der Doppelbestimmung verwendet.

---

<sup>6</sup> RNPs – Abkürzung für Ribonukleoproteine

<sup>7</sup> MS – monosomale Fraktion

<sup>8</sup> PS – polysomale Fraktion

<sup>9</sup> Der Gesamt-RNA-Level bezeichnet hier die Summe der RNAs die in Monosomen, Polysomen und freien RNPs vorliegen; andere mRNAs, wie zum Beispiel nukleäre mRNAs, werden nicht berücksichtigt.

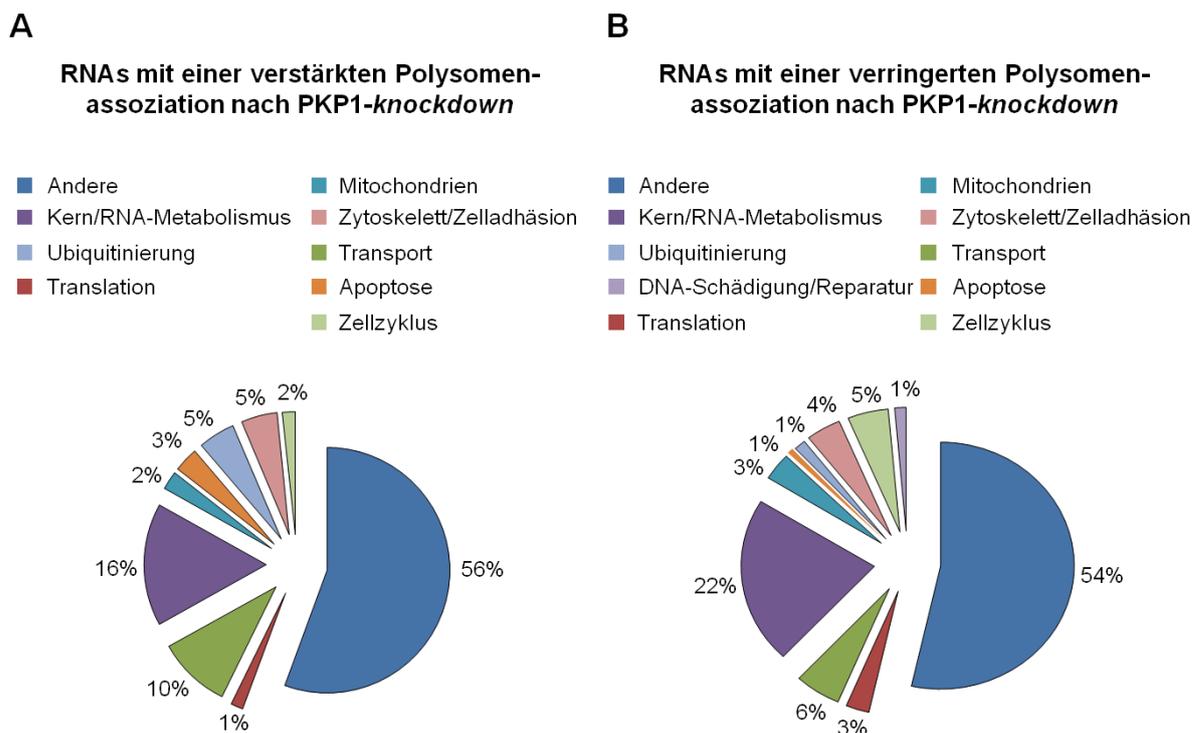
### 3.4.1. Der Einfluss von Plakophilin 1 auf die Polysomenassoziation von Ziel-mRNAs

Um den Einfluss von Plakophilin 1 auf die Polysomenassoziation zu analysieren, wurde zunächst für jede untersuchte RNA das Verhältnis (PS/MS) aus der Signalintensität der Polysomenfraktion (PS) zur Signalintensität der Monosomenfraktion (MS) bestimmt (VYAS K. *et al.* 2009) und dies sowohl für die Kontroll-Probe (K), als auch nach *knockdown* von Plakophilin 1 (PKP1<sub>knockdown</sub>). Die relative Polysomenassoziation einer RNA wurde anschließend als Verhältnis zwischen Plakophilin 1<sub>knockdown</sub>- und Kontroll-Probe wie folgt berechnet:

$$\text{relative Polysomenassoziation} = \frac{\left(\frac{PS}{MS}\right)_{PKP1_{knockdown}}}{\left(\frac{PS}{MS}\right)_K}$$

Entsprechend bedeutet hier ein Wert größer 1, dass nach *knockdown* von Plakophilin 1 die entsprechende RNA im Vergleich zur Kontrolle von der monosomalen in die polysomale Fraktion verschoben und damit vermehrt translatiert wird. Ein Wert kleiner 1 entsprechend, dass die RNA nach *knockdown* von Plakophilin 1 im Vergleich zur Kontrolle von der polysomalen in die monosomale Fraktion verschoben wird und damit schwächer translatiert wird.

Bei der Auswertung wurden nur Ergebnisse berücksichtigt, deren Vertrauenswert (TS; Berechnung siehe 7.8)  $\geq 2$  war und bei denen sich eine Veränderung um mindestens das 1,33-Fache nach *knockdown* von Plakophilin 1 im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Von den 25697 untersuchten mRNAs, wiesen 17974 einen TS von  $\leq 1,5$ ; 1240 einen TS von 2 und 6483 einen TS von  $> 2$  auf. Dabei war die relative Polysomenassoziation der untersuchten mRNAs mit einem TS  $\geq 2$  nach *knockdown* von Plakophilin 1 bei 142 mRNAs mindestens 1,33-fach vermindert (siehe Tab. 25, Anhang) und bei 124 mRNAs mindestens 1,33-fach erhöht (siehe Tab. 26, Anhang). Die Proteine, für die die identifizierten RNAs kodieren, erfüllen verschiedenste Funktionen in der Zelle; unter anderem im RNA-Metabolismus und in der Translation (siehe Abb. 47).



**Abb. 47 RNAs mit einer veränderten relativen Polysomenassoziation nach Plakophilin-1-knockdown, zusammengefasst nach der Funktion der kodierten Proteine.** Maus-Keratinocyten wurden mit Plakophilin-1- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung in eine polysomale und monosomale Fraktion. Die RNA beider Fraktionen wurde isoliert und eine Microarray-Analyse durchgeführt. Die Polysomenassoziation der einzelnen RNAs der Kontroll- und Plakophilin-1<sub>knockdown</sub>-Probe wurde verglichen. Dabei konnten **(A)** 124 RNAs identifiziert werden, deren relative Polysomenassoziation mindestens 1,33-fach erhöht war und **(B)** 142 RNAs, deren relative Polysomenassoziation nach Plakophilin-1-knockdown mindestens 1,33-fach verringert war. Die Einteilung der mRNAs in die jeweilige Kategorie erfolgte nach der Funktion der kodierten Proteine, welche mit Hilfe der Datenbank ‚Universal Protein Resource‘ (Uniprot; <http://www.uniprot.org/>) ermittelt wurde (BAIROCH A. *et al.* 2005).

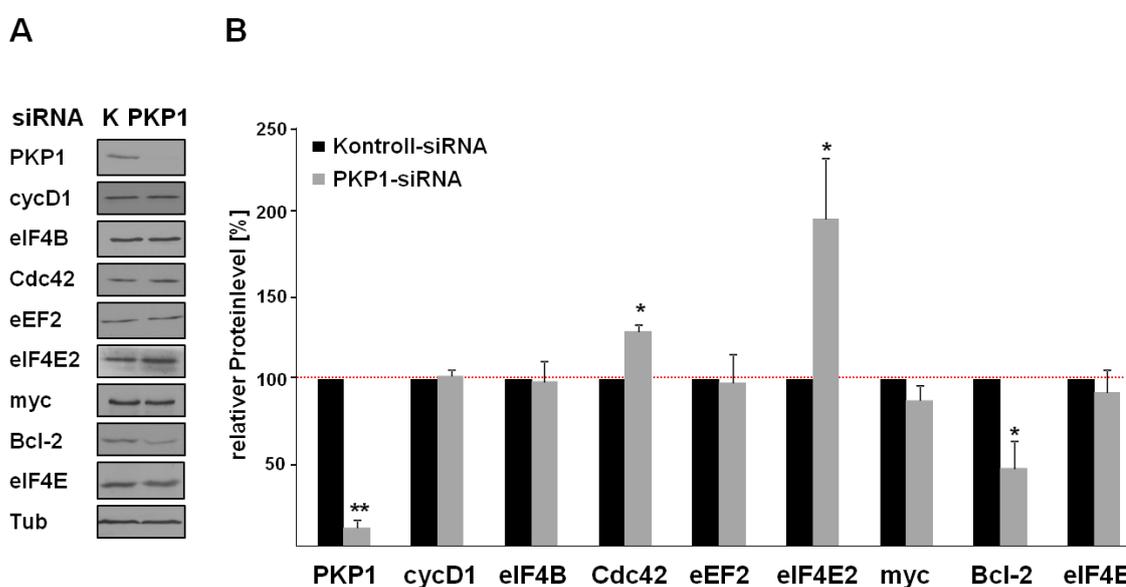
### 3.4.2. Der Einfluss von Plakophilin 1 auf die Proteinexpression ausgesuchter Zielgene

Die vorangegangenen Daten zeigen, dass der *knockdown* von Plakophilin 1 die Polysomenassoziation bestimmter mRNAs beeinflussen könnte. Eine veränderte Polysomenassoziation sollte in einer veränderten Translationseffizienz und damit in einem veränderten Proteinlevel resultieren.

Um zu prüfen ob der *knockdown* von Plakophilin 1 einen Einfluss auf den Proteinlevel und damit auf die Translationseffizienz bestimmter mRNAs hat, wurden Maus-Keratinocyten mit Plakophilin-1- und Kontroll-siRNA transfiziert, 72 h nach der Transfektion mit SDS-Puffer (siehe 2.4.1) lysiert und der Proteinlevel mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zur Quantifizierung der Proteinlevel wurden diese auf die Gesamtproteinmenge, welches mittels Ponceau-Färbung bestimmt wurde, abgeglichen. Für die Analyse wurden fünf Proteine ausgewählt, deren kodierende RNAs eine verminderte Polysomenassoziation (CyclinD1, eIF4B, Cdc42, eEF2 und eIF4E2) im Microarray zeigten und deren Funktion mit bereits

bekannten Funktionen von Plakophilin 1 (zum Beispiel in der Translation oder beim Aufbau des Zytoskeletts) korrelierte. Zusätzlich dazu wurden Proteine untersucht, deren kodierende RNAs keine veränderte Polysomenassoziation im Microarray aufwiesen (eIF4E, myc, Bcl-2), die jedoch klassische eIF4E-Zielproteine darstellen (DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004).

Wie in Abb. 48 zu erkennen, konnte nach *knockdown* von Plakophilin 1, im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, kein veränderter Proteinlevel für CyclinD1, eIF4B, eIF4E, eEF2 und myc nachgewiesen werden. Allerdings konnte für Bcl-2 eine signifikante Verringerung und für Cdc42 und eIF4E2 eine signifikante Erhöhung auf Proteinebene detektiert werden.

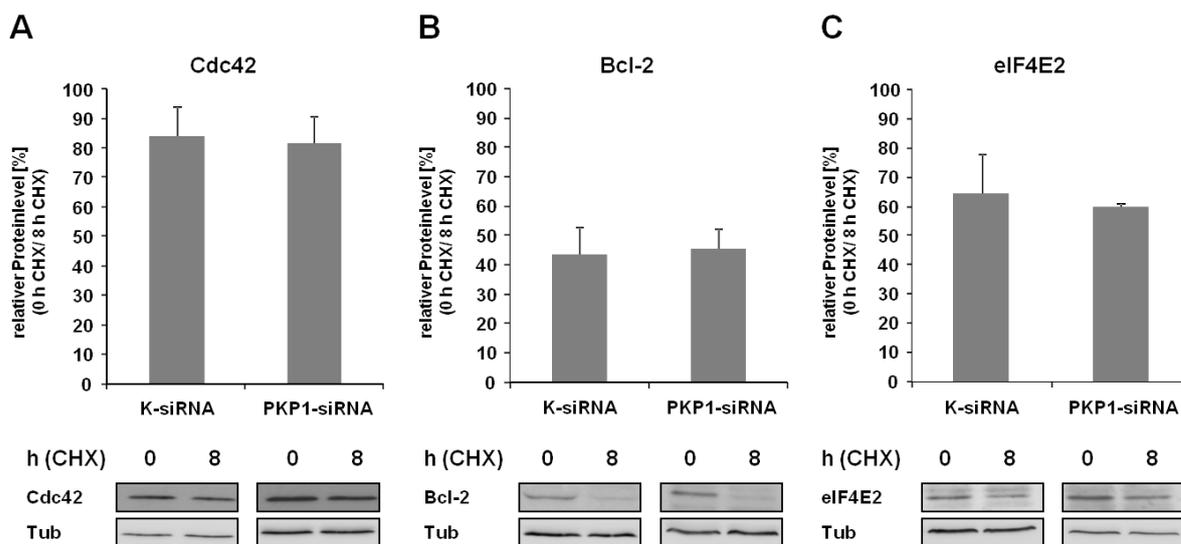


**Abb. 48 Einfluss von Plakophilin 1 auf den Proteinlevel ausgesuchter Zielgene.** Maus-Keratinocyten wurden mit Plakophilin-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen in SDS-Puffer lysiert und Gesamtproteinextrakte hergestellt. Die Analyse der Proteinlevel erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. **(A)** Analyse der Proteinlevel mittels Western Blot. **(B)** Zur Quantifizierung wurden die jeweiligen Proteinlevel auf die Gesamtproteinmenge abgeglichen, welche mittels Ponceau-Färbung ermittelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100 % festgesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. \*\*,  $p \geq 0,005$ ; \*,  $p \geq 0,05$ .

Die erhöhte Proteinexpression von Cdc42 und eIF4E2 könnte zum einen aus einer verstärkten Transkriptions- bzw. Translationseffizienz resultieren und zum anderen aus einer erhöhten RNA- bzw. Proteininstabilität. Die verringerte Expression von Bcl-2 demzufolge aus einer verminderten Transkriptions- bzw. Translationseffizienz oder RNA- bzw. Proteininstabilität. Um zu prüfen, ob die Stabilität der Proteine nach *knockdown* von Plakophilin 1 beeinflusst ist, wurden Maus-Keratinocyten erneut mit Plakophilin-1- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde ein Teil der Zellen für 8 h in Gegenwart von 50  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid kultiviert und anschließend lysiert. Da Cycloheximid die Translation hemmt, indem es u. a. die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen blockiert, kann durch diese Behandlung eine Aussage über die Stabilität des bereits

exprimierten Proteins getroffen werden. Zur Quantifizierung wurden daher die Proteinmengen der mit Cycloheximid behandelten Zellen mit den Proteinmengen un behandelter Zellen verglichen.

Wie Abb. 49 zeigt, konnten nach *knockdown* von Plakophilin 1, im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, keine Unterschiede in der Proteinstabilität von Cdc42, Bcl-2 und eIF4E2 detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass Plakophilin 1 keinen Einfluss auf die Stabilität von Cdc42, Bcl-2 und eIF4E2 hat.



**Abb. 49 Der Einfluss von Plakophilin 1 auf die Proteinstabilität von Cdc42, Bcl-2 und eIF4E2.** Maus-Keratozyten wurden mit Plakophilin-1- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde ein Teil der Zellen für 8 h in Gegenwart von 50 µg/ml Cycloheximid (CHX) kultiviert, anschließend lysiert und die Proteinlevel mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zur Quantifizierung wurden die Proteinmenge von **(A)** Cdc42, **(B)** Bcl-2 und **(C)** eIF4E2 in CHX-behandelten Zellen relativ zur Proteinmenge in un behandelten Zellen bestimmt. Die Western Blots zeigen die Proteinlevel in Abhängigkeit der Behandlung mit CHX und der jeweiligen siRNA. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass der *knockdown* von Plakophilin 1, im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, in einem erhöhten Proteinlevel von Cdc42 und eIF4E2 und in einem verminderten Proteinlevel von Bcl-2 resultiert. Die weitere Analyse ergab, dass die Proteinstabilität von Cdc42, Bcl-2 und eIF4E2 durch den *knockdown* von Plakophilin 1 nicht beeinflusst wurde, und somit die Regulation hier auf Ebene der Translation, der Transkription bzw. der RNA-Stabilität erfolgen muss.

### 3.4.3. Einfluss von Plakophilin 1 auf den relativen Gesamt-mRNA-Level ausgesuchter Ziel-mRNAs

Um Informationen über den Einfluss von Plakophilin 1 auf den relativen Gesamt-mRNA-Level<sup>10</sup> zu erhalten, wurde für jede untersuchte RNA zunächst die Summe aus Signalintensität der monosomalen (MS) und der polysomalen Fraktion (PS) gebildet:

$$\text{Gesamt-mRNA-Level} = PS + MS$$

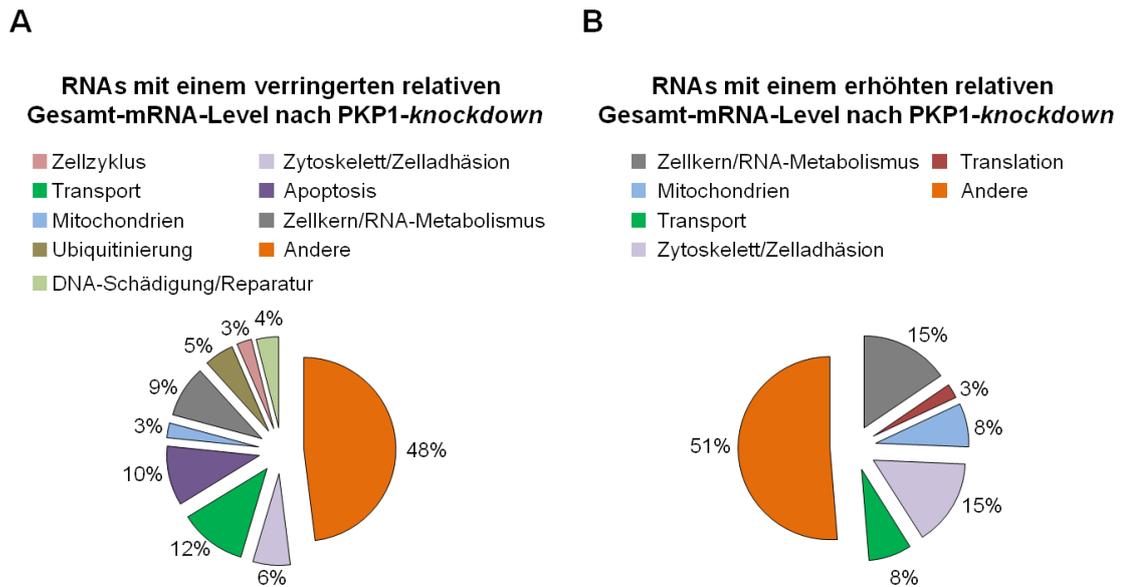
und dies sowohl für die Kontrolle (K), als auch nach Plakophilin-1-*knockdown* (PKP1<sub>knockdown</sub>). Der relative Gesamt-mRNA-Level<sup>10</sup> nach *knockdown* von Plakophilin 1 im Vergleich zur Kontrolle berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{relativer Gesamt-mRNA-Level} = \frac{(PS + MS)_{PKP1_{knockdown}}}{(PS + MS)_K}$$

Dementsprechend bedeutet ein Wert größer 1, dass der relative Gesamt-mRNA-Level<sup>10</sup> nach Plakophilin-1-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist, ein Wert kleiner 1, dass er vermindert ist.

Bei der Auswertung der Microarray-Analyse wurden erneut nur die Ergebnisse berücksichtigt, deren Vertrauenswert (TS; Berechnung siehe 7.8)  $\geq 2$  war und bei denen sich eine Veränderung um mindestens das 1,5-Fache nach *knockdown* von Plakophilin 1 im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Von 25697 untersuchten mRNAs, wiesen 17884 mRNAs einen TS  $\leq 1,5$ ; 1062 mRNAs einen TS von 2 und 6751 mRNAs einen Vertrauenswert  $> 2$  auf. Dabei war der relative Gesamt-mRNA-Level<sup>10</sup> der untersuchten mRNAs nach *knockdown* von Plakophilin 1, im Vergleich zur Kontrolle, bei 77 RNAs mindestens 1,5-fach vermindert (siehe Tab. 27, Anhang) und bei 39 RNAs mindestens 1,5-fach erhöht (siehe Tab. 28, Anhang). Diese mRNAs wiesen alle einen TS von  $\geq 2,5$  auf. Die Proteine, für die die identifizierten RNAs kodieren, erfüllen ebenfalls unterschiedliche Funktionen in der Zelle (siehe Abb. 50).

<sup>10</sup> Der Gesamt-RNA-Level bezeichnet hier die Summe der RNAs die in Monosomen, Polysomen und freien RNPs vorliegen; andere mRNAs, wie zum Beispiel nukleäre mRNAs, werden nicht berücksichtigt.



**Abb. 50 RNAs mit einem veränderten relativen Gesamt-mRNA-Level nach Plakophilin-1-knockdown, zusammengefasst nach der Funktion der kodierten Proteine.** Maus-Keratinocyten wurden mit Plakophilin-1- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Anschließend erfolgte die Aufteilung in eine polysomale und eine monosomale Fraktion. Die RNA beider Fraktionen wurde isoliert und eine Microarray-Analyse durchgeführt. Der relative Gesamt-mRNA-Level zwischen Kontroll- und Plakophilin-1<sub>knockdown</sub>-Probe wurde bestimmt. Dabei konnten **(A)** 77 RNAs identifiziert werden, deren relativer Gesamt-mRNA-Level nach Plakophilin-1-knockdown mindestens 1,5-fach verringert war und **(B)** 39 RNAs, deren relativer Gesamt-mRNA-Level mindestens 1,5-fach erhöht war. Die Einteilung der mRNAs in die jeweilige Kategorie erfolgte nach der Funktion der kodierten Proteine, welche mit Hilfe der Datenbank ‚Universal Protein Resource‘ (Uniprot; <http://www.uniprot.org/>) ermittelt wurde (BAIROCH A. *et al.* 2005).

### 3.4.3.1. Plakophilin 1 reguliert den Gesamt-mRNA-Level ausgesuchter Ziel-mRNAs

Zur Validierung der Microarray-Analysen wurden zunächst vier RNAs, welche einen verringerten relativen Gesamt-mRNA-Level und drei RNAs, welche einen erhöhten relativen Gesamt-mRNA-Level nach Plakophilin-1-knockdown im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigten, ausgewählt (siehe Tab. 14). Dabei wurden jene RNAs analysiert, welche zum einen mehrere ‚Treffer‘ im Microarray erzielten bzw. RNAs, deren relativer mRNA-Level besonders stark erhöht bzw. vermindert war.

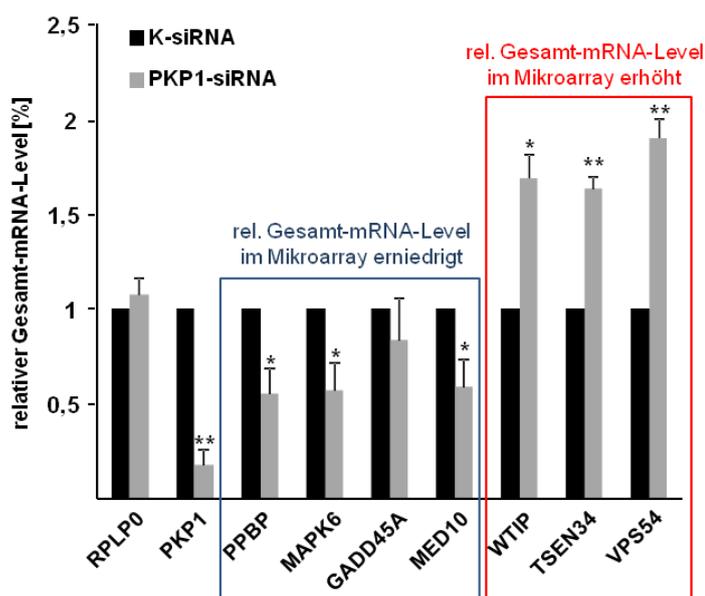
**Tab. 14 Auswahl an mRNAs, deren relativer mRNA-Level nach Plakophilin-1-knockdown im Vergleich zur Kontrolle in der Microarray-Analyse beeinflusst war und deren mRNA-Level mittels qRT-PCR genauer untersucht wurde.**

PROBE_ID	SYMBOL	Relativer Gesamt-mRNA-Level (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	Funktion
ILMN_1228102	PPBP	0,39437659	Immunantwort
ILMN_2908435	PPBP	0,420013798	
ILMN_2681776	MAPK6	0,43785233	Apoptose
ILMN_3147112	MAPK6	0,477371567	
ILMN_2879382	MED10	0,562350972	Transkription
ILMN_2947568	GADD45A	0,588175219	Zellzyklus, DNA-Reparatur
ILMN_2742152	GADD45A	0,606318536	

PROBE_ID	SYMBOL	Relativer Gesamt-mRNA-Level (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	Funktion
ILMN_2451470	VPS54	2,015173277	Proteintransport
ILMN_2424268	WTIP	2,061622778	Transkription
ILMN_2628175	TSEN34	3,350464047	mRNA- und tRNA- Prozessierung

Um die Ergebnisse der Microarray-Analyse zu überprüfen, wurden Maus-Keratinocyten erneut mit Plakophilin-1- und Kontroll-siRNA transfiziert. Die RNA der Zellen wurde 48 h nach der Transfektion mit TRIzol isoliert und der Gesamt-mRNA-Level der ausgewählten RNAs mittels qRT-PCR bestimmt.

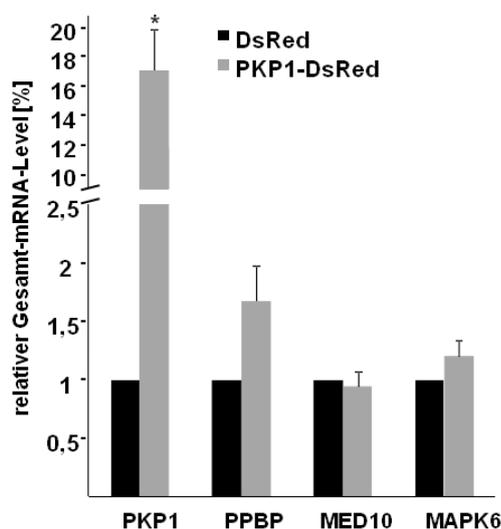
Wie die Auswertung der qRT-PCR-Daten in Abb. 51 zeigt, konnte nach *knockdown* von Plakophilin 1, im Vergleich mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, ein verringerter Gesamt-mRNA-Level für die PPBP-, die MAPK6- und die MED10-RNA detektiert werden. Der Gesamt-mRNA-Level der WTIP-, der TSEN34- und der VPS54-RNA war im Gegensatz dazu deutlich erhöht. Damit konnten die Resultate der Microarray-Analyse für sechs von sieben geprüften RNAs bestätigt werden. Lediglich für die GADD45A-RNA konnte keine signifikante Reduktion nachgewiesen werden.



**Abb. 51 Analyse der Gesamt-mRNA-Level ausgewählter RNAs nach Plakophilin-1-knockdown.** Maus-Keratinocyten wurden mit Plakophilin-1- und Kontroll-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die RNA isoliert und der Gesamt-mRNA-Level ausgewählter RNAs mittels qRT-PCR bestimmt. Die gemessenen RNA-Level wurden auf den  $\beta$ -Aktin-RNA-Level normalisiert und die Kontrolle (Kontroll-siRNA) wurde auf 100 % gesetzt. Der RNA-Level von RPLP0 wurde als zusätzliche Referenz gemessen. Der blaue Rahmen umfasst RNAs, deren Gesamt-mRNA-Level im Microarray nach Plakophilin-1-knockdown vermindert war, der rote Rahmen umfasst RNAs, deren Gesamt-mRNA-Level im Microarray erhöht war. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. \*,  $p \geq 0,05$ ; \*\*,  $p \geq 0,005$ .

Um nun zu prüfen, ob eine erhöhte Expression von Plakophilin 1 einen gegenteiligen Effekt auf den Gesamt-mRNA-Level der analysierten RNAs hat, wurde Plakophilin 1 in Maus-Keratinocyten überexprimiert. 24 h nach der Transfektion wurde die RNA mittels

TRizol isoliert und die RNA-Menge durch eine qRT-PCR quantifiziert. Die Auswertung der qRT-PCR-Daten ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle (Transfektion des Leervektors) und der Überexpression von Plakophilin 1 (nicht gezeigt). Da die Maus-Keratinocyten im Vergleich mit anderen Zellen einen sehr hohen endogenen Plakophilin-1-Level aufweisen (M. Hatzfeld, persönliche Korrespondenz), wäre es denkbar, dass die Überexpression des Proteins zu keiner weiteren Stimulation in der Zelle führt. Daher wurde der Versuch anschließend in HaCaT-Zellen wiederholt, welche im Vergleich zu Maus-Keratinocyten weniger endogenes Plakophilin 1 exprimieren. Die HaCaT-Zellen wurden mit pDsRed-Plakophilin-1 oder pDsRed transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Analyse beschränkte sich dabei auf jene RNAs, deren Gesamt-mRNA-Level nach Plakophilin-1-*knockdown* vermindert war. Wie in Abb. 52 zu erkennen ist, konnte nach Überexpression von Plakophilin 1 im Vergleich zur Kontrolle ein leicht erhöhter PPBP- und MAPK6-mRNA-Level detektiert werden.



**Abb. 52 Analyse der Gesamt-mRNA-Level ausgewählter RNAs nach Plakophilin-1-Überexpression.** HaCaT-Zellen wurden mit pDsRed-Plakophilin-1 bzw. pDsRed transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die RNA der Zellen mittels TRizol isoliert und der Gesamt-mRNA-Level ausgewählter RNAs mittels qRT-PCR quantifiziert. Die gemessenen RNA-Level wurden auf den  $\beta$ -Aktin-RNA-Level normalisiert und die Kontrolle (pDsRed) wurde auf 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. \*,  $p \geq 0,05$ .

Zusammenfassend konnten mittels Microarray-Analyse 77 RNAs mit einem absolut verringerten und 39 RNAs mit einem absolut erhöhten relativen Gesamt-mRNA-Level (Plakophilin 1 *knockdown* vs. Kontrolle) identifiziert werden. Zusätzliche Versuche in Maus-Keratinocyten bestätigten für sechs von sieben untersuchten RNAs die im Microarray gemessenen Effekte. Im Gegensatz dazu zeigen die Experimente in Maus-Keratinocyten und HaCaT-Zellen, dass die Überexpression von Plakophilin 1, die Gesamt-mRNA-Menge der untersuchten RNAs nur moderat beeinflusst. Plakophilin 1 könnte demzufolge an der Regulation der Transkription dieser mRNAs beteiligt sein bzw. deren Stabilität beeinflussen.

## 4. Diskussion

Dieser Arbeit gingen Studien voran, welche belegen, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 nicht nur essentiell für die Zell-Zell-Adhäsion sind, sondern auch die *cap*-abhängige Translation stimulieren können. Plakophilin 1 interagiert dabei mit eIF4A1, stimuliert dessen ATPase-Aktivität und fördert die Rekrutierung des Proteins in den Translationsinitiationskomplex (WOLF A. *et al.* 2010). Obwohl auch Plakophilin 3 mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (PABP, FXR1 und G3BP) kopräzipitiert werden konnte (HOFMANN I. *et al.* 2006), blieb die genaue Funktion des Proteins im RNA-Metabolismus bisher weitestgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Plakophilin 3 auf die Translationsinitiation genauer untersucht, die Interaktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit Komponenten des Translationsinitiationskomplexes analysiert und somit die Funktion der Plakophiline in diesem Komplex genauer charakterisiert.

### 4.1. Die Funktion der Plakophiline in der Translation

Erste Hinweise, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 an der Translationsinitiation beteiligt sein könnten, lieferten Hofmann und Kollegen. Sie identifizierten sowohl Plakophilin 1 als auch Plakophilin 3, nicht jedoch Plakophilin 2, als Bestandteile von inaktiven Translationsinitiationskomplexen, sog. *stress granules*. Zusätzlich dazu konnten sie eine Assoziation von Plakophilin 3 mit den RNA-bindenden Proteinen PABP, FXR1 und G3BP nachweisen (HOFMANN I. *et al.* 2006). Um den Einfluss von Plakophilin 3 auf die Translationsinitiation genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit *In-vitro*-Translationsstudien durchgeführt. Es zeigte sich, dass Plakophilin 3 nicht nur die *cap*-abhängige, sondern auch die *cap*-unabhängige, EMCV-IRES-vermittelte, Translationsinitiation konzentrationsabhängig stimulieren kann, wohingegen die durch die HCV- oder CrPV-IRES vermittelte Translationsinitiation nicht beeinflusst war (siehe Abb. 7, S. 47). Die EMCV-IRES-vermittelte Translation benötigt alle klassischen Initiationsfaktoren, außer eIF4E (PESTOVA T. V. *et al.* 1996a; PESTOVA T. V. *et al.* 1996b). Im Gegensatz dazu kann sich der 43S-PIC bei der HCV-IRES-vermittelten Translation direkt an die IRES-Struktur anlagern, so dass eIF4B und der eIF4F-Komplex nicht benötigt werden (PESTOVA T. V. *et al.* 1998). Die Translationsinitiation über die CrPV-IRES erfolgt ohne die klassischen Initiationsfaktoren, da die 40S-Untereinheit des Ribosoms direkt an die IRES-Struktur binden kann (JAN E. und SARNOW P. 2002; WILSON J. E. *et al.* 2000b). Die Ergebnisse der *In-vitro*-Translationsstudien deuten somit darauf hin, dass Plakophilin 3 eIF4A1, eIF4B und/oder eIF4G für die Stimulation der Initiation der Translation benötigt. Auch Plakophilin 1 stimuliert die *cap*- und EMCV-abhängige Translation (WOLF A. *et al.* 2010). Vergleicht man jedoch die hier vorliegenden Daten, mit denen von Wolf und Kollegen genauer, so können Unterschiede

in Bezug auf die eingesetzte Menge an Plakophilin und den daraus resultierenden Einfluss auf die Translation festgestellt werden. Unter Einsatz von 0,2 µg Plakophilin 1 konnten Wolf und Kollegen eine 7-fache Stimulation der *cap*-abhängigen Translation und eine 11-fache Stimulation der EMCV-anhängigen Translation erzielen (WOLF A. *et al.* 2010), wohingegen die gleiche Menge an Plakophilin 3, die *cap*-abhängige Translation nur um das 1,1-Fache und die EMCV-abhängige Translation nur um das 1,5-Fache aktivieren kann (siehe Abb. 7, S. 47). Diese Daten würden dafür sprechen, dass Plakophilin 1 die Translation *in vitro* deutlich stärker stimulieren kann als Plakophilin 3. Um aber experimentell begründete Unterschiede, z. B. resultierend aus der eingesetzten RNA-Konzentration oder der Proteinpräparation, auszuschließen, wurde das Experiment zwischenzeitlich von Dr. A. Wolf unter gleichen Bedingungen für Plakophilin 1 und Plakophilin 3 parallel durchgeführt. Es zeigte sich, dass beide Plakophiline sowohl die *cap*- als auch die EMCV-abhängige Translation *in vitro* in gleichem Maße stimulieren können (A. Wolf, persönliche Korrespondenz).

Vergleicht man den Einfluss von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 auf die globale Proteinsynthese und die *cap*-abhängige Translation *in vivo* (WOLF A. *et al.* 2010), so können hier Unterschiede festgestellt werden. Die Überexpression von Plakophilin 1 in HEK-293-Zellen steigert die globale Proteinsynthese um circa 35 % (A. Wolf, persönliche Korrespondenz), die Überexpression von Plakophilin 3 steigert diese nur um circa 14 % (siehe Abb. 5, S. 45). Zudem zeigten Untersuchungen mit einem Luciferase-Reportersystem, dass Plakophilin 1 die Luciferaseaktivität um das 2,1-Fache erhöhen kann, Plakophilin 3 dagegen nur um das 1,4-Fache (WOLF A. *et al.* 2010). Generell können also beide Plakophiline sowohl die *cap*-abhängige als auch die EMCV-abhängige Translation regulieren, wobei Plakophilin 1 *in vivo* jedoch einen stärkeren Einfluss als Plakophilin 3 zu haben scheint. Eine mögliche Ursache dafür könnten aber auch unterschiedliche Ausgangslevel der beiden Plakophiline *in vivo* sein. Die für diese Experimente verwendeten HEK-293-Zellen exprimieren unter normalen Bedingungen Plakophilin 3 aber kein Plakophilin 1. Die zusätzliche Überexpression von Plakophilin 3 könnte daher einen geringeren Effekt hervorrufen als die Expression von Plakophilin 1.

Sowohl die *cap*- als auch die EMCV-IRES-abhängige Translation erfordern die Rekrutierung von eIF4G und dessen hochaffine Bindung zu eIF4A1 (JACKSON R. J. *et al.* 2010). Im Falle der *cap*-abhängigen Translationsinitiation fungiert eIF4G als Gerüstprotein und bewirkt, durch die gleichzeitige Bindung von eIF4E und PABP, dass die mRNA eine zirkuläre Struktur einnimmt (WELLS S. E. *et al.* 1998), wodurch die Bindung von PABP an den Poly(A)-Schwanz (LE H. *et al.* 1997) und die Affinität des eIF4F-Komplexes zur *cap*-Struktur (WEI C. C. *et al.* 1998) erhöht wird. Darüber hinaus fördert die PABP-eIF4G-Interaktion die Helikase-Aktivität des eIF4F-Komplexes (BI X. und GOSS D. J. 2000) und

damit die Entwindung von Sekundärstrukturen. Im Falle der EMCV-IRES-vermittelten Translation steigert die Bindung von eIF4G an eIF4A1 zum einen die Affinität von eIF4G zur IRES und induziert zum anderen Strukturveränderungen, welche die Anlagerung des Ribosoms an die IRES ermöglichen (KOLUPAEVA V. G. *et al.* 2003; LOMAKIN I. B. *et al.* 2000). Da Plakophilin 3 die *cap*- und EMCV-IRES-abhängige Translation stimulieren kann, stellte sich die Frage, ob es selbst auch eine Komponente des *cap*-mRNA-Bindekomplexes darstellt. Mit Hilfe von 7-Methyl-GTP-Sepharose konnte Plakophilin 3 zusammen mit eIF4E, eIF4G, PABP und eIF4B präzipitiert und somit als Bestandteil des *cap*-mRNA-Bindekomplexes identifiziert werden (siehe Abb. 12, S. 52). Um die Spezifität dieser Assoziation besser beurteilen zu können, wurde auch das Vorhandensein von p0071, eines verwandten Armadillo-Proteins, im *cap*-mRNA-Bindekomplex geprüft. In Übereinstimmung mit der bekannten Funktion von p0071 in der Zytokinese (KEIL R. *et al.* 2007; WOLF A. *et al.* 2006), konnte das Protein sehr gut im Zellysats detektiert, aber nicht mit 7-Methyl-GTP-Sepharose präzipitiert werden (siehe Abb. 12, S. 52). Immunpräzipitationsexperimente (siehe Abb. 13, S. 53) bestätigten darüber hinaus, dass nicht nur Plakophilin 1 (WOLF A. *et al.* 2010) sondern auch Plakophilin 3 spezifisch mit eIF4E, eIF4G, PABP und eIF4B assoziieren kann. Es wäre also denkbar, dass die Plakophiline die Translation stimulieren, indem sie die Anlagerung von Initiationsfaktoren an die *cap*- bzw. IRES-Struktur stimulieren und/oder die Interaktion zwischen den Initiationsfaktoren als Gerüstproteine stabilisieren.

Für eine verstärkte Rekrutierung von Initiationsfaktoren sprechen unter anderem die Daten von Wolf und Kollegen, die belegen, dass Plakophilin 1 mit eIF4A1 interagieren und dessen Rekrutierung zum Translationsinitiationskomplex fördern kann (WOLF A. *et al.* 2010). Eine Interaktion zwischen Plakophilin 3 und eIF4A1 konnte von Wolf und Kollegen nicht nachgewiesen (WOLF A. *et al.* 2010), jedoch in einem, in dieser Arbeit durchgeführten, Hefe-Dihybrid-Screening identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.2). Die Interaktion mit dem identifizierten Klon (eIF4A1-c214) konnte aber in den nachfolgenden Hefe-Dihybrid-Analysen nicht bestätigt werden (siehe Abb. 23, S. 64). Diese Diskrepanz lässt sich nur methodisch erklären und ist wahrscheinlich auf eine falsch positive Interaktion im Screening zurückzuführen. Zum Beispiel wurden im Screening und in den Interaktionsanalysen die gleichen Hefestämme (AH109 und Y187) verwendet, allerdings entstammten die Y187-Zellen des Screenings der von Clontech zur Verfügung gestellten humanen cDNA-Bibliothek und die Zellen der Hefe-Dihybrid-Analyse dem Bestand des Labors. Die verwendeten AH109-Zellen waren identisch.

Die durchgeführten GST-*pull-down*-Analysen (siehe Abb. 24, S. 65) zeigen eine Assoziation zwischen Plakophilin 3 und eIF4A1, dennoch kann keine eindeutige Aussage zu dieser Assoziation getroffen werden. Denn zum einen ist die Assoziation im GST-*pull-down* sehr schwach und zum anderen konnte mit Hilfe der BiFC-Analyse eine Assoziation mit allen

drei Plakophilin-3-Konstrukten (WT, Kopf, *repeats*) nachgewiesen werden (siehe Abb. 25, S. 66). Dies ist sehr ungewöhnlich, denn in allen anderen, in dieser Arbeit durchgeführten, BiFC-Studien, zeigte die *repeat*-Domäne keine Assoziation mit dem jeweiligen Interaktionspartner. Desweiteren sprechen auch die Daten von Wolf und Kollegen gegen die Assoziation der Proteine (WOLF A. *et al.* 2010). Während Plakophilin 1 die ATPase-Aktivität von eIF4A1 entscheidend stimulieren kann, ist Plakophilin 3 dazu nicht in der Lage (WOLF A. *et al.* 2010).

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 nicht direkt, sondern indirekt über ein gemeinsames Bindeprotein bzw. durch die Bindung an eine gemeinsame RNA erfolgen könnte. Es wäre daher ratsam, den GST-*pull-down* mit gereinigten Proteinen und in Gegenwart von RNase durchzuführen. Ein gemeinsames Bindeprotein könnte eIF4B sein, da es sowohl mit Plakophilin 1 als auch mit Plakophilin 3 kopräzipitiert werden konnte und als Kofaktor entscheidend zur Aktivität von eIF4A1 beiträgt (OZES A. R. *et al.* 2011; ROGERS G. W., JR. *et al.* 2001; ROZEN F. *et al.* 1990).

Die Ergebnisse der BiFC-Analyse (siehe Abb. 29, S. 69) zeigen, dass die Assoziation der Plakophiline mit eIF4B spezifisch über die N-terminale Kopfdomäne der Plakophiline vermittelt wird. Die Daten der Hefe-Dihybrid-Analyse (siehe Abb. 27, S. 68), weisen darauf hin, dass der N-Terminus von eIF4B mit der Plakophilin-1-Kopf- und mit der Plakophilin-3-*repeat*-Domäne interagieren kann. Obwohl die Hefe-Dihybrid- und BiFC-Daten für Plakophilin 1 und eIF4B übereinstimmen, zeigen sich dabei Unterschiede für Plakophilin 3. Bei der Hefe-Dihybrid-Analyse kann es zum Auftreten falsch positiver bzw. falsch negativer Resultate kommen, da die Interaktion im Kern der Hefen stattfinden muss und das Kernmilieu die Struktur- und Oberflächeneigenschaften der Proteine beeinflussen kann. Zum besseren Verständnis wäre es daher lohnenswert die Interaktionsstelle mit weiteren Untersuchungen genauer zu charakterisieren. Da aber eine Vielzahl bereits bekannter Interaktionen von Plakophilin 3 über die Kopfdomäne vermittelt werden (BONNE S. *et al.* 2003) sprechen die vorliegenden Daten eher für eine durch die Kopfdomäne vermittelte Interaktion. Es wäre also denkbar, dass Plakophilin 3 nicht direkt, sondern indirekt über eIF4B, mit eIF4A1 interagiert und sich somit der Regulationsmechanismus von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in der Translation unterscheidet.

Um diese Hypothese zu prüfen und um zu untersuchen, ob die Plakophiline möglicherweise als Gerüstproteine fungieren könnten, wurde die Interaktion der Plakophiline mit weiteren Translationsinitiationsfaktoren untersucht, die neben eIF4A1 und eIF4B im Wesentlichen am Aufbau eines funktionsfähigen *cap*-mRNA-Bindekomplexes beteiligt sind: eIF4E, eIF4G, und PABP.

Essentiell für die Regulation der *cap*-abhängigen Translation ist die Anlagerung von eIF4E an die *cap*-Struktur, wodurch die Bindung des Gerüstproteins eIF4G und der RNA-Helikase eIF4A1 ermöglicht und der Aufbau eines aktiven eIF4F-Komplexes gefördert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass beide Plakophiline auch mit eIF4E einen Komplex in der Zelle bilden können, wobei die Interaktion für beide Plakophiline unterschiedlich zu sein scheint. Während für Plakophilin 1 mittels BiFC- (siehe Abb. 16, S. 57) und Hefe-Dihybrid-Analyse (siehe Abb. 14, S. 55) eine, über die Kopfdomäne vermittelte, Interaktion mit eIF4E nachgewiesen werden konnte, zeigen die gleichen Analysen, dass nur Plakophilin-3-Wildtyp mit eIF4E interagieren kann, die einzelnen Fragmente von Plakophilin 3 zeigen keine Interaktion mit dem Protein, so dass sich auch hier der Regulationsmechanismus von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 unterscheiden könnte. eIF4E stellt einen limitierenden Faktor bei der Translation dar und kann die Translation bestimmter mRNAs selektiv regulieren (Übersicht in DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004; MAMANE Y. *et al.* 2007). Dabei fördert eIF4E zum einen den Export bestimmter RNAs (zum Beispiel cyclinD1-mRNA) aus dem Zellkern, indem es an ein eIF4E-sensitives Element (eIF4E-SE) im 3'-UTR bindet (CULJKOVIC B. *et al.* 2006; CULJKOVIC B. *et al.* 2005; ROUSSEAU D. *et al.* 1996), zum anderen stimuliert es im Zytoplasma die Translation von mRNAs, die über einen stark strukturierten, GC-reichen 5'-UTR verfügen (zum Beispiel VEGF-mRNA, *vascular endothelial cell growth factor*) (KEVIL C. G. *et al.* 1996; MAMANE Y. *et al.* 2004). Es wäre daher denkbar, dass die Plakophiline als zytoplasmatische Gerüstproteine die Assoziation von eIF4E mit eIF4G und eIF4A1 stabilisieren, indem sie, ähnlich wie eIF4G, um eine Bindung an eIF4E mit eIF4E-BPs konkurrieren und somit zum Aufbau eines funktionsfähigen eIF4F-Komplexes beitragen. Da in den BiFC-Studien neben dem zytoplasmatischen auch ein nukleäres YFP-Signal zwischen Plakophilin-1-wt + eIF4E und zwischen Plakophilin-1-Kopf + eIF4E detektiert werden konnte (siehe Abb. 16, S. 57), könnte Plakophilin 1 aber auch am Export bzw. an der Bindung nukleärer mRNAs beteiligt sein. Die Lokalisation von Plakophilin 1 im Zellkern wird dabei spezifisch durch die Kopfdomäne von Plakophilin 1 vermittelt (HATZFELD M. *et al.* 2000; KOWALCZYK A. P. *et al.* 1999). Obwohl bekannt ist, dass Plakophilin 1 mit einzelsträngiger DNA im Zellkern assoziieren kann (SOBOLIK-DELMARE T. *et al.* 2010), ist die Funktion des Proteins in diesem Zellkompartiment bis heute weitestgehend unverstanden. Plakophilin 3 wurde im Gegensatz zu Plakophilin 1 nicht prominent im Zellkern nachgewiesen sondern ausschließlich im Zytoplasma und in Desmosomen. Die unterschiedliche Lokalisation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 könnte demzufolge auch die Unterschiede in der Bindung zu eIF4E erklären. Während Plakophilin-1-Kopf vermutlich eine Interaktion mit eIF4E im Zellkern und im Zytoplasma vermittelt, benötigt Plakophilin 3 sowohl die Kopf- als auch die *repeat*-Domäne um mit eIF4E im Zytoplasma einen Komplex zu bilden.

Wie bereits erwähnt, ermöglicht die Anlagerung von eIF4E an die *cap*-Struktur den Aufbau eines funktionsfähigen eIF4F-Komplexes, vermittelt durch eIF4G. eIF4G stellt das wohl bekannteste und wichtigste Gerüstprotein für die Translationsinitiation dar. Funktionell kann es in drei Domänen untergliedert werden. Die N-terminale Domäne interagiert mit eIF4E und PABP (IMATAKA H. *et al.* 1998; MADER S. *et al.* 1995), wodurch die RNA eine zirkuläre Struktur einnehmen kann (WELLS S. E. *et al.* 1998). Die mittlere Region weist eine eIF3- und eine eIF4A1-Bindungsstelle auf und ermöglicht die Anlagerung an das Ribosom (DE GREGORIO E. *et al.* 1999; IMATAKA H. und SONENBERG N. 1997; LEFEBVRE A. K. *et al.* 2006; PESTOVA T. V. *et al.* 1996b) und die C-terminale Domäne ist durch eine zweite eIF4A1-Bindungsstelle gekennzeichnet (IMATAKA H. und SONENBERG N. 1997). Auch wenn die mittlere eIF4A1-Bindungsstelle essentiell für die Translation zu sein scheint, da Mutationen in dieser Region den Aufbau eines funktionsfähigen 48S-PIC verhindern (MORINO S. *et al.* 2000), zeigen neuste Untersuchungen, dass beide eIF4A1-Bindungsstellen in eIF4G benötigt werden, damit eIF4A1 und eIF4B einen Komplex bilden können und die ATPase-Aktivität von eIF4A1 stimuliert werden kann (NIELSEN K. H. *et al.* 2011). Um zu untersuchen, ob auch die Plakophiline mit eIF4G assoziieren können, wurden in dieser Arbeit zunächst drei Fragmente des Proteins generiert. Dabei enthält das N-terminale Fragment ausschließlich die PABP-Bindungsstelle, das mittlere Fragment die eIF4E-, die eIF3- und die erste eIF4A1-Bindungsstelle und das C-terminale Fragment die zweite eIF4A1-Bindungsstelle (siehe Abb. 18, S. 59). Die Analyse mit Hilfe des Hefe-Dihybrid-Systems ergab dabei eine Assoziation ausschließlich zwischen der Plakophilin-1-Kopfdomäne und dem mittleren eIF4G-Fragment (siehe Abb. 19, S. 60). Da, wie bereits erwähnt, die Interaktion im Kern der Hefe stattfindet und damit veränderte Struktur- und Oberflächeneigenschaften der Proteine nicht ausgeschlossen werden können, wurden auch GST-*pull-down*-Analysen (siehe Abb. 20, S. 61) durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 sowohl mit der mittleren Domäne als auch mit dem C-Terminus von eIF4G spezifisch assoziieren können. Eine Interaktion mit dem N-terminalen eIF4G-Fragment konnte nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund ist vor allem interessant, weil er die Hypothese unterstützt, dass die Plakophiline als Gerüstproteine im Translationsinitiationskomplex fungieren. Beide identifizierten eIF4G-Fragmente weisen eine eIF4A1-Bindungsstelle auf; Plakophilin 1 und Plakophilin 3 können mit eIF4A1 assoziieren. Es wäre also denkbar, dass die Plakophiline die Interaktion zwischen eIF4A1 und eIF4G stabilisieren und dadurch die ATPase-Aktivität von eIF4A1 stimulieren können. eIF4A1 bindet nach neueren Erkenntnissen in einer 2:1-Stöchiometrie an eIF4G, wobei die mittlere Region eine hochaffine und die C-terminale Region eine niedrigaffine Bindungsstelle darstellt (NIELSEN K. H. *et al.* 2011). Um die Bindungsstelle der Plakophiline an eIF4G weiter einzugrenzen und um zu untersuchen, ob die Proteine ebenfalls in einer 2:1- oder in einer

1:1-Stöchiometrie an eIF4G binden können, sollten weitere Untersuchungen, wie ITC<sup>11</sup> oder SPR<sup>12</sup>-Spektroskopie, durchgeführt werden. Dafür müsste allerdings die Reinigung der einzelnen eIF4G-Fragmente etabliert und die von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 ggf. optimiert werden, da beide Proteine bei höheren Konzentrationen zur Aggregation neigen. Da die mittlere Region von eIF4G auch die eIF4E- und eIF3-Bindungsstelle einschließt, wäre es außerdem denkbar, dass die Plakophiline auch diese Interaktionen als Gerüstproteine stabilisieren. eIF3 und eIF4A1 binden eIF4G kooperativ (KORNEEVA N. L. *et al.* 2000). Ob auch die Plakophiline an der kooperativen Bindung von eIF4A1 und eIF3 beteiligt sind, sollte daher in weiteren Analysen geprüft werden.

Die Tatsache, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit der mittleren Region interagieren können, ist auch unter dem Gesichtspunkt der EMCV-IRES-vermittelten Translation interessant. Die virale Protease 2A spaltet eIF4G, wodurch ein eIF4G-Fragment entsteht, welches die eIF4E- und PABP-Bindungsstelle nicht enthält. Dieses Fragment besitzt eine höhere Affinität für virale mRNAs als für *cap*-mRNAs wodurch die Translation viraler mRNAs bevorzugt wird (ALI I. K. *et al.* 2001; LAMPHEAR B. J. *et al.* 1995). Untersuchungen zeigten, dass allein das mittlere Fragment von eIF4G ausreicht um sich an die J-K-Domänen der EMCV-IRES anzulagern, eIF4A1 und eIF4B zu rekrutieren und die Translation zu stimulieren (KOLUPAEVA V. G. *et al.* 1998; LOMAKIN I. B. *et al.* 2000; PESTOVA T. V. *et al.* 1996b). Es wäre also denkbar, dass auch bei viralen Infektionen die Interaktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit dem mittleren eIF4G-Fragment ausreicht, um die Translation viraler mRNAs zu stimulieren, indem sie etwa als Gerüstproteine den Komplex an sich stabilisieren bzw. die Rekrutierung weiterer Initiationsfaktoren, wie zum Beispiel eIF4A1 oder eIF4B, fördern. Da das in dieser Arbeit verwendete mittlere eIF4G-Fragment im Gegensatz zu dem von Pestova und Kollegen verwendeten Fragment jedoch die eIF4E-Bindungsstelle einschließt, kann ein Einfluss dieser Region auf die Assoziation der Plakophiline mit eIF4G hier nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe von BiFC-Studien (siehe Abb. 21, S. 62) und einem *Proximity Ligation Assay* (siehe Abb. 22, S. 63) konnte gezeigt werden, dass auch die endogenen Proteine in einem Komplex vorliegen und dass die Interaktion zwischen Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G über die N-terminale Kopfdomäne der Proteine vermittelt wird. Eine Funktion der Plakophiline als Gerüstproteine im Translationsinitiationskomplex ist damit höchst wahrscheinlich.

Hofmann und Kollegen konnten mittels Immunpräzipitation bereits eine Assoziation von Plakophilin 3 und PABP detektieren und zeigen, dass Plakophilin 1, Plakophilin 3 und PABP in *stress granules* vorliegen (HOFMANN I. *et al.* 2006). Die Interaktion der Plakophiline mit

<sup>11</sup> ITC – isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*)

<sup>12</sup> SPR – Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*)

PABP sollte daher genauer charakterisiert werden. Erste Untersuchungen wurden unter Verwendung des Hefe-Dihybrid-Systems angefertigt (siehe Abb. 32, S. 72). Dabei konnte eine spezifische Interaktion der Plakophilin-1-Kopfdomäne mit dem N-terminalen PABP-Fragment, welches vier RNA-bindende Motive (RRM, *RNA recognition motif*) enthält, aber auch mit dem C-terminalen PABP-Fragment, welches die PABC-Domäne enthält, nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Plakophilin-3-Kopfdomäne lediglich eine schwache Interaktion mit dem C-terminalen PABP-Fragment. Mit Hilfe von GST-*pull-down*-Analysen konnte die spezifische Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP *in vitro* bestätigt werden (siehe Abb. 33, S. 73). Um die Interaktion auch *in vivo* zu prüfen, wurden anschließend BiFC-Studien (siehe Abb. 34, S. 74) und eine *Proximity Ligation Assay* (siehe Abb. 35, S. 75) durchgeführt. Die BiFC-Analysen bestätigen, dass die Interaktion der Plakophiline mit PABP spezifisch über die Kopf- und nicht über die *repeat*-Domäne der Plakophiline vermittelt wird. Der *Proximity Ligation Assay* zeigt, dass auch die endogenen Proteine in einem Komplex vorliegen, da sowohl nach *knockdown* von Plakophilin 1 als auch nach *knockdown* von Plakophilin 3 die Anzahl der PLA-Signale um etwa 50 % reduziert war.

Die Aktivität von PABP in Säugetieren wird hauptsächlich durch zwei PABP-interagierende-Proteine, Paip1 und Paip2, reguliert. Obwohl beide Proteine zum einen an die RRM1 + 2 (*via* PAM1, *PABP interacting motif 1*) und zum anderen an die PABC-Domäne (*via* PAM2) von PABP binden, ist ihre Funktionsweise unterschiedlich (CRAIG A. W. *et al.* 1998; KHALEGHPOUR K. *et al.* 2001a; KHALEGHPOUR K. *et al.* 2001b; ROY G. *et al.* 2002). Während Paip1 mit eIF4A1 und eIF3g interagieren und die Translation stimulieren kann (CRAIG A. W. *et al.* 1998; MARTINEAU Y. *et al.* 2008), inhibiert Paip2 die Translation, indem es zum einen mit eIF4G um die Bindung an PABP konkurrieren kann (KARIM M. M. *et al.* 2006) und zum anderen indem es die Dissoziation des PABP von polyadenylierter mRNA fördern kann (KHALEGHPOUR K. *et al.* 2001b). Da die Daten aus der Hefe-Dihybrid-Analyse darauf hindeuten, dass Plakophilin 1, ebenso wie Paip1, sowohl mit dem N- als auch mit dem C-Terminus von PABP interagiert, könnte es also, ähnlich wie Paip1, die Translation stimulieren, indem es den eIF4G-PABP-eIF4A1-eIF3-Komplex stabilisiert. Da die Interaktion mit den einzelnen PABP-Fragmenten jedoch nur im Hefe-Dihybrid-System geprüft wurde, sollten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Plakophilin-PABP-Bindung angefertigt werden. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob Plakophilin 1 auch direkt mit Paip1 interagieren kann und ob die Proteine möglicherweise kooperativ an PABP binden können. Im Gegensatz zu Plakophilin 1 konnte für Plakophilin 3 mittels Hefe-Dihybrid-System lediglich eine schwache Interaktion mit dem C-Terminus von PABP nachgewiesen werden, so dass sich auch hier der Regulationsmechanismus der Plakophiline in der Translation unterscheiden könnte. Da die spezifische Interaktion zwischen Plakophilin 3 und PABP

jedoch in weiteren Analysen bestätigt werden konnte (*GST-pulldown*, BiFC, PLA), wäre es denkbar, dass auch Plakophilin 3 als Gerüstprotein fungieren bzw. die Rekrutierung von PABP selbst fördert.

Mit Hilfe eines Hefe-Dihybrid-Screenings konnten zwei weitere putative Interaktionspartner für Plakophilin 1 und Plakophilin 3 identifiziert werden: eIF3c und eIF3f (siehe Abschnitt 3.2). Diese sind Bestandteil des eIF3-Komplexes, welcher in Säugetieren aus 13 nichtidentischen Untereinheiten (eIF3a–m) aufgebaut ist (BROWNING K. S. et al. 2001; ZHOU C. et al. 2005). Im Gegensatz dazu besteht er in *S. cerevisiae* nur aus sechs Untereinheiten (eIF3a, -b, -c, -g, -i und -j), wobei fünf dieser Untereinheiten (eIF3a, -b, -c, -g, und -i) in allen Eukaryonten stark konserviert sind und daher als funktionelle Kernelemente betrachtet werden (PHAN L. et al. 1998; VALASEK L. S. 2012; ZHOU C. et al. 2005). Der eIF3-Komplex vermittelt die Anlagerung des 43S-PIC an die mRNA vermutlich über eine direkte Interaktion zwischen eIF4G und eIF3e (JACKSON R. J. et al. 2010; LEFEBVRE A. K. et al. 2006), ist aber auch am Aufbau des 43S-PIC und am ‚Scanning‘ beteiligt (HINNEBUSCH A. G. 2006). Die Plakophiline könnten somit nicht nur am Aufbau des *cap*-mRNA-Bindekomplexes sondern durch eine Interaktion mit eIF3 auch an der Anlagerung des Ribosoms an die mRNA beteiligt sein. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Interaktion zwischen den Plakophilinen und eIF3c, einer Hauptkomponente des eIF3-Komplexes, *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Zunächst wurden *GST-pulldown*-Analysen (siehe Abb. 36, S. 77) und Immunpräzipitationsexperimente (siehe Abb. 37, S. 78) genutzt, um die bereits im Hefe-Dihybrid-System nachgewiesene Interaktion (A. Wolf, persönliche Korrespondenz) *in vitro* zu validieren. Es konnte eine spezifische Interaktion von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c nachgewiesen werden. Die Plakophiline interagieren dabei direkt mit eIF3c und nicht indirekt durch die Bindung an eine gemeinsame RNA, da die Interaktion zwischen den Proteinen auch nach Behandlung der Proben mit RNase A bestehen bleibt (siehe Abb. 36, S. 77). Die durchgeführten BiFC-Analysen (siehe Abb. 38, S. 79) und der *Proximity Ligation Assay* (siehe Abb. 39, S. 80) zeigen, dass die Plakophiline auch *in vivo* mit eIF3c in einem Komplex vorliegen und dass die Interaktion spezifisch über die Kopf- und nicht über die *repeat*-Domäne der Plakophiline vermittelt wird.

Für Plakophilin 1, nicht jedoch für Plakophilin 3, war bereits bekannt, dass es durch eIF4A1 in den *cap*-mRNA-Bindekomplex rekrutiert wird (WOLF A. et al. 2010). Um zu prüfen, ob möglicherweise eIF3c einen Einfluss auf die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den *cap*-mRNA-Bindekomplex hat, wurden Affinitätschromatographie-Experimente mit 7-Methyl-GTP-Sepharose nach *knockdown* von eIF3c durchgeführt (siehe Abb. 40, S. 81). Diese Experimente zeigen, dass durch den Verlust von eIF3c die Anlagerung von Plakophilin 3 an den Translationsinitiationskomplex fast vollständig unterbunden wird, wohingegen der Level

von eIF4E nahezu konstant ist. Die zusätzliche Analyse der eIF4G-, PABP- und eIF4A1-Level ergab, dass auch diese Initiationsfaktoren nach *knockdown* von eIF3c deutlich schlechter in den Translationsinitiationskomplex rekrutiert werden. Aus Studien in *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die N-terminale Domäne von eIF3c mit eIF1, eIF5 und mit dem ternären Komplex interagieren und somit die Rekrutierung des ternären Komplexes zum Ribosom fördern kann (ASANO K. *et al.* 2000; VALASEK L. *et al.* 2002; VALASEK L. *et al.* 2004). Die C-terminale PCI-Domäne von eIF3c ermöglicht im Gegensatz dazu die Assemblierung des Translationsinitiationskomplexes, indem sie mit dem ribosomalen Protein ASC1 und der 18S-rRNA interagiert (KOUBA T. *et al.* 2012). Welche genaue Funktion eIF3c in Säugetieren erfüllt ist bislang unbekannt, jedoch zeigen *In-vitro*-Rekonstitutionsstudien, dass eIF3c essentiell für die Aktivität des eIF3-Komplexes ist (MASUTANI M. *et al.* 2007). Der Verlust von eIF3c könnte demzufolge den Aufbau eines funktionsfähigen Translationsinitiationskomplexes und damit auch die Rekrutierung von Plakophilin 3 sowie anderer Initiationsfaktoren verhindern. eIF4E bindet direkt an das 7-Methyl-GTP und wird daher nicht beeinflusst. Da sich der *knockdown* von eIF3c aber am stärksten auf die Rekrutierung von Plakophilin 3 auswirkt, deuten die Daten darauf hin, dass eIF3c eine entscheidende Rolle bei der Anlagerung von Plakophilin 3 an den Translationsinitiationskomplex spielt. Die Interaktion zwischen eIF3 und eIF4G ermöglicht die Anlagerung des 43S-PIC an die mRNA (JACKSON R. J. *et al.* 2010), wobei diese Interaktion in humanen Zellen vermutlich durch eIF3e vermittelt wird (LEFEBVRE A. K. *et al.* 2006). Massenspektrometrische Untersuchungen zeigen, dass der eIF3-Komplex aus drei Subkomplexen (sog. Modulen) aufgebaut ist und dass diese so angeordnet sind, dass eIF3c direkt mit eIF3e interagieren kann (ZHOU M. *et al.* 2008). Über ihre Interaktion mit eIF3c und eIF4G könnten die Plakophiline also die Anlagerung der 43S-PIC an die mRNA vermitteln und somit den Aufbau des 48S-PIC als Gerüstproteine stabilisieren.

Wie bereits erwähnt verfügt eIF3c C-terminal über eine PCI-Domäne. Proteine mit dieser Domäne sind Bestandteil dreier großer Proteinkomplexe (Proteasom, COP9, Initiationsfaktor 3), fungieren dabei als Gerüstproteine und vermitteln Interaktionen im jeweiligen Komplex aber auch mit anderen Proteinen (HOFMANN K. und BUCHER P. 1998; KIM T. *et al.* 2001; PICK E. *et al.* 2009; SCHEEL H. und HOFMANN K. 2005). Um zu prüfen ob auch die Plakophiline spezifisch mit dieser Domäne interagieren können, wurden Hefe-Dihybrid- und GST-*pull-down*-Analysen (siehe Abb. 42, S. 83 und Abb. 43, S. 83) angefertigt. Dazu wurden drei Fragmente von eIF3c generiert: ein N-terminales Fragment ohne PCI-Domäne, ein C-terminales Fragment, das die PCI-Domäne mit einschließt, und die isolierte PCI-Domäne (siehe Abb. 41, S. 82). Die Analysen zeigen, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 spezifisch mit dem C-terminalen eIF3c-Fragment, aber auch mit der isolierten PCI-Domäne interagieren können, wohingegen eine Assoziation mit dem N-terminalen

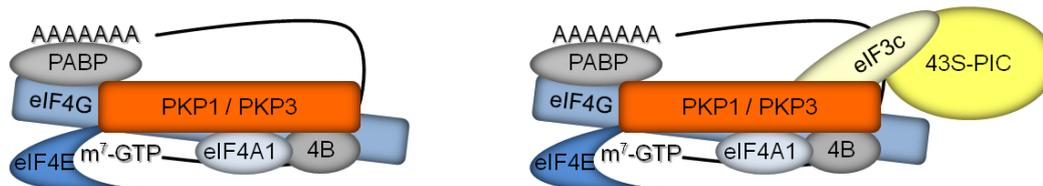
Fragment nicht detektiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe von Immunpräzipitationsexperimenten auch eine Assoziation von Plakophilin 3 mit dem eIF3c-N-Terminus nachgewiesen werden (siehe Abb. 44, S. 84). Da in diesem Fall jedoch Zelllysate verwendet wurden, ist es nicht auszuschließen, dass die detektierte Assoziation durch endogenes eIF3c bzw. einen anderen Faktor vermittelt wurde. Studien in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) zeigen zum Beispiel, dass das CSN7 (*COP9 signalosome complex subunit 7*) über seine PCI-Domäne Heterodimere mit CSN1 und CSN8 bilden kann (DESSAU M. *et al.* 2008). Darüber hinaus sind auch zahlreiche Interaktionen zwischen PCI-Domänen-enthaltenden Proteinen unterschiedlicher Komplexe bekannt (KIM T. *et al.* 2001), wie zum Beispiel die Interaktion von eIF3c und eIF3e, Komponenten des eIF3-Komplexes, mit verschiedenen Komponenten des COP9-Signalosoms (YAHALOM A. *et al.* 2001). Zusammengefasst implizieren diese Daten somit, dass die Interaktion der Plakophiline mit eIF3c direkt durch die PCI-Domäne vermittelt wird.

Um die funktionelle Relevanz dieser Interaktion zu prüfen, wurde die PCI-Domäne bzw. der C-Terminus von eIF3c in HEK-293-Zellen überexprimiert, eine Affinitätschromatographie mit 7-Methyl-GTP-Sepharose durchgeführt und das Vorhandensein von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 im Translationsinitiationskomplex überprüft (siehe Abb. 45, S. 86). Dabei fiel auf, dass die PCI-Domäne bzw. der C-Terminus von eIF3c sehr gut im Lysat, jedoch nicht im Translationsinitiationskomplex nachzuweisen war, so dass der N-Terminus von eIF3c für die Anlagerung an den Komplex verantwortlich zu sein scheint. Dies ist auch für CSN7 aus *A. thaliana* bekannt. Während CSN7 biologisch aktiv ist und sich in den CSN-Komplex integrieren kann, kann dies die isolierte PCI-Domäne nicht (DESSAU M. *et al.* 2008). Die Expression der eIF3c-PCI- bzw. C-terminalen-Domäne führte dazu, dass deutlich weniger Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex rekrutiert wurde, wohingegen kein Effekt für Plakophilin 1, eIF4E, eIF4G und eIF4A nachgewiesen werden konnte. Der Effekt auf den Plakophilin-3-Level ist somit spezifisch. Die *GST-pulldown*- und Hefe-Dihybrid-Analysen belegen, dass die PCI-Domäne einen Komplex mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 bilden kann. Die Affinitätschromatographie-Experimente zeigen jedoch, dass für die Anlagerung der PCI-Domäne (bzw. des eIF3c-C-Terminus) an den Translationsinitiationskomplex der N-Terminus des Proteins erforderlich ist. Da der Level an Plakophilin 3 im Translationsinitiationskomplex nach der Überexpression der PCI-Domäne bzw. des eIF3c-C-Terminus deutlich reduziert war, könnte dies bedeuten, dass die PCI-Domäne zwar einen Komplex mit Plakophilin 3 bilden, sich aber nicht an den Translationsinitiationskomplex anlagern kann. Die Interaktion mit der eIF3c-PCI-Domäne scheint somit bedeutend für die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex zu sein. Das bedeutet, dass sich auch hier der Regulationsmechanismus von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 unterscheidet. Während sich Plakophilin 1 durch seine Interaktion mit eIF4A1 an den Translationsinitiations-

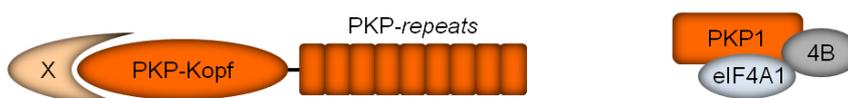
komplex anlagern kann, ist eIF3c – speziell die PCI-Domäne – für die Rekrutierung von Plakophilin 3 verantwortlich.

Zusammengefasst lässt sich aus den hier präsentierten Daten folgendes Modell für die Funktion der Plakophiline in der Translation postulieren. (1) Plakophilin 1 und Plakophilin 3 fungieren als Gerüstproteine beim Aufbau des *cap*-mRNA-Bindekomplexes, da sie mit eIF4E, eIF4G, eIF4A1, eIF4B, und PABP *in* und *in vivo* interagieren und die Translation stimulieren können. (2) Plakophilin 1 und Plakophilin 3 fördern die Bildung des 48S-PIC, indem sie mit eIF4G und eIF3c interagieren und somit die Anlagerung des 43S-PIC an die mRNA stimulieren. (3) Die Interaktion der Plakophiline mit dem jeweiligen Bindungspartner wird im Wesentlichen durch die Kopfdomäne der Plakophiline vermittelt. Diese ist nach Strukturvorhersagen weitestgehend ungefaltet (M. Hatzfeld, persönliche Korrespondenz), so dass sich die Oberflächenstruktur des Proteins sehr gut an die des Bindungspartners anpassen kann. (4) Die Plakophiline sind auch an der Rekrutierung von Initiationsfaktoren in den *cap*-mRNA-Bindekomplex beteiligt. Plakophilin 1 fördert dabei die Rekrutierung von eIF4A1 und eIF4B (WOLF A. *et al.* 2010).

- (1) Plakophilin 1 und Plakophilin 3 stabilisieren den *cap*-mRNA-Bindekomplex als Gerüstproteine (2) Plakophilin 1 und Plakophilin 3 fördern den Aufbau des 48S-PIC über eine Interaktion mit eIF3c



- (3) Die Kopfdomäne der Plakophiline vermittelt die Interaktion mit den Initiationsfaktoren (4) Plakophilin 1 ist an der Rekrutierung von Initiationsfaktoren beteiligt



**Abb. 53 Modell über die putativen Funktionen der Plakophiline 1 und 3 in der Translation.** (1) Plakophilin 1 und Plakophilin 3 interagieren mit eIF4E, eIF4G, eIF4A1, eIF4B und PABP und stabilisieren den *cap*-mRNA-Bindekomplex als Gerüstproteine. (2) Plakophilin 1 und Plakophilin 3 fördern den Aufbau des 48S-PIC, indem sie mit eIF3c und eIF4G interagieren und die Anlagerung des 43S-PIC an die mRNA stimulieren. (3) Die ungefaltete Kopfdomäne der Plakophiline kann sich an die Oberflächenstruktur des jeweiligen Bindungspartners anpassen und vermittelt die Interaktion. (4) Plakophilin 1 fördert die Rekrutierung von eIF4A1 und eIF4B zum *cap*-mRNA-Bindekomplex.

Die durchgeführten PLA-Analysen unterstützen das postulierte Modell, da sie zeigen, dass die Plakophiline nicht nur auf exogener sondern auch auf endogener Ebene einen Komplex mit den untersuchten Initiationsfaktoren (eIF4E, eIF4G, eIF4A1, eIF4B, PABP und eIF3c) bilden können. Diese Komplexbildung wird durch den *knockdown* von Plakophilin 1 oder Plakophilin 3 deutlich reduziert. Die Unterschiede in der Anzahl der detektierten PLA-Signale zwischen den Plakophilinen, aber auch zwischen den getesteten Initiationsfaktoren,

könnten dabei aus unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zwischen den Proteinen oder den verwendeten Antikörpern zustande kommen und sollte daher mit weiteren Experimenten geprüft werden. Eine eindeutige Aussage darüber, ob die Interaktion zwischen den Plakophilinen und den untersuchten Initiationsfaktoren direkt ist oder ob die Assoziation durch einen gemeinsamen Bindungspartner vermittelt wird, kann nicht getroffen werden. Die Plakophiline können aufgrund ihrer positiven Ladung (pI 9,3-10,1) (SCHMIDT A. und JAGER S. 2005) sehr gut mit den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren assoziieren, so dass auch eine RNA-vermittelte Interaktion nicht ausgeschlossen werden kann. Die Interaktion zwischen den Plakophilinen und eIF3c basiert nicht auf der Bindung an eine gemeinsame RNA, was die GST-*pull-down*-Analysen in Gegenwart von RNase A belegen. Erste Befunde deuten außerdem darauf hin, dass auch die Interaktion mit eIF4G, im Gegensatz zu der Interaktion mit PABP, nicht durch RNA vermittelt wird (siehe Abb. 54, Anhang).

#### **4.2. Der Einfluss der Plakophiline auf die Zellproliferation und Zellgröße**

Die Zelle nutzt die Regulation der Translation um ihre Genexpression an verschiedene Bedingungen, u. a. während der Embryonalentwicklung oder der Gedächtnisbildung, anzupassen (MA X. M. und BLENIS J. 2009). Damit die Zelle wachsen, proliferieren oder differenzieren kann, muss ausreichend Energie in Form von Nährstoffen zur Verfügung stehen um die Synthese neuer Proteine antreiben zu können (MA X. M. und BLENIS J. 2009). Die Regulation der Zellproliferation und der Zellgröße ist damit direkt an die Regulation der Translation gekoppelt. Die konservierte Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) reguliert die Translation und damit das Zellwachstum und die Zellproliferation, indem sie in einer rezeptorvermittelten Signalkaskade direkt durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird (Übersicht in LAPLANTE M. und SABATINI D. M. 2012). mTOR phosphoryliert das eIF4E-BP1, die p70-S6-Kinase (S6K) und eIF4G (MA X. M. und BLENIS J. 2009). Hypophosphoryliertes eIF4E-BP1 bindet an eIF4E und verhindert die Anlagerung von eIF4G. Wird eIF4E-BP1 jedoch durch mTOR phosphoryliert, so dissoziiert es von eIF4E, ein funktionstüchtiger eIF4F-Komplex kann gebildet und somit die Translation initiiert werden (LAPLANTE M. und SABATINI D. M. 2012). Ein direkter Einfluss von eIF4E auf die Zellproliferation konnte in zahlreichen Zelllinien nachgewiesen werden (DE BENEDETTI A. *et al.* 1991; ORIDATE N. *et al.* 2005; RINKER-SCHAEFFER C. W. *et al.* 1993). Die Deletion des *p70<sup>S6K</sup>/p85<sup>S6K</sup>*-Gens in Mäusen führt zu einer Reduktion der Körpergröße (SHIMA H. *et al.* 1998). In *D. melanogaster* reguliert die S6K die Zellgröße und die Zellproliferation und damit auch die Entwicklung der Tiere (MONTAGNE J. *et al.* 1999). Die Phosphorylierung von eIF4B durch die aktivierte S6K ist notwendig, damit eIF4B die ATPase-Aktivität von eIF4A1 stimulieren kann (RAUGHT B. *et al.* 2004). Die Phosphorylierung von eIF4G durch mTOR bedingt wahrscheinlich Strukturveränderungen im Protein und beeinflusst damit die Aktivität (HAY N. und SONENBERG N. 2004). Auch für

Plakophilin 1 wurde ein Einfluss auf die Zellproliferation und die Zellgröße im Zusammenhang mit der Regulation der Translation beschrieben (WOLF A. *et al.* 2010), so dass es von besonderem Interesse war, auch den Einfluss von Plakophilin 3 auf diese Prozesse zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigen, dass Plakophilin 3 neben seiner Funktion in der Regulation der Translation auch einen Einfluss auf die Zellproliferation und Zellgröße hat. Nach *knockdown* von Plakophilin 3 konnte eine verminderte Zellzahl und Zellgröße, im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, detektiert werden (siehe Abb. 8 B, S. 48 und Abb. 10, S. 49). Da dieser Effekt zum einen aus einer verminderten Proliferationsrate und zum anderen aus einer erhöhten Apoptoserate resultieren könnte, wurde der Einfluss von Plakophilin 3 auf die Zellproliferation und die Zellvitalität untersucht. Der *knockdown* von Plakophilin 3 hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität (siehe Abb. 9, S. 49), resultierte jedoch in einer verminderten Proliferationsrate der Zellen (siehe Abb. 8 C, S. 48). Vergleicht man den Einfluss von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 auf die Zellzahl, die Proliferation und die Zellgröße, so können keine gravierenden Unterschiede festgestellt werden (siehe Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10; S. 48-49). Dennoch zeigten sich Unterschiede in Bezug auf den Einfluss von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 auf die Translation *in vivo*: Plakophilin 1 kann bei einer verstärkten Expression die Translation um das 2,1-Fache stimulieren, Plakophilin 3 nur um das 1,4-Fache (WOLF A. *et al.* 2010).

Eine mögliche Ursache dafür könnten, die für die Translationsstudien verwendeten HEK-293-Zellen sein, die im Gegensatz zu den für die Zellzahl- und Proliferationsanalysen verwendeten HaCaT-Zellen, kein endogenes Plakophilin 1, aber endogenes Plakophilin 3 exprimieren. Durch die unterschiedliche Ausgangskonzentration von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in den HEK-293-Zellen, könnte die Überexpression von Plakophilin 1, wie bereits in Abschnitt 4.1 erwähnt, einen stärkeren Effekt in der Zelle hervorrufen, als die Überexpression von Plakophilin 3. Um den Einfluss beider Plakophiline auf die Translation direkt miteinander vergleichen zu können, wäre es daher ratsam, eine Zelllinie zu verwenden, die entweder kein Plakophilin 1 und Plakophilin 3 enthält oder eine Zelllinie, in der beide Plakophiline nahezu gleichstark exprimiert werden.

Natürlich könnte der, in den Translationsstudien beobachtete stärkere Einfluss von Plakophilin 1, in den Zellzahl- und Proliferationsstudien durch unterschiedliche *knockdown*-Effizienzen für Plakophilin 1 und Plakophilin 3 zufällig kompensiert worden sein. Ein Blick auf die in Abb. 8, S. 48 dargestellten Western Blots zeigt, dass der *knockdown* von Plakophilin 3 deutlich effektiver war als der *knockdown* von Plakophilin 1. Plakophilin 3 könnte die Proliferation allerdings auch durch einen zusätzlichen Effekt auf die Transkription beeinflussen. Außerdem sind auch direkte Einflüsse auf die Zellteilung nicht auszuschließen, da auch für verwandte Armadillo-Proteine, wie das p0071, eine Beteiligung an der

Regulation des Zellzyklus nachgewiesen werden konnte (KEIL R. *et al.* 2007; WOLF A. *et al.* 2006).

Nach *knockdown* von Plakophilin 3 konnte ein stärker inhibierender Einfluss auf die Zellzahl als auf die Proliferationsrate beobachtet werden. Die Zellzahl ist 48 h nach Transfektion der Plakophilin-3-siRNA auf ca. 80 % reduziert, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Dieser Effekt verstärkt sich 72 h (ca. 70 %) und 96 h (ca. 60 %) nach der Transfektion. Im Gegensatz dazu nimmt die Proliferationsrate der Zellen langsamer ab, von 86 % 48 h nach der Transfektion auf 80 % 96 h nach der Transfektion. Diese Unterschiede könnten in den angewendeten Methoden begründet liegen. Während sich die Zellzahl auf die absolute Anzahl der Zellen bezieht, basiert die Bestimmung der Proliferationsrate auf dem Einbau des Thymidinanalogons BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin) in die DNA und damit auf der DNA-Menge zu einem bestimmten Zeitpunkt. Da aber mit beiden Methoden qualitativ der gleiche Effekt detektiert werden konnte und da der *knockdown* von Plakophilin 3 keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte, muss die verminderte Zellzahl aus einer Reduktion der Proliferationsrate resultieren.

Die Deletion des Plakophilin-3-Gens führt in Mäusen zu einer verminderten Körpergröße der Tiere. Darüber hinaus wurden zahlreiche Abnormitäten in der Morphologie der Haare und Haarfollikel und ein vermindertes Haarwachstum beschrieben (SKLYAROVA T. *et al.* 2008). Immunhistologische Färbungen gegen das Ki67-Antigen, einem Marker proliferierender Zellen, zeigten außerdem, dass die *knockout*-Tiere deutlich weniger proliferierende Matrixzellen im Haarfollikel aufweisen als die Kontrolltiere (SKLYAROVA T. *et al.* 2008). Ähnliche Effekte konnten auch bei Patienten beobachtet werden, die unter dem EDSF-Syndrom leiden (MCGRATH J. A. *et al.* 1997). Diese autosomal rezessive Erkrankung wird durch Mutationen im Plakophilin-1-Gen verursacht und resultiert in der Expression eines verkürzten Proteins bzw. im kompletten Verlust. Die Haut der Patienten ist, bedingt durch die gestörte Zell-Zell-Adhäsion, extrem fragil und entzündungsanfällig, wodurch es zu blasenartigen Läsionen kommt. Auch eine Reduktion an Schweißdrüsen, eine generelle Gedeihstörung und das Fehlen der Kopfbehaarung, der Wimpern und Augenbrauen wurde beschrieben (als Beispiele siehe BOYCE A. E. *et al.* 2012; ERSOY-EVANS S. *et al.* 2006; HAMADA T. *et al.* 2002; MCGRATH J. A. *et al.* 1997; SPRECHER E. *et al.* 2004). Da die Zellen des Haarfollikels eine sehr hohe Proliferationsrate aufweisen, wäre es denkbar, dass die verminderten Proliferationsraten nach *knockdown* von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit dem beschriebenen Haarverlust, der veränderten Morphologie der Haare und der Gedeihstörung korrelieren.

Auch in Lungenkarzinomzellen konnte ein Einfluss von Plakophilin 3 auf die Proliferation der Zellen nachgewiesen werden. Die Behandlung der Zellen mit Plakophilin-3-siRNA reduzierte das Wachstum der Zellen, wohingegen die exogene Expression von

Plakophilin 3 in COS7-Zellen die Proliferation und Invasivität der Zellen stimulierte (FURUKAWA C. *et al.* 2005). Durch die Stimulation der Translation und damit auch der Proliferation könnten die Plakophiline also zur Tumorentstehung beitragen. Ein erhöhter Level an Plakophilin 1 und Plakophilin 3 wurde nicht nur in Lungenkarzinomzellen beobachtet, sondern auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (FURUKAWA C. *et al.* 2005; SANCHEZ-PALENCIA A. *et al.* 2011; VILLARET D. B. *et al.* 2000). Die gesteigerte Expression in Tumoren wurde für eine Vielzahl von Initiationsfaktoren beschrieben (Übersicht in SILVERA D. *et al.* 2010). So korreliert z. B. ein erhöhter eIF4E-Level in Brustkarzinomen mit einer geringen Überlebenschance für die Patienten und mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Wiederauftreten des Tumors (LI B. D. *et al.* 1998). Eine erhöhte Expression von eIF4G konnte in Lungen- und Brustkarzinomen nachgewiesen werden (BAUER C. *et al.* 2001; SILVERA D. *et al.* 2009).

Die hier präsentierten Daten implizieren, dass nicht nur Plakophilin 1, sondern auch Plakophilin 3 einen direkten Einfluss auf die Zellproliferation ausüben kann, indem es die Translation stimuliert.

Häufig müssen die Proliferation und damit auch die Translation jedoch in einem bestimmten Zellkompartiment lokal stimuliert werden, zum Beispiel an den Grenzflächen einer Wunde, um diese zu schließen und den Zellverband wiederherzustellen (MARTIN P. 1997) oder aber während der neuronalen Entwicklung (JUNG H. und HOLT C. E. 2011), so dass der Transport von mRNA in eine bestimmte Zellregion erforderlich ist. Dieser Mechanismus wurde unter anderem für die  $\beta$ -Aktin-mRNA beschrieben. Das Protein ZBP1 (*zipcode binding protein 1*) bindet die  $\beta$ -Aktin-mRNA an einem aus 54 Nukleotiden bestehendem Element (sog. *zipcode*) im 3'-UTR (ROSS A. F. *et al.* 1997), unterdrückt deren Translation und transportiert die mRNA in die Ausläufer primärer Fibroblasten und Neuronen (FARINA K. L. *et al.* 2003; ZHANG H. L. *et al.* 2001). Dort induziert die Kinase Src die Phosphorylierung von ZBP1, wodurch es zur Freisetzung und damit zur Translation der  $\beta$ -Aktin-mRNA kommt (HÜTTELMAIER S. *et al.* 2005). Die gesteigerte  $\beta$ -Aktin-Expression stimuliert das Neuritenwachstum der Zellen (EOM T. *et al.* 2003; HÜTTELMAIER S. *et al.* 2005). Auch Initiationsfaktoren selbst können das Wachstum lokal beschleunigen. So führte die Behandlung von Wunden in Ratten mit eIF4E-mRNA-markierten Goldpartikeln zu einer beschleunigten Heilung (SCHWARZ K. W. *et al.* 2002).

In Voruntersuchungen zur Lokalisation von Plakophilin 3 und eIF3c fiel auf, dass beide Proteine nach der Induktion einer Wunde vermehrt an den Wundgrenzflächen sowie an Zellausläufern kolokalisieren. Daher ließ sich vermuten, dass auch die Plakophiline die Proliferation der Zellen lokal fördern können, indem sie die Translation in bestimmten Bereichen stimulieren. Um zu prüfen, ob in diesen Bereichen auch verstärkt RNA lokalisiert und damit weitere Hinweise über eine mögliche Funktion der Plakophiline in der lokalen

Translation zu erhalten, wurde Poly(A)-mRNA in HaCaT-Zellen 6 h nach Wundinduktion mit Hilfe einer Cy3-Oligo(dT)<sub>20</sub>-Sonde markiert. Parallel dazu wurde die Lokalisation von Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c mittels spezifischer Antikörper bestimmt (siehe Abb. 46, S. 88). Im Gegensatz zum Zytoplasma konnte an den Zellgrenzen und an den Zellausläufern eine verstärkte Rekrutierung und Kolokalisation von Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c mit Poly(A)-mRNA detektiert werden. Natürlich kann mit Hilfe von Kolokalisationsstudien keine Aussage über die aktive Rekrutierung der mRNAs getroffen werden. Da aber für beide Plakophiline ein direkter Einfluss auf die Translation und Proliferation nachgewiesen werden konnte, wäre es denkbar, dass die lokal hohe Konzentration der Proteine an der Wundgrenzfläche das Wiederherstellen des Zellverbandes und damit die Heilung fördert.

### 4.3. Der Einfluss von Plakophilin 1 auf die Regulation von Zieltranskripten

Der Proteinlevel von Zielgenen kann auf vier Ebenen reguliert werden: (1) durch die Regulation der Transkription, (2) durch die Regulation der RNA-Stabilität, (3) durch die Regulation der Translation und (4) durch die Regulation der Proteinstabilität.

Eine veränderte Regulation der Genexpression, vor allem auf Ebene der Translation, kann zum Beispiel die globale Proteinsynthese bzw. die selektive Translation bestimmter mRNAs fördern, damit das natürliche Gleichgewicht der Zelle stören und somit zur Entstehung von Tumoren beitragen (Übersicht in SILVERA D. *et al.* 2010). Die Funktion von eIF4E ist in diesem Prozess am besten charakterisiert. eIF4E stimuliert, bei erhöhter Expression, die Translation von mRNAs, die u. a. für das Überleben der Zelle essentiell sind (z. B. Survivin und Bcl-2) und die über einen stark strukturierten, GC-reichen 5'-UTR verfügen ( $\Delta G < -40$  kcal/mol nach PARSYAN A. *et al.* 2009), da diese unter normalen Bedingungen sehr ineffektiv translatiert werden (DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004). Eine erhöhte Expression von eIF4E, verbunden mit der gesteigerten Translation der genannten mRNAs, wurde u. a. bei Brustkarzinomen, in Kolorektalkarzinomen und Lungenkarzinomen beschrieben (DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. 2004).

Auch die Expressionslevel von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 sind, wie bereits erwähnt, in einer Vielzahl von Tumoren erhöht (FURUKAWA C. *et al.* 2005; SANCHEZ-PALENCIA A. *et al.* 2011; VILLARET D. B. *et al.* 2000). Da beide Proteine, ebenso wie eIF4E, die Translation und Proliferation stimulieren können, stellte sich die Frage, ob sie auch an der selektiven Regulation der Translation von Zieltranskripten beteiligt sind.

Um dies zu analysieren, wurde eine Microarray-Analyse nach *knockdown* von Plakophilin 1 durchgeführt und die relative Polysomenassoziation sowie der relative Gesamt-mRNA-Level im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen bestimmt. Dabei wurden 25697 mRNAs untersucht.

Aus Studien in HaCaT-Zellen ist bekannt, dass der *knockdown* von Plakophilin 1 die globale Proteinsynthese um ca. 30 % reduzieren kann und dass diese Reduktion auf einem Translationseffekt beruht (WOLF A. 2009). Demzufolge würde man diesen Effekt *per se* auch für das Verhältnis der polysomalen- zur monosomalen RNA zwischen mit Plakophilin-1- und Kontroll-siRNA behandelten Zellen im Microarray erwarten. Dies ist aus der Betrachtung der, für die Microarray-Analyse eingesetzten, präparierten RNA-Proben, jedoch nicht ersichtlich (Berechnung siehe Tab. 24, Anhang). Die Microarray-Analyse ist möglicherweise nicht die Methode der Wahl um diese globalen Effekte zu untersuchen, da die Präparation der Proben sehr aufwendig ist und die Prozedur, auf Grund der vielen Reinigungsschritte, Ungenauigkeiten mit sich bringt. Dennoch eignet sich die Methode sehr gut zur Identifizierung spezifischer Transkripte, da für diese zum einen die Verschiebung zwischen Mono- und Polysomen analysiert, zum anderen auch eine Betrachtung der relativen Gesamt-RNA-Konzentration durchgeführt werden kann.

Die Auswertung der relativen Polysomenassoziation ergab, dass diese nach *knockdown* von Plakophilin 1 (Berechnung siehe 3.4.1, S. 90) bei 142 mRNAs mindestens 1,33-fach vermindert und von 124 mRNAs mindestens 1,33-fach erhöht war (siehe Abb. 47, S. 91). Eine verminderte Polysomenassoziation ist ein Hinweis auf eine verminderte Translation, eine erhöhte Polysomenassoziation entsprechend ein Hinweis auf eine verstärkte Translation (BROWNSTEIN M. J. und KHODURSKY A. B. 2003).

Zur Validierung der Daten wurde daher anschließend der Proteinlevel fünf identifizierter Zieltranskripte (CyclinD1, eIF4B, Cdc42, eEF2 und eIF4E2) mit einer verringerten Polysomenassoziation im Microarray und der Proteinlevel von drei bekannten eIF4E-Zieltranskripten (eIF4E, myc, Bcl-2) nach Plakophilin-1-*knockdown* analysiert (siehe Abb. 48, S. 92). Dabei konnte ein signifikant erhöhter Proteinlevel für Cdc42 und eIF4E2, und ein signifikant reduzierter Proteinlevel für Bcl-2 nachgewiesen werden. Dieser Befund war überraschend, da man bei einer verminderten Polysomenassoziation generell eine verminderte Translationseffizienz und damit auch einen verminderten Proteinlevel erwartet hätte. Da die erhöhte/verminderte Expression der Proteine jedoch nicht nur aus einer erhöhten/verminderten Translationseffizienz sondern auch aus einer erhöhten/verminderten Transkriptionseffizienz bzw. RNA- oder Proteininstabilität resultieren kann, wurde der Proteinlevel von Cdc42, eIF4E2 und Bcl-2 nach Behandlung der Zellen mit Cycloheximid erneut überprüft (siehe Abb. 49, S. 93). Cycloheximid hemmt die Translation, so dass mit dieser Behandlung eine Aussage über die Stabilität des bereits exprimierten Proteins getroffen werden kann. Der *knockdown* von Plakophilin 1 hatte im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen keinen Einfluss auf die Stabilität von Cdc42, eIF4E2 und Bcl-2. Für Bcl-2 könnte demzufolge eine verminderte Translationseffizienz tatsächlich die Ursache für den verminderten Proteinlevel nach Plakophilin 1 *knockdown* sein, auch wenn Effekte auf

Ebene der Transkription bzw. RNA-Stabilität nicht vollständig ausgeschlossen werden können. Für Cdc42 und eIF4E2 ergibt sich aus den Microarray-Daten und aus den Proteinlevel-Analysen jedoch ein Widerspruch, da man bei einer verminderten Polysomenassoziation, infolge der geringeren Translationseffizienz, auch einen geringeren Proteinlevel erwartet hätte, sofern, wie hier gezeigt, die Proteinstabilität durch den *knockdown* von Plakophilin 1 nicht beeinträchtigt ist. Die Daten der Microarray-Analyse zeigen außerdem, dass auch die relativen Gesamt-mRNA-Level von eIF4E und Cdc42 nicht signifikant durch den *knockdown* von Plakophilin 1 beeinflusst wurden, so dass lediglich noch RNA-Stabilitätseffekte eine Rolle spielen könnten. Man sollte hier jedoch bedenken, dass es sich bei den Proteinlevel-Analysen um mehrere, voneinander unabhängige, Experimente handelt, wohingegen die Microarray-Analyse nur einmal als Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Zusätzliche Experimente und eine Untersuchung der RNA-Stabilität wären an dieser Stelle ratsam.

Cdc42 ( $\Delta G_{\text{Cdc42}} = -48 \text{ kcal/mol}^{13}$ ), Bcl-2 ( $\Delta G_{\text{Bcl-2}} < -300 \text{ kcal/mol}^{13}$ ) und eIF4E2<sup>14</sup> ( $\Delta G_{\text{eIF4E2}} = -281 \text{ kcal/mol}^{13}$ ) weisen einen stark strukturierten 5'-UTR auf. Auf Basis der vorangegangenen Ergebnisse wurde ein Modell postuliert, bei dem Plakophilin 1 als Gerüstprotein in der Translation fungiert. Plakophilin 1 stimuliert die ATPase-Aktivität von eIF4A1 und fördert dessen Rekrutierung zum Translationsinitiationskomplex, wodurch Sekundärstrukturen effizienter entwunden werden können (WOLF A. *et al.* 2010). Die Identifizierung von Transkripten mit einem stark strukturierten 5'-UTR könnte durch diese Funktion begünstigt worden sein. Allerdings sollte der *knockdown* von Plakophilin 1 dann die Translation dieser mRNAs erschweren und in einem verminderten Level der kodierten Proteine resultieren. Dies ist für Bcl-2 tatsächlich der Fall, trifft aber für Cdc42 und eIF4E2, wie bereits oben beschrieben, nicht zu.

eIF4E2 wurde als translationeller Repressor beschrieben und könnte somit einen Gegenspieler zu Plakophilin 1 darstellen. In *D. melanogaster* wird eIF4E2 durch Bicoid zum 3'-UTR der *caudal* mRNA rekrutiert, wo es die Translation inhibiert (CHO P. F. *et al.* 2005). Auch in Säugerzellen konnte ein inhibierender Effekt von eIF4E2 auf die Translation nachgewiesen werden (MORITA M. *et al.* 2012). Da durch die verminderte Expression von Plakophilin 1 vermutlich auch die Translationsinitiation negativ beeinflusst wird, könnte dies mit einer gesteigerten Expression von Translationsinhibitoren, wie eIF4E2, korrelieren. Allerdings konnten Uniacke und Kollegen zeigen, dass eIF4E2 unter Hypoxie auch als translationeller Aktivator fungieren kann (UNIACKE J. *et al.* 2012). Wie eIF4E2 jedoch sowohl als Aktivator als auch als Repressor wirken kann ist bis heute unverstanden.

<sup>13</sup> Die  $\Delta G$ -Werte wurden anhand der Maus-Sequenz des jeweiligen Transkripts mit dem Programm ‚mfold web server‘ des ‚Rensselaer Polytechnic Institute‘ der ‚State University of New York at Albany‘ (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>, ZUKER M. 2003) bestimmt.

<sup>14</sup> Der hier angegebene  $\Delta G$ -Wert bezieht sich auf die Transkriptvariante 2 (NM\_001039169.1) von eIF4E2.

Der verminderte Bcl-2-Level nach *knockdown* von Plakophilin 1 steht in engem Zusammenhang mit der Funktion der Proteine. Bcl-2 ist ein anti-apoptotisches Protein und fördert das Überleben der Zellen (KELLY P. N. und STRASSER A. 2011). Die Deletion von Bcl-2 in Mäusen führte zu einem verstärkten Absterben von B- und T-Lymphozyten und Nierenepithelzellen (VEIS D. J. *et al.* 1993). Eine direkte Korrelation zwischen dem eIF4E- und dem Bcl-2-Level konnte in zahlreichen Tumoren nachgewiesen werden. Der *knockdown* von eIF4E in diesen Tumorzellen resultiert in einem verminderten Bcl-2-Level und in einer erhöhten Apoptoserate der Zellen (GRAFF J. R. *et al.* 2009; GRAFF J. R. *et al.* 2007). Plakophilin 1 fördert, ebenso wie eIF4E, die Translation und könnte somit auch zu einer verstärkten Expression von Bcl-2 beitragen. In Tumoren würde dies, bedingt durch die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2, das Wachstum der Zellen stimulieren, den Zelltod verhindern und somit die Tumorprogression fördern (KELLY P. N. und STRASSER A. 2011).

Die gesteigerte Expression von Cdc42 nach *knockdown* von Plakophilin 1 lässt sich nicht ohne weiteres mit der Funktion von Plakophilin 1 in der Translation erklären, vielmehr jedoch mit der Funktion von Plakophilin 1 als Zellkontaktprotein. Cdc42 ist nicht nur an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Ausbildung von Filopodien an der Zellperipherie beteiligt (NOBES C. D. und HALL A. 1995), sondern fördert auch die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (CHEN L. *et al.* 2010). Die verstärkte Aktivierung von Cdc42 durch das GEF-Protein ARHGEF9 in Leberkrebszellen korreliert mit einer verminderten Expression von E-Cadherin, einem Marker für epitheliale Zellen, und der Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps (CHEN L. *et al.* 2010). Der *knockdown* von ARHGEF9 hingegen vermindert die Aktivität von Cdc42, führt zur Ausbildung eines epithelialen Phänotyps und reduziert die Invasivität der Zellen (CHEN L. *et al.* 2010). Da der Verlust von Zellkontaktproteinen, wie E-Cadherin, und eine erhöhte Migrationsfähigkeit charakteristisch für die EMT sind (KALLURI R. und WEINBERG R. A. 2009), könnte auch der Verlust von Plakophilin 1 als Zellkontaktprotein diesen Prozess fördern und somit zu einer gesteigerten Expression von Cdc42 beitragen. Wie bereits einleitend erwähnt wird vermutet, dass die Plakophiline, bedingt durch Ihre Lokalisation in Desmosomen und im Zytoplasma, eine duale Funktion in der Kanzerogenese erfüllen (WOLF A. und HATZFELD M. 2010). Durch ihre Funktion als Zellkontaktproteine würden sie den Zellverband stabilisieren und die Migration der Zellen inhibieren; durch Ihre Funktion in der Translation können Sie jedoch zur Tumorprogression durch eine gesteigerte Proliferationsrate beitragen. Inwiefern die Lokalisation und damit auch die Funktion der Proteine in der Zelle reguliert werden, ist bis heute allerdings unbekannt. Ob Plakophilin 1 jedoch tatsächlich die Translation der identifizierten Zieltranskripte reguliert, sollte mit weiteren Untersuchungen geprüft werden, da auch ein Einfluss auf Ebene der Transkription bzw. mRNA-Stabilität nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Auswertung der Microarray-Analyse hinsichtlich des relativen Gesamt-mRNA-Levels (Berechnung siehe 3.4.3, S. 94) ergab, dass der Level nach Plakophilin-1-*knockdown* von 77 RNAs mindestens 1,5-fach vermindert und von 39 RNAs mindestens 1,5-fach erhöht war (siehe Abb. 50, S. 95). Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde der relative Gesamt-mRNA-Level von sieben identifizierten Zieltranskripten mittels qRT-PCR überprüft, wobei drei dieser Zieltranskripte (WTIP, TSEN34, VPS54) einen erhöhten und vier (PPBP, MAPK6, GADD45A, MED10) einen verringerten relativen Gesamt-mRNA-Level nach *knockdown* von Plakophilin 1 im Microarray aufwiesen. Die qRT-PCR-Analysen bestätigten die Ergebnisse des Microarrays für die PPBP-, MAPK6-, MED10-, WTIP-, TSEN34- und VPS54-mRNA, lediglich für die GADD45A-mRNA konnte keine signifikante Erniedrigung nach *knockdown* von Plakophilin 1, im Vergleich zur Kontrolle, detektiert werden (siehe Abb. 51, S. 96). Die Überexpression von Plakophilin 1 hingegen resultierte in einer mäßigen Erhöhung des relativen Gesamt-mRNA-Levels der PPBP- und MAPK6-mRNA (siehe Abb. 52, S. 97). Da die verwendeten Zellen jedoch über ausreichend endogenes Plakophilin 1 verfügen, wäre es denkbar, dass die zusätzliche Überexpression des Proteins keinen weiteren stimulierenden Effekt in der Zelle hervorruft. Der Befund, dass Plakophilin 1 einen direkten Einfluss auf den Gesamt-mRNA-Level hat, ist äußerst interessant, da das Protein somit einen direkten Einfluss auf die Transkription bzw. die Stabilität der identifizierten Zieltranskripte haben muss. Die Transkription findet bekanntermaßen im Zellkern statt, und obwohl bekannt ist, dass Plakophilin 1, vermittelt durch seine Kopfdomäne, im Zellkern lokalisiert sein kann, (HATZFELD M. *et al.* 2000; KOWALCZYK A. P. *et al.* 1999), ist die genaue Funktion in diesem Kompartiment bisher ungeklärt. Interessanterweise konnte eine Interaktion von Plakophilin 1 mit einzelsträngiger DNA nachgewiesen werden (SOBOLIK-DELMARE T. *et al.* 2010). Ob Plakophilin 1 allerdings auch mit RNA direkt interagieren kann ist unbekannt, jedoch könnte es auf Grund seiner positiven Ladung ( $pI = 9,3$ ) (SCHMIDT A. und JAGER S. 2005) sehr gut mit den Phosphatgruppen der Nucleinsäuren assoziieren.

Die Stabilität einer RNA wird im Wesentlichen durch bestimmte Strukturelemente im 3'- und 5'-UTR, aber auch in der proteinkodierenden Region, festgelegt, sowie durch spezifische Faktoren, die an diese Elemente binden (Übersicht in GUHANIYOGI J. und BREWER G. 2001; WU X. und BREWER G. 2012). Ein sehr bekanntes Strukturmotiv sind sogenannte AU-reiche Elemente (ARE) im 3'-UTR der mRNA, welche aus separat liegenden oder überlappenden AUUUA-Pentameren bzw. aus U-reichen Sequenzen aufgebaut sind (CHEN C. Y. und SHYU A. B. 1995). Das Protein AUF1 (*AU-rich element RNA-binding factor 1*) vermittelt zum Beispiel den Abbau von ARE-enthaltenden mRNAs, wohingegen Proteine der Hu-Familie diese mRNAs stabilisieren (WU X. und BREWER G. 2012). Nach einem aktuellen Modell (siehe GRATACOS F. M. und BREWER G. 2010) bindet AUF1 an ARE zunächst als Dimer, wodurch sich weitere AUF1-Dimere an die mRNA anlagern können.

Anschließend bildet das Protein zusammen mit eIF4G, PABP, hsp70, hsc70, LDH und hsp27 einen mRNA-destabilisierenden Komplex und rekrutiert die Degradationsmaschinerie. Daraufhin wird AUF1 nach erfolgter Ubiquitinierung durch das Proteasom und die mRNA durch Exonukleasen abgebaut. Obwohl die destabilisierende Funktion von AUF1 sehr gut dokumentiert ist (GRATACOS F. M. und BREWER G. 2010), konnte es auch als Bestandteil des  $\alpha$ -Globin-mRNA-Stabilitätskomplexes nachgewiesen werden (KILEDJIAN M. *et al.* 1997). Auch die PPBP-, MAPK6-, WTIP- und VPS54-mRNA enthalten klassische ARE (siehe Tab. 29, Anhang). AUF1 bindet an das ARE der Bcl-2-mRNA und fördert deren Degradation während der Apoptose (LAPUCCI A. *et al.* 2002). Die Cdc42- und eIF4E2-mRNA konnten mit Hilfe einer cDNA-Array-Analyse als mögliche Zieltranskripte von HuR (*Hu antigen R*) identifiziert werden (LOPEZ DE SILANES I. *et al.* 2004), auch sie enthalten putative ARE (siehe Tab. 29, Anhang). Somit wäre für alle validierten Zieltranskripte von Plakophilin 1 eine Regulation über dieses Strukturmotiv möglich, mit Ausnahme von TSEN34 und MED10, die keine ARE im 3'-UTR enthalten (siehe Tab. 29, Anhang).

Es wäre also denkbar, dass auch Plakophilin 1, ähnlich wie AUF1, spezifisch an die ARE der Zieltranskripte bindet und über seine Interaktion, zum Beispiel mit eIF4G und PABP, bestimmte Faktoren rekrutiert, die die Stabilität der entsprechenden mRNA beeinflussen. Weitere Untersuchungen müssen jedoch zeigen, ob dies tatsächlich der Fall ist, da auch ein Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene nicht ausgeschlossen werden kann. Daten aus einem Plakophilin-1-Hefe-Dihybrid-Screening belegen, dass Plakophilin 1 mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren, darunter die RNA-Polymerase II und Paf1 (*RNA polymerase II-associated factor 1*), interagieren kann (M. Hatzfeld, persönliche Korrespondenz). Der humane Paf1-Komplex (hPaf1C, *human Paf1 complex*) ist aus sechs Proteinen aufgebaut: Paf1, Ctr9, Cdc73, Rtf1, Ski8 und Leo1 (KIM J. *et al.* 2010). Er ist u. a. für die Ubiquitinierung von Histon 2B (H2B) (KIM J. *et al.* 2009) und für die Methylierung von H3K4<sup>15</sup> und H3K79<sup>16</sup> (ZHU B. *et al.* 2005) verantwortlich, wodurch die Transkription aktiviert wird. Darüber hinaus interagiert hPaf1C über Paf1 und Leo1 direkt mit der RNA-Polymerase II und stimuliert, in Synergie mit dem Transkriptionselongationsfaktor SII, die Transkriptionselongation (KIM J. *et al.* 2010). Inwiefern Plakophilin 1 durch eine putative Interaktion mit Paf1 bzw. der RNA-Polymerase II auch an der Transkriptionsregulation beteiligt ist, kann nur spekuliert werden. Denkbar wäre, dass Plakophilin 1 auch in der Transkription eine Funktion als Gerüstprotein erfüllt bzw. die Rekrutierung bestimmter Faktoren in den Transkriptionskomplex fördert.

Zusammenfassend konnten mit Hilfe des Microarrays und der nachfolgenden Analysen zahlreiche Zieltranskripte identifiziert werden, die durch Plakophilin 1 reguliert werden. Dabei

<sup>15</sup> H3K4 – Histon 3, methyliert an Lysin 4

<sup>16</sup> H3K79 – Histon 3, methyliert an Lysin 79

zeigte sich, dass nicht nur ein Regulationsmechanismus auf Ebene der Translation, sondern auch auf Ebene der Transkription bzw. der mRNA-Stabilität für Plakophilin 1 wahrscheinlich ist. Die vorhandenen Daten bilden damit einen guten Ausgangspunkt um diese noch unbekannt Funktion von Plakophilin 1 weiter zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Plakophilin 1 und Plakophilin 3 gehören zur Familie der p120<sup>ctn</sup>-verwandten Proteine. Als Strukturkomponenten der Desmosomen interagieren sie mit desmosomalen Cadherinen, wodurch sie die Intermediärfilamente der Zelle mit der Zellmembran vernetzen und zur Stabilisierung der Zellform und des Zellverbandes beitragen. Neben ihrer Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten wurde für beide Proteine auch eine Lokalisation im Zytoplasma und in inaktiven Translationsinitiationskomplexen (sog. *stress granules*) nachgewiesen, so dass eine Interaktion mit RNA-bindenden Proteinen und Komponenten der Translationsinitiationsmaschinerie wahrscheinlich war. Weiterführende Studien zeigten dann, dass Plakophilin 1 und Plakophilin 3 die *cap*-abhängige Translation *in vivo* stimulieren können. Plakophilin 1 interagiert dabei direkt mit dem eukaryontischen Initiationsfaktor 4A1 (eIF4A1), stimuliert dessen ATPase-Aktivität und fördert dessen Rekrutierung zum Translationsinitiationskomplex. Die genaue Funktion von Plakophilin 3 in der Regulation der Translation war jedoch nicht bekannt und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit erstmalig näher charakterisiert.

Dabei zeigte sich, dass Plakophilin 3 eine wichtige Komponente des *cap*-mRNA-Bindekomplexes darstellt und nicht nur die *cap*- sondern auch die EMCV-IRES-vermittelte Translation *in vitro* konzentrationsabhängig stimulieren kann. Die Regulation der Translation durch Plakophilin 3 korreliert dabei direkt mit einer Funktion des Proteins bei der Regulation der Zellproliferation und der Zellgröße und könnte somit eine Erklärung für die erhöhte Expression von Plakophilin 3 in einer Vielzahl von Tumoren sein.

Um den Aufbau des Translationsinitiationskomplexes in Gegenwart von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine umfassende Interaktionsanalyse mit den Hauptkomponenten dieses Komplexes (eIF4E, eIF4G, eIF4A1, eIF4B, PABP und eIF3c) durchgeführt. Plakophilin 1 und Plakophilin 3 interagieren *in vitro* und *in vivo* mit den untersuchten Initiationsfaktoren, wobei die Interaktion im Wesentlichen durch die N-terminale Kopfdomäne der Proteine vermittelt wird. Diese ist nach Strukturvorhersagen weitestgehend ungefaltet und könnte sich somit sehr gut an die Oberflächenstruktur des jeweiligen Bindungspartners anpassen. Auf Basis der erzielten Ergebnisse wurde ein Modell postuliert, in dem Plakophilin 1 und Plakophilin 3 als Gerüstproteine nicht nur den *cap*-mRNA-Bindekomplex stabilisieren, sondern auch, durch ihre Interaktion mit eIF3c, den Aufbau des 48S-PIC fördern können (siehe Abb. 53, S. 109).

Obwohl eIF3c über seine PCI-Domäne mit beiden Plakophilinen direkt interagieren kann, hat deren Überexpression ausschließlich einen Einfluss auf die Rekrutierung von Plakophilin 3 und nicht von Plakophilin 1 in den Translationsinitiationskomplex. Die

Interaktion von Plakophilin 3 und eIF3c scheint somit bedeutend für die Funktion von Plakophilin 3 während der Translation zu sein.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen außerdem, dass nicht nur ein Regulationsmechanismus auf Ebene der Translation sondern auch auf Ebene der Transkription bzw. RNA-Stabilität für Plakophilin 1 existieren könnte. Der *knockdown* von Plakophilin 1 resultiert in einem verminderten Gesamt-mRNA-Level der PPBP-, MAPK6- und MED10-mRNA sowie in einem erhöhten Gesamt-mRNA-Level der TSEN34-, WTIP- und VPS54-mRNA. Diese Zieltranskripte, mit Ausnahme von TSEN24 und MED10, enthalten AU-reiche Elemente im 3'-UTR, so dass ein Regulation auf Ebene der RNA-Stabilität denkbar wäre. Ob Plakophilin 1 allerdings die Stabilität oder eher die Transkription dieser mRNAs reguliert konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Nichtsdestotrotz bilden diese Daten eine Grundlage, um eine völlig neue, bisher unbekante, Funktion von Plakophilin 1 auf das Transkriptom gezielt zu erforschen.

## 6. Literaturverzeichnis

ACKER M. G., SHIN B. S., NANDA J. S., SAINI A. K., DEVER T. E. und LORSCH J. R. (2009). "Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation." J Mol Biol **385**(2): 491-506.

AIGNER K., DESCOVICH L., MIKULA M., SULTAN A., DAMPIER B., BONNE S., VAN ROY F., MIKULITS W., SCHREIBER M., BRABLETZ T., SOMMERGRUBER W., SCHWEIFER N., WERNITZNIG A., BEUG H., FOISNER R. und EGER A. (2007). "The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression." FEBS Lett **581**(8): 1617-1624.

ALI I. K., MCKENDRICK L., MORLEY S. J. und JACKSON R. J. (2001). "Truncated initiation factor eIF4G lacking an eIF4E binding site can support capped mRNA translation." EMBO J **20**(15): 4233-4242.

ANDERSON P. und KEDERSHA N. (2002). "Stressful initiations." J Cell Sci **115**(Pt 16): 3227-3234.

ASANO K., CLAYTON J., SHALEV A. und HINNEBUSCH A. G. (2000). "A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo." Genes Dev **14**(19): 2534-2546.

BAIROCH A., APWEILER R., WU C. H., BARKER W. C., BOECKMANN B., FERRO S., GASTEIGER E., HUANG H., LOPEZ R., MAGRANE M., MARTIN M. J., NATALE D. A., O'DONOVAN C., REDASCHI N. und YEHL L. S. (2005). "The Universal Protein Resource (UniProt)." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D154-159.

BALVAY L., SOTO RIFO R., RICCI E. P., DECIMO D. und OHLMANN T. (2009). "Structural and functional diversity of viral IRESes." Biochim Biophys Acta **1789**(9-10): 542-557.

BASS-ZUBEK A. E., HOBBS R. P., AMARGO E. V., GARCIA N. J., HSIEH S. N., CHEN X., WAHL J. K., 3RD, DENNING M. F. und GREEN K. J. (2008). "Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly." J Cell Biol **181**(4): 605-613.

BAUER C., DIESINGER I., BRASS N., STEINHART H., IRO H. und MEESE E. U. (2001). "Translation initiation factor eIF-4G is immunogenic, overexpressed, and amplified in patients with squamous cell lung carcinoma." Cancer **92**(4): 822-829.

BERTANI G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **62**(3): 293-300.

BI X. und 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**(23): 17740-17746.

BONEKAMP N. A., VORMUND K., JACOB R. und SCHRADER M. (2010). "Dynamin-like protein 1 at the Golgi complex: a novel component of the sorting/targeting machinery en route to the plasma membrane." Exp Cell Res **316**(20): 3454-3467.

BONNE S., GILBERT B., HATZFELD M., CHEN X., GREEN K. J. und VAN ROY F. (2003). "Defining desmosomal plakophilin-3 interactions." J Cell Biol **161**(2): 403-416.

BONNE S., VAN HENGEL J., NOLLET F., KOOLS P. und 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.

BORNSLAEGER E. A., GODSEL L. M., CORCORAN C. M., PARK J. K., HATZFELD M., KOWALCZYK A. P. und 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**(Pt 4): 727-738.

BOUKAMP P., PETRUSSEVSKA R. T., BREITKREUTZ D., HORNUNG J., MARKHAM A. und FUSENIG N. E. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." J Cell Biol **106**(3): 761-771.

BOYCE A. E., MCGRATH J. A., TECHANUKUL T., MURRELL D. F., CHOW C. W., MCGREGOR L. und WARREN L. J. (2012). "Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome due to a new homozygous internal deletion mutation in the PKP1 gene." Australas J Dermatol **53**(1): 61-65.

- BREUNINGER S., REIDENBACH S., SAUER C. G., STROBEL P., PFITZENMAIER J., TROJAN L. und HOFMANN I. (2010). "Desmosomal plakophilins in the prostate and prostatic adenocarcinomas: implications for diagnosis and tumor progression." Am J Pathol **176**(5): 2509-2519.
- BROWNING K. S., GALLIE D. R., HERSHEY J. W., HINNEBUSCH A. G., MAITRA U., MERRICK W. C. und NORBURY C. (2001). "Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3." Trends Biochem Sci **26**(5): 284.
- BROWNSTEIN M. J. und KHODURSKY A. B. (2003). "Functional Genomics: Methods and Protocols." Humana Press **224**: 79-87.
- BURATTI E., TISMINETZKY S., ZOTTI M. und BARALLE F. E. (1998). "Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3." Nucleic Acids Res **26**(13): 3179-3187.
- CHEN C. Y. und SHYU A. B. (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." Trends Biochem Sci **20**(11): 465-470.
- CHEN J. J. (2007). "Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias." Blood **109**(7): 2693-2699.
- CHEN L., CHAN T. H., YUAN Y. F., HU L., HUANG J., MA S., WANG J., DONG S. S., TANG K. H., XIE D., LI Y. und GUAN X. Y. (2010). "CHD1L promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis in mice and is associated with these processes in human patients." J Clin Invest **120**(4): 1178-1191.
- CHEN X., BONNE S., HATZFELD M., VAN ROY F. und 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 **277**(12): 10512-10522.
- CHIDGEY M. und DAWSON C. (2007). "Desmosomes: a role in cancer?" Br J Cancer **96**(12): 1783-1787.
- CHO P. F., POULIN F., CHO-PARK Y. A., CHO-PARK I. B., CHICOINE J. D., LASKO P. und SONENBERG N. (2005). "A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP." Cell **121**(3): 411-423.
- CHOI H. J. und WEIS W. I. (2005). "Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1." J Mol Biol **346**(1): 367-376.
- CHOMCZYNSKI P. und SACCHI N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- COATES J. C. (2003). "Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom." Trends Cell Biol **13**(9): 463-471.
- CRAIG A. W., HAGHIGHAT A., YU A. T. und SONENBERG N. (1998). "Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation." Nature **392**(6675): 520-523.
- CULJKOVIC B., TOPISIROVIC I., SKRABANEK L., RUIZ-GUTIERREZ M. und BORDEN K. L. (2005). "eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR." J Cell Biol **169**(2): 245-256.
- CULJKOVIC B., TOPISIROVIC I., SKRABANEK L., RUIZ-GUTIERREZ M. und BORDEN K. L. (2006). "eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation." J Cell Biol **175**(3): 415-426.
- DE BENEDETTI A. und GRAFF J. R. (2004). "eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases." Oncogene **23**(18): 3189-3199.
- DE BENEDETTI A., JOSHI-BARVE S., RINKER-SCHAEFFER C. und 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**(11): 5435-5445.
- DE BREYNE S., YU Y., UNBEHAUN A., PESTOVA T. V. und HELLEN C. U. (2009). "Direct functional interaction of initiation factor eIF4G with type 1 internal ribosomal entry sites." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(23): 9197-9202.
- DE GREGORIO E., PREISS T. und HENTZE M. W. (1999). "Translation driven by an eIF4G core domain in vivo." EMBO J **18**(17): 4865-4874.

- DELVA E., TUCKER D. K. und KOWALCZYK A. P. (2009). "The desmosome." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(2): a002543.
- DENG J., HARDING H. P., RAUGHT B., GINGRAS A. C., BERLANGA J. J., SCHEUNER D., KAUFMAN R. J., RON D. und SONENBERG N. (2002). "Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation." *Curr Biol* **12**(15): 1279-1286.
- DENIZ N., LENARCIC E. M., LANDRY D. M. und THOMPSON S. R. (2009). "Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo." *RNA* **15**(5): 932-946.
- DESSAU M., HALIMI Y., EREZ T., CHOMSKY-HECHT O., CHAMOVITZ D. A. und HIRSCH J. A. (2008). "The Arabidopsis COP9 signalosome subunit 7 is a model PCI domain protein with subdomains involved in COP9 signalosome assembly." *Plant Cell* **20**(10): 2815-2834.
- DONG Z. und ZHANG J. T. (2006). "Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* **59**(3): 169-180.
- DUNCAN R., MILBURN S. C. und 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**(1): 380-388.
- EOM T., ANTAR L. N., SINGER R. H. und BASSELL G. J. (2003). "Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses." *J Neurosci* **23**(32): 10433-10444.
- ERSOY-EVANS S., ERKIN G., FASSIHI H., CHAN I., PALLER A. S., SURUCU S. und MCGRATH J. A. (2006). "Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome resulting from a new homozygous mutation, 888delC, in the desmosomal protein plakophilin 1." *Journal of the American Academy of Dermatology* **55**(1): 157-161.
- FARINA K. L., HÜTTELMAIER S., MUSUNURU K., DARNELL R. und SINGER R. H. (2003). "Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment." *J Cell Biol* **160**(1): 77-87.
- FINGAR D. C., SALAMA S., TSOU C., HARLOW E. und BLENIS J. (2002). "Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E." *Genes Dev* **16**(12): 1472-1487.
- FITZGERALD K. D. und SEMLER B. L. (2009). "Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus." *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 518-528.
- FUKUCHI-SHIMOGORI T., ISHII I., KASHIWAGI K., MASHIBA H., EKIMOTO H. und IGARASHI K. (1997). "Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G." *Cancer Res* **57**(22): 5041-5044.
- FURUKAWA C., DAIGO Y., ISHIKAWA N., KATO T., ITO T., TSUCHIYA E., SONE S. und NAKAMURA Y. (2005). "Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer." *Cancer Res* **65**(16): 7102-7110.
- 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. und THIERFELDER L. (2004). "Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy." *Nat Genet* **36**(11): 1162-1164.
- GEY G. O., COFFMAN W. D. und KUBICEK M. T. (1952). "Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium." *Cancer Res* **12**: 264-265.
- GODSEL L. M., HSIEH S. N., AMARGO E. V., BASS A. E., PASCOE-MCGILLICUDDY L. T., HUEN A. C., THORNE M. E., GAUDRY C. A., PARK J. K., MYUNG K., GOLDMAN R. D., CHEW T. L. und GREEN K. J. (2005). "Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin." *J Cell Biol* **171**(6): 1045-1059.
- GOLDFARB D. S., CORBETT A. H., MASON D. A., HARREMAN M. T. und ADAM S. A. (2004). "Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor." *Trends Cell Biol* **14**(9): 505-514.

- GOSAVI P., KUNDU S. T., KHAPARE N., SEHGAL L., KARKHANIS M. S. und DALAL S. N. (2011). "E-cadherin and plakoglobin recruit plakophilin3 to the cell border to initiate desmosome assembly." Cell Mol Life Sci **68**(8): 1439-1454.
- GRAFF J. R., BOGHAERT E. R., DE BENEDETTI A., TUDOR D. L., ZIMMER C. C., CHAN S. K. und ZIMMER S. G. (1995). "Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts." Int J Cancer **60**(2): 255-263.
- GRAFF J. R., KONICEK B. W., LYNCH R. L., DUMSTORF C. A., DOWLESS M. S., MCNULTY A. M., PARSONS S. H., BRAIL L. H., COLLIGAN B. M., KOOP J. W., HURST B. M., DEDDENS J. A., NEUBAUER B. L., STANCATO L. F., CARTER H. W., DOUGLASS L. E. und CARTER J. H. (2009). "eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival." Cancer Res **69**(9): 3866-3873.
- GRAFF J. R., KONICEK B. W., VINCENT T. M., LYNCH R. L., MONTEITH D., WEIR S. N., SCHWIER P., CAPEN A., GOODE R. L., DOWLESS M. S., CHEN Y., ZHANG H., SISSONS S., COX K., MCNULTY A. M., PARSONS S. H., WANG T., SAMS L., GEEGANAGE S., DOUGLASS L. E., NEUBAUER B. L., DEAN N. M., BLANCHARD K., SHOU J., STANCATO L. F., CARTER J. H. und MARCUSSEON E. G. (2007). "Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity." J Clin Invest **117**(9): 2638-2648.
- GRAHAM F. L., SMILEY J., RUSSELL W. C. und NAIRN R. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- GRATACOS F. M. und BREWER G. (2010). "The role of AUF1 in regulated mRNA decay." Wiley Interdiscip Rev RNA **1**(3): 457-473.
- GRIFO J. A., ABRAMSON R. D., SATLER C. A. und MERRICK W. C. (1984). "RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors." J Biol Chem **259**(13): 8648-8654.
- GRIFO J. A., TAHARA S. M., MORGAN M. A., SHATKIN A. J. und MERRICK W. C. (1983). "New initiation factor activity required for globin mRNA translation." J Biol Chem **258**(9): 5804-5810.
- GROSSMANN K. S., GRUND C., HUELSEN J., BEHREND M., ERDMANN B., FRANKE W. W. und BIRCHMEIER W. (2004). "Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation." J Cell Biol **167**(1): 149-160.
- GRUBER A. R., FALLMANN J., KRATOCHVILL F., KOVARIK P. und HOFACKER I. L. (2011). "AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D66-69.
- GUHANIYOGI J. und BREWER G. (2001). "Regulation of mRNA stability in mammalian cells." Gene **265**(1-2): 11-23.
- HAGHIGHAT A., MADER S., PAUSE A. und 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**(22): 5701-5709.
- HAMADA T., SOUTH A. P., MITSUHASHI Y., KINEBUCHI T., BLECK O., ASHTON G. H., HOZUMI Y., SUZUKI T., HASHIMOTO T., EADY R. A. und MCGRATH J. A. (2002). "Genotype-phenotype correlation in skin fragility-ectodermal dysplasia syndrome resulting from mutations in plakophilin 1." Exp Dermatol **11**(2): 107-114.
- HATZFELD M. (2005). "The p120 family of cell adhesion molecules." Eur J Cell Biol **84**(2-3): 205-214.
- HATZFELD M. (2007). "Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion?" Biochim Biophys Acta **1773**(1): 69-77.
- HATZFELD M., HAFFNER C., SCHULZE K. und VINZENS U. (2000). "The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization." J Cell Biol **149**(1): 209-222.
- HATZFELD M., KRISTJANSSON G. I., PLESSMANN U. und 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. und 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.
- HAY N. und SONENBERG N. (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* **18**(16): 1926-1945.
- HEID H. W., SCHMIDT A., ZIMBELMANN R., SCHAFFER S., WINTER-SIMANOWSKI S., STUMPP S., KEITH M., FIGGE U., SCHNOLZER M. und FRANKE W. W. (1994). "Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein)." *Differentiation* **58**(2): 113-131.
- HELLEN C. U. (2009). "IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry." *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 558-570.
- HERREN T., GERBER P. A. und DURU F. (2009). "Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a not so rare "disease of the desmosome" with multiple clinical presentations." *Clin Res Cardiol* **98**(3): 141-158.
- HINNEBUSCH A. G. (2006). "eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes." *Trends Biochem Sci* **31**(10): 553-562.
- HIRAKI A., SHINOHARA M., IKEBE T., NAKAMURA S., KURAHARA S. und GARROD D. R. (1996). "Immunohistochemical staining of desmosomal components in oral squamous cell carcinomas and its association with tumour behaviour." *Br J Cancer* **73**(12): 1491-1497.
- HIREMATH L. S., WEBB N. R. und RHOADS R. E. (1985). "Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein." *J Biol Chem* **260**(13): 7843-7849.
- HOFMANN I., CASELLA M., SCHNOLZER M., SCHLECHTER T., SPRING H. und 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." *Molecular Biology of the Cell* **17**(3): 1388-1398.
- HOFMANN I., MERTENS C., BRETTEL M., NIMMRICH V., SCHNOLZER M. und 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 K. und BUCHER P. (1998). "The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes." *Trends Biochem Sci* **23**(6): 204-205.
- HOLCIK M. und SONENBERG N. (2005). "Translational control in stress and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 318-327.
- HOLZ M. K., BALLIF B. A., GYGI S. P. und BLENIS J. (2005). "mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events." *Cell* **123**(4): 569-580.
- HUBER A. H., NELSON W. J. und WEIS W. I. (1997). "Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin." *Cell* **90**(5): 871-882.
- HUBER A. H. und WEIS W. I. (2001). "The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin." *Cell* **105**(3): 391-402.
- HÜTTELMAIER S., ZENKLUSEN D., LEDERER M., DICTENBERG J., LORENZ M., MENG X., BASSELL G. J., CONDEELIS J. und SINGER R. H. (2005). "Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1." *Nature* **438**(7067): 512-515.
- IMATAKA H., GRADI A. und 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**(24): 7480-7489.
- IMATAKA H. und SONENBERG N. (1997). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A." *Mol Cell Biol* **17**(12): 6940-6947.
- JACKSON R. J., HELLEN C. U. und PESTOVA T. V. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 113-127.

- JAN E., KINZY T. G. und SARNOW P. (2003). "Divergent tRNA-like element supports initiation, elongation, and termination of protein biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15410-15415.
- JAN E. und SARNOW P. (2002). "Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus." J Mol Biol **324**(5): 889-902.
- JESKE M., MORITZ B., ANDERS A. und WAHLE E. (2011). "Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels." EMBO J **30**(1): 90-103.
- JI H., FRASER C. S., YU Y., LEARY J. und DOUDNA J. A. (2004). "Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 16990-16995.
- JUNG H. und HOLT C. E. (2011). "Local translation of mRNAs in neural development." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(1): 153-165.
- KALLURI R. und WEINBERG R. A. (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.
- KAPP L. D. und LORSCH J. R. (2004). "GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2." J Mol Biol **335**(4): 923-936.
- KAPPRELL H. P., OWARIBE K. und 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**(5): 1679-1691.
- KARIM M. M., SVITKIN Y. V., KAHVEJIAN A., DE CRESCENZO G., COSTA-MATTIOLI M. und SONENBERG N. (2006). "A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(25): 9494-9499.
- KAUFMAN R. J. (1999). "Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11693-11695.
- KEDERSHA N. L., GUPTA M., LI W., MILLER I. und 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**(7): 1431-1442.
- KEIL R., WOLF A., HÜTTELMAIER S. und HATZFELD M. (2007). "Beyond regulation of cell adhesion: local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin." Cell Cycle **6**(2): 122-127.
- KELLY P. N. und STRASSER A. (2011). "The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy." Cell Death Differ **18**(9): 1414-1424.
- KEVIL C. G., DE BENEDETTI A., PAYNE D. K., COE L. L., LAROUX F. S. und ALEXANDER J. S. (1996). "Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: implications for tumor angiogenesis." Int J Cancer **65**(6): 785-790.
- KHALEGHPOUR K., KAHVEJIAN A., DE CRESCENZO G., ROY G., SVITKIN Y. V., IMATAKA H., O'CONNOR-MCCOURT M. und SONENBERG N. (2001a). "Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein." Mol Cell Biol **21**(15): 5200-5213.
- KHALEGHPOUR K., SVITKIN Y. V., CRAIG A. W., DEMARIA C. T., DEO R. C., BURLEY S. K. und SONENBERG N. (2001b). "Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2." Mol Cell **7**(1): 205-216.
- KIDD A. R., 3RD, MISKOWSKI J. A., SIEGFRIED K. R., SAWA H. und KIMBLE J. (2005). "A beta-catenin identified by functional rather than sequence criteria and its role in Wnt/MAPK signaling." Cell **121**(5): 761-772.
- KIEFT J. S., ZHOU K., JUBIN R. und DOUDNA J. A. (2001). "Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA." RNA **7**(2): 194-206.
- KILEDJIAN M., DEMARIA C. T., BREWER G. und NOVICK K. (1997). "Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex." Mol Cell Biol **17**(8): 4870-4876.

- KIM J., GUERMAH M., MCGINTY R. K., LEE J. S., TANG Z., MILNE T. A., SHILATIFARD A., MUIR T. W. und ROEDER R. G. (2009). "RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells." Cell **137**(3): 459-471.
- KIM J., GUERMAH M. und ROEDER R. G. (2010). "The human PAF1 complex acts in chromatin transcription elongation both independently and cooperatively with SII/TFIIS." Cell **140**(4): 491-503.
- KIM T., HOFMANN K., VON ARNIM A. G. und CHAMOVITZ D. A. (2001). "PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways." Trends Plant Sci **6**(8): 379-386.
- KIMBALL S. R. (1999). "Eukaryotic initiation factor eIF2." Int J Biochem Cell Biol **31**(1): 25-29.
- KIMBALL S. R. (2001). "Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells." Prog Mol Subcell Biol **26**: 155-184.
- KOLUPAEVA V. G., LOMAKIN I. B., PESTOVA T. V. und HELLEN C. U. (2003). "Eukaryotic initiation factors 4G and 4A mediate conformational changes downstream of the initiation codon of the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site." Mol Cell Biol **23**(2): 687-698.
- KOLUPAEVA V. G., PESTOVA T. V., HELLEN C. U. und SHATSKY I. N. (1998). "Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA." J Biol Chem **273**(29): 18599-18604.
- KORNEEVA N. L., FIRST E. A., BENOIT C. A. und RHOADS R. E. (2005). "Interaction between the NH<sub>2</sub>-terminal domain of eIF4A and the central domain of eIF4G modulates RNA-stimulated ATPase activity." J Biol Chem **280**(3): 1872-1881.
- KORNEEVA N. L., LAMPHEAR B. J., HENNIGAN F. L., MERRICK W. C. und RHOADS R. E. (2001). "Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1." J Biol Chem **276**(4): 2872-2879.
- KORNEEVA N. L., LAMPHEAR B. J., HENNIGAN F. L. und RHOADS R. E. (2000). "Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1." J Biol Chem **275**(52): 41369-41376.
- KOROMILAS A. E., LAZARIS-KARATZAS A. und SONENBERG N. (1992). "mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E." EMBO J **11**(11): 4153-4158.
- KOUBA T., RUTKAI E., KARASKOVA M. und VALASEK L. S. (2012). "The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes." Nucleic Acids Research **40**(6): 2683-2699.
- KOWALCZYK A. P., HATZFELD M., BORNSLAEGER E. A., KOPP D. S., BORGHARDT J. E., CORCORAN C. M., SETTLER A. und 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**(26): 18145-18148.
- KUNDU S. T., GOSAVI P., KHAPARE N., PATEL R., HOSING A. S., MARU G. B., INGLE A., DECAPRIO J. A. und DALAL S. N. (2008). "Plakophilin3 downregulation leads to a decrease in cell adhesion and promotes metastasis." Int J Cancer **123**(10): 2303-2314.
- LAEMMLI U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- LAMPHEAR B. J., KIRCHWEGER R., SKERN T. und 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**(37): 21975-21983.
- LAPLANTE M. und SABATINI D. M. (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.
- LAPUCCI A., DONNINI M., PAPUCCI L., WITORT E., TEMPESTINI A., BEVILACQUA A., NICOLIN A., BREWER G., SCHIAVONE N. und CAPACCIOLI S. (2002). "AUF1 Is a bcl-2 A + U-rich element-binding protein involved in bcl-2 mRNA destabilization during apoptosis." J Biol Chem **277**(18): 16139-16146.

- LARSSON O., LI S., ISSAENKO O. A., AVDULOV S., PETERSON M., SMITH K., BITTERMAN P. B. und POLUNOVSKY V. A. (2007). "Eukaryotic translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors." Cancer Res **67**(14): 6814-6824.
- LAZARIS-KARATZAS A., MONTINE K. S. und SONENBERG N. (1990). "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap." Nature **345**(6275): 544-547.
- LE H., TANGUAY R. L., BALASTA M. L., WEI C. C., BROWNING K. S., METZ A. M., GOSS D. J. und GALLIE D. R. (1997). "Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity." J Biol Chem **272**(26): 16247-16255.
- LEFEBVRE A. K., KORNEEVA N. L., TRUTSCHL M., CVEK U., DUZAN R. D., BRADLEY C. A., HERSHEY J. W. und RHOADS R. E. (2006). "Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit." J Biol Chem **281**(32): 22917-22932.
- LI B. D., MCDONALD J. C., NASSAR R. und DE BENEDETTI A. (1998). "Clinical outcome in stage I to III breast carcinoma and eIF4E overexpression." Ann Surg **227**(5): 756-756l; discussion 761-753.
- LIVAK K. J. und 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**(4): 402-408.
- LOMAKIN I. B., HELLEN C. U. und PESTOVA T. V. (2000). "Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation." Mol Cell Biol **20**(16): 6019-6029.
- LOPEZ DE SILANES I., ZHAN M., LAL A., YANG X. und GOROSPE M. (2004). "Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2987-2992.
- MA X. M. und BLENIS J. (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-318.
- MAAG D., ALGIRE M. A. und LORSCH J. R. (2006). "Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection." J Mol Biol **356**(3): 724-737.
- MAAG D., FEKETE C. A., GRZYCZYNSKI Z. und LORSCH J. R. (2005). "A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon." Mol Cell **17**(2): 265-275.
- MADER S., LEE H., PAUSE A. und 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**(9): 4990-4997.
- MAMANE Y., PETROULAKIS E., MARTINEAU Y., SATO T. A., LARSSON O., RAJASEKHAR V. K. und SONENBERG N. (2007). "Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation." PLoS One **2**(2): e242.
- MAMANE Y., PETROULAKIS E., RONG L., YOSHIDA K., LER L. W. und SONENBERG N. (2004). "eIF4E-from translation to transformation." Oncogene **23**(18): 3172-3179.
- MANGUS D. A., EVANS M. C. und JACOBSON A. (2003). "Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression." Genome Biol **4**(7): 223.
- MARTIN P. (1997). "Wound healing-aiming for perfect skin regeneration." Science **276**(5309): 75-81.
- MARTINEAU Y., DERRY M. C., WANG X., YANAGIYA A., BERLANGA J. J., SHYU A. B., IMATAKA H., GEHRING K. und SONENBERG N. (2008). "Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation." Mol Cell Biol **28**(21): 6658-6667.
- MASUTANI M., SONENBERG N., YOKOYAMA S. und IMATAKA H. (2007). "Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3." EMBO J **26**(14): 3373-3383.

- MCGRATH J. A., MCMILLAN J. R., SHEMANKO C. S., RUNSWICK S. K., LEIGH I. M., LANE E. B., GARROD D. R. und EADY R. A. (1997). "Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome." Nat Genet **17**(2): 240-244.
- MCMILLAN J. R., HAFTEK M., AKIYAMA M., SOUTH A. P., PERROT H., MCGRATH J. A., EADY R. A. und SHIMIZU H. (2003). "Alterations in desmosome size and number coincide with the loss of keratinocyte cohesion in skin with homozygous and heterozygous defects in the desmosomal protein plakophilin 1." J Invest Dermatol **121**(1): 96-103.
- MERTENS C., HOFMANN I., WANG Z., TEICHMANN M., SEPEHRI CHONG S., SCHNOLZER M. und 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**(14): 7795-7800.
- MERTENS C., KUHN C. und FRANKE W. W. (1996). "Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque." J Cell Biol **135**(4): 1009-1025.
- METHOT N., PAUSE A., HERSHEY J. W. und SONENBERG N. (1994). "The translation initiation factor eIF-4B contains an RNA-binding region that is distinct and independent from its ribonucleoprotein consensus sequence." Mol Cell Biol **14**(4): 2307-2316.
- MOLL I., KURZEN H., LANGBEIN L. und FRANKE W. W. (1997). "The distribution of the desmosomal protein, plakophilin 1, in human skin and skin tumors." J Invest Dermatol **108**(2): 139-146.
- MONTAGNE J., STEWART M. J., STOCKER H., HAFEN E., KOZMA S. C. und THOMAS G. (1999). "Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size." Science **285**(5436): 2126-2129.
- MORINO S., IMATAKA H., SVITKIN Y. V., PESTOVA T. V. und 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**(2): 468-477.
- MORITA M., LER L. W., FABIAN M. R., SIDDIQUI N., MULLIN M., HENDERSON V. C., ALAIN T., FONSECA B. D., KARASHCHUK G., BENNETT C. F., KABUTA T., HIGASHI S., LARSSON O., TOPISIROVIC I., SMITH R. J., GINGRAS A. C. und SONENBERG N. (2012). "A novel 4EHP-GIGYF2 translational repressor complex is essential for mammalian development." Mol Cell Biol **32**(17): 3585-3593.
- MULLER J., RITT D. A., COPELAND T. D. und MORRISON D. K. (2003). "Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate." EMBO J **22**(17): 4431-4442.
- NARAYANA N., GIST J., SMITH T., TYLKA D., TROGDON G. und WAHL J. K. (2010). "Desmosomal component expression in normal, dysplastic, and oral squamous cell carcinoma." Dermatol Res Pract **2010**: 649731.
- NEUBER S., MUHMER M., WRATTEN D., KOCH P. J., MOLL R. und SCHMIDT A. (2010). "The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family." Dermatol Res Pract **2010**: 101452.
- NIELSEN K. H., BEHRENS M. A., HE Y., OLIVEIRA C. L., JENSEN L. S., HOFFMANN S. V., PEDERSEN J. S. und ANDERSEN G. R. (2011). "Synergistic activation of eIF4A by eIF4B and eIF4G." Nucleic Acids Res **39**(7): 2678-2689.
- NOBES C. D. und 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**(1): 53-62.
- ORIDATE N., KIM H. J., XU X. und LOTAN R. (2005). "Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin." Cancer Biol Ther **4**(3): 318-323.
- OSTARECK D. H., OSTARECK-LEDERER A., SHATSKY I. N. und HENTZE M. W. (2001). "Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining." Cell **104**(2): 281-290.
- OSTARECK D. H., OSTARECK-LEDERER A., WILM M., THIELE B. J., MANN M. und HENTZE M. W. (1997). "mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end." Cell **89**(4): 597-606.

- OZES A. R., FEOKTISTOVA K., AVANZINO B. C. und FRASER C. S. (2011). "Duplex unwinding and ATPase activities of the DEAD-box helicase eIF4A are coupled by eIF4G and eIF4B." J Mol Biol **412**(4): 674-687.
- PAFFENHOLZ R. und FRANKE W. W. (1997). "Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family." Differentiation **61**(5): 293-304.
- PAPAGERAKIS S., SHABANA A. H., DEPONDT J., GEHANNO P. und FOREST N. (2003). "Immunohistochemical localization of plakophilins (PKP1, PKP2, PKP3, and p0071) in primary oropharyngeal tumors: correlation with clinical parameters." Hum Pathol **34**(6): 565-572.
- PARSYAN A., SHAHBAZIAN D., MARTINEAU Y., PETROULAKIS E., ALAIN T., LARSSON O., MATHONNET G., TETTWEILER G., HELLEN C. U., PESTOVA T. V., SVITKIN Y. V. und SONENBERG N. (2009). "The helicase protein DHX29 promotes translation initiation, cell proliferation, and tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22217-22222.
- PEIFER M., BERG S. und REYNOLDS A. B. (1994). "A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles." Cell **76**(5): 789-791.
- PESTOVA T. V. und HELLEN C. U. (2003). "Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA." Genes Dev **17**(2): 181-186.
- PESTOVA T. V., HELLEN C. U. und SHATSKY I. N. (1996a). "Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry." Mol Cell Biol **16**(12): 6859-6869.
- PESTOVA T. V. und KOLUPAEVA V. G. (2002). "The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection." Genes Dev **16**(22): 2906-2922.
- PESTOVA T. V., LOMAKIN I. B. und HELLEN C. U. (2004). "Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly." EMBO Rep **5**(9): 906-913.
- PESTOVA T. V., LOMAKIN I. B., LEE J. H., CHOI S. K., DEVER T. E. und HELLEN C. U. (2000). "The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B." Nature **403**(6767): 332-335.
- PESTOVA T. V., SHATSKY I. N., FLETCHER S. P., JACKSON R. J. und HELLEN C. U. (1998). "A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs." Genes Dev **12**(1): 67-83.
- PESTOVA T. V., SHATSKY I. N. und HELLEN C. U. (1996b). "Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes." Mol Cell Biol **16**(12): 6870-6878.
- PHAN L., ZHANG X., ASANO K., ANDERSON J., VORNLOCHER H. P., GREENBERG J. R., QIN J. und HINNEBUSCH A. G. (1998). "Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5." Mol Cell Biol **18**(8): 4935-4946.
- PICK E., HOFMANN K. und GLICKMAN M. H. (2009). "PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika." Mol Cell **35**(3): 260-264.
- PISAREV A. V., HELLEN C. U. und PESTOVA T. V. (2007). "Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes." Cell **131**(2): 286-299.
- PORSTMANN T., TERNYNCK T. und AVRAMEAS S. (1985). "Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response." J Immunol Methods **82**(1): 169-179.
- PYRONNET S., IMATAKA H., GINGRAS A. C., FUKUNAGA R., HUNTER T. und SONENBERG N. (1999). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E." EMBO J **18**(1): 270-279.
- RAUGHT B., PEIRETTI F., GINGRAS A. C., LIVINGSTONE M., SHAHBAZIAN D., MAYEUR G. L., POLAKIEWICZ R. D., SONENBERG N. und HERSHEY J. W. (2004). "Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases." EMBO J **23**(8): 1761-1769.

- RIEGER-CHRIST K. M., NG L., HANLEY R. S., DURRANI O., MA H., YEE A. S., LIBERTINO J. A. und SUMMERHAYES I. C. (2005). "Restoration of plakoglobin expression in bladder carcinoma cell lines suppresses cell migration and tumorigenic potential." *Br J Cancer* **92**(12): 2153-2159.
- RIGGLEMAN B., WIESCHAUS E. und 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**(1): 96-113.
- RINKER-SCHAEFFER C. W., GRAFF J. R., DE BENEDETTI A., ZIMMER S. G. und RHOADS R. E. (1993). "Decreasing the level of translation initiation factor 4E with antisense RNA causes reversal of ras-mediated transformation and tumorigenesis of cloned rat embryo fibroblasts." *Int J Cancer* **55**(5): 841-847.
- ROGERS G. W., JR., RICHTER N. J., LIMA W. F. und MERRICK W. C. (2001). "Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F." *J Biol Chem* **276**(33): 30914-30922.
- RON D. (2002). "Translational control in the endoplasmic reticulum stress response." *J Clin Invest* **110**(10): 1383-1388.
- ROSS A. F., OLEJNIKOV Y., KISLAUSKIS E. H., TANEJA K. L. und SINGER R. H. (1997). "Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein." *Mol Cell Biol* **17**(4): 2158-2165.
- ROUSSEAU D., KASPAR R., ROSENWALD I., GEHRKE L. und SONENBERG N. (1996). "Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1065-1070.
- ROWLANDS A. G., PANNIERS R. und HENSHAW E. C. (1988). "The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2." *J Biol Chem* **263**(12): 5526-5533.
- ROY G., DE CRESCENZO G., KHALEGHPOUR K., KAHVEJIAN A., O'CONNOR-MCCOURT M. und SONENBERG N. (2002). "Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs." *Mol Cell Biol* **22**(11): 3769-3782.
- ROZEN F., EDERY I., MEEROVITCH K., DEVER T. E., MERRICK W. C. und SONENBERG N. (1990). "Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F." *Mol Cell Biol* **10**(3): 1134-1144.
- SAIKI R. K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K. B., HORN G. T., ERLICH H. A. und ARNHEIM N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- SANCHEZ-PALENCIA A., GOMEZ-MORALES M., GOMEZ-CAPILLA J. A., PEDRAZA V., BOYERO L., ROSELL R. und FAREZ-VIDAL M. E. (2011). "Gene expression profiling reveals novel biomarkers in nonsmall cell lung cancer." *Int J Cancer* **129**(2): 355-364.
- SANTEL A. und FRANK S. (2008). "Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1." *IUBMB Life* **60**(7): 448-455.
- SARNOW P. (1989). "Translation of glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy-chain binding protein mRNA is increased in poliovirus-infected cells at a time when cap-dependent translation of cellular mRNAs is inhibited." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15): 5795-5799.
- SCHEEL H. und HOFMANN K. (2005). "Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes." *BMC Bioinformatics* **6**: 71.
- SCHEPER G. C., MORRICE N. A., KLEIJN M. und PROUD C. G. (2001). "The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells." *Mol Cell Biol* **21**(3): 743-754.
- SCHMIDT A. und JAGER S. (2005). "Plakophilins - hard work in the desmosome, recreation in the nucleus?" *European Journal of Cell Biology* **84**(2-3): 189-204.
- SCHMIDT A., LANGBEIN L., PRATZEL S., RODE M., RACKWITZ H. R. und FRANKE W. W. (1999). "Plakophilin 3-a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein." *Differentiation* **64**(5): 291-306.

- SCHMIDT A., LANGBEIN L., RODE M., PRATZEL S., ZIMBELMANN R. und FRANKE W. W. (1997). "Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components." Cell Tissue Res **290**(3): 481-499.
- SCHMITT-GRAEFF A., KOENINGER A., OLSCHESKI M., HAXELMANS S., NITSCHKE R., BOCHATON-PIALLAT M. L., LIFSCHITZ-MERCER B., GABBIANI G., LANGBEIN L. und CZERNOBILSKY B. (2007). "The Ki67+ proliferation index correlates with increased cellular retinol-binding protein-1 and the coordinated loss of plakophilin-1 and desmoplakin during progression of cervical squamous lesions." Histopathology **51**(1): 87-97.
- SCHONICHEN A. und GEYER M. (2010). "Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins." Biochim Biophys Acta **1803**(2): 152-163.
- SCHWARZ J., AYIM A., SCHMIDT A., JAGER S., KOCH S., BAUMANN R., DUNNE A. A. und MOLL R. (2006). "Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation." Hum Pathol **37**(5): 613-622.
- SCHWARZ K. W., MURRAY M. T., SYLORA R., SOHN R. L. und DULCHAVSKY S. A. (2002). "Augmentation of wound healing with translation initiation factor eIF4E mRNA." J Surg Res **103**(2): 175-182.
- SHIMA H., PENDE M., CHEN Y., FUMAGALLI S., THOMAS G. und 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**(22): 6649-6659.
- SILVERA D., ARJU R., DARVISHIAN F., LEVINE P. H., ZOLFAGHARI L., GOLDBERG J., HOCHMAN T., FORMENTI S. C. und SCHNEIDER R. J. (2009). "Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer." Nat Cell Biol **11**(7): 903-908.
- SILVERA D., FORMENTI S. C. und SCHNEIDER R. J. (2010). "Translational control in cancer." Nat Rev Cancer **10**(4): 254-266.
- SIROTKIN H., O'DONNELL H., DASGUPTA R., HALFORD S., ST JORE B., PUECH A., PARIMOO S., MORROW B., SKOULTCHI A., WEISSMAN S. M., SCAMBLER P. und KUCHERLAPATI R. (1997). "Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome." Genomics **41**(1): 75-83.
- SIZOVA D. V., KOLUPAEVA V. G., PESTOVA T. V., SHATSKY I. N. und HELLEN C. U. (1998). "Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs." J Virol **72**(6): 4775-4782.
- SKLYAROVA T., BONNE S., D'HOOGHE P., DENECKER G., GOOSSENS S., DE RYCKE R., BORGONIE G., BOSL M., VAN ROY F. und VAN HENGEL J. (2008). "Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation." J Invest Dermatol **128**(6): 1375-1385.
- SMITH E. A. und FUCHS E. (1998). "Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes." J Cell Biol **141**(5): 1229-1241.
- SOBOLIK-DELMARE T., KATAFIASZ D., KEIM S. A., MAHONEY M. G. und WAHL J. K., 3RD (2007). "Decreased plakophilin-1 expression promotes increased motility in head and neck squamous cell carcinoma cells." Cell Commun Adhes **14**(2-3): 99-109.
- SOBOLIK-DELMARE T., KATAFIASZ D. und WAHL J. K., 3RD (2006). "Carboxyl terminus of Plakophilin-1 recruits it to plasma membrane, whereas amino terminus recruits desmoplakin and promotes desmosome assembly." J Biol Chem **281**(25): 16962-16970.
- SOBOLIK-DELMARE T., REDDY R., PASHAJ A., ROBERTS B. J. und WAHL J. K., 3RD (2010). "Plakophilin-1 localizes to the nucleus and interacts with single-stranded DNA." J Invest Dermatol **130**(11): 2638-2646.
- SONENBERG N. und HINNEBUSCH A. G. (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets." Cell **136**(4): 731-745.
- 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. und MCGRATH J. A. (2003). "Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3303-3314.

- SPAHN C. M., KIEFT J. S., GRASSUCCI R. A., PENCZEK P. A., ZHOU K., DOUDNA J. A. und FRANK J. (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit." Science **291**(5510): 1959-1962.
- SPRECHER E., MOLHO-PESSACH V., INGBER A., SAGI E., INDELMAN M. und BERGMAN R. (2004). "Homozygous splice site mutations in PKP1 result in loss of epidermal plakophilin 1 expression and underlie ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome in two consanguineous families." J Invest Dermatol **122**(3): 647-651.
- SPRIGGS K. A., STONELEY M., BUSHELL M. und WILLIS A. E. (2008). "Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate." Biol Cell **100**(1): 27-38.
- STRIEGL H., ANDRADE-NAVARRO M. A. und HEINEMANN U. (2010). "Armadillo motifs involved in vesicular transport." PLoS One **5**(2): e8991.
- SVITKIN Y. V., PAUSE A., HAGHIGHAT A., PYRONNET S., WITHERELL G., BELSHAM G. J. und 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**(3): 382-394.
- TANAKA A., LAI-CHEONG J. E., CAFE M. E., GONTIJO B., SALOMAO P. R., PEREIRA L. und MCGRATH J. A. (2009). "Novel truncating mutations in PKP1 and DSP cause similar skin phenotypes in two Brazilian families." Br J Dermatol **160**(3): 692-697.
- TERENIN I. M., DMITRIEV S. E., ANDREEV D. E. und SHATSKY I. N. (2008). "Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2." Nat Struct Mol Biol **15**(8): 836-841.
- TEWARI R., BAILES E., BUNTING K. A. und COATES J. C. (2010). "Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures." Trends Cell Biol **20**(8): 470-481.
- THOMPSON S. R., GULYAS K. D. und SARNOW P. (2001). "Internal initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 12972-12977.
- TOPISIROVIC I., RUIZ-GUTIERREZ M. und BORDEN K. L. (2004). "Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities." Cancer Res **64**(23): 8639-8642.
- UNBEHAUN A., BORUKHOV S. I., HELLEN C. U. und PESTOVA T. V. (2004). "Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP." Genes Dev **18**(24): 3078-3093.
- UNIACKE J., HOLTERMAN C. E., LACHANCE G., FRANOVIC A., JACOB M. D., FABIAN M. R., PAYETTE J., HOLCIK M., PAUSE A. und LEE S. (2012). "An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery." Nature **486**(7401): 126-129.
- VALASEK L., NIELSEN K. H. und HINNEBUSCH A. G. (2002). "Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo." EMBO J **21**(21): 5886-5898.
- VALASEK L., NIELSEN K. H., ZHANG F., FEKETE C. A. und HINNEBUSCH A. G. (2004). "Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection." Mol Cell Biol **24**(21): 9437-9455.
- VALASEK L. S. (2012). "'Ribozoomin'-translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs)." Curr Protein Pept Sci **13**(4): 305-330.
- VALENTA T., HAUSMANN G. und BASLER K. (2012). "The many faces and functions of beta-catenin." EMBO J **31**(12): 2714-2736.
- VANDEWALLE C., COMIJN J., DE CRAENE B., VERMASSEN P., BRUYNEEL E., ANDERSEN H., TULCHINSKY E., VAN ROY F. und BERX G. (2005). "SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions." Nucleic Acids Res **33**(20): 6566-6578.
- VEIS D. J., SORENSON C. M., SHUTTER J. R. und KORSMEYER S. J. (1993). "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair." Cell **75**(2): 229-240.

- VILLARET D. B., WANG T., DILLON D., XU J., SIVAM D., CHEEVER M. A. und 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**(3 Pt 1): 374-381.
- VON DER HAAR T., GROSS J. D., WAGNER G. und MCCARTHY J. E. (2004). "The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression." Nat Struct Mol Biol **11**(6): 503-511.
- VYAS K., CHAUDHURI S., LEAMAN D. W., KOMAR A. A., MUSIYENKO A., BARIK S. und MAZUMDER B. (2009). "Genome-wide polysome profiling reveals an inflammation-responsive posttranscriptional operon in gamma interferon-activated monocytes." Mol Cell Biol **29**(2): 458-470.
- WAHL J. K., 3RD (2005). "A role for plakophilin-1 in the initiation of desmosome assembly." J Cell Biochem **96**(2): 390-403.
- WASKIEWICZ A. J., JOHNSON J. C., PENN B., MAHALINGAM M., KIMBALL S. R. und COOPER J. A. (1999). "Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo." Mol Cell Biol **19**(3): 1871-1880.
- WEI C. C., BALASTA M. L., REN J. und GOSS D. J. (1998). "Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues." Biochemistry **37**(7): 1910-1916.
- WELLS S. E., HILLNER P. E., VALE R. D. und SACHS A. B. (1998). "Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors." Mol Cell **2**(1): 135-140.
- WENDEL H. G., SILVA R. L., MALINA A., MILLS J. R., ZHU H., UEDA T., WATANABE-FUKUNAGA R., FUKUNAGA R., TERUYA-FELDSTEIN J., PELLETIER J. und LOWE S. W. (2007). "Dissecting eIF4E action in tumorigenesis." Genes Dev **21**(24): 3232-3237.
- WHITE R. J. (2011). "Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought." Nat Rev Genet **12**(7): 459-463.
- WILSON J. E., PESTOVA T. V., HELLEN C. U. und SARNOW P. (2000a). "Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome." Cell **102**(4): 511-520.
- WILSON J. E., POWELL M. J., HOOVER S. E. und SARNOW P. (2000b). "Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites." Mol Cell Biol **20**(14): 4990-4999.
- WOLF A. (2009). "Zytoplasmatische Funktionen der Armadillo-repeat Proteine Plakophilin1 und p0071." Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie.
- WOLF A. und HATZFELD M. (2010). "A role of plakophilins in the regulation of translation." Cell Cycle **9**(15): 2973-2978.
- WOLF A., KEIL R., GOTZL O., MUN A., SCHWARZE K., LEDERER M., HÜTTELMAIER S. und HATZFELD M. (2006). "The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis." Nat Cell Biol **8**(12): 1432-1440.
- WOLF A., KRAUSE-GRUSZCZYNSKA M., BIRKENMEIER O., OSTARECK-LEDERER A., HÜTTELMAIER S. und HATZFELD M. (2010). "Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity." J Cell Biol **188**(4): 463-471.
- WU X. und BREWER G. (2012). "The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0." Gene **500**(1): 10-21.
- YAHALOM A., KIM T. H., WINTER E., KARNIOL B., VON ARNIM A. G. und CHAMOVITZ D. A. (2001). "Arabidopsis eIF3e (INT-6) associates with both eIF3c and the COP9 signalosome subunit CSN7." J Biol Chem **276**(1): 334-340.
- YAN M., RAYAPURAM N. und SUBRAMANI S. (2005). "The control of peroxisome number and size during division and proliferation." Curr Opin Cell Biol **17**(4): 376-383.
- YAP A. S., NIESSEN C. M. und 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**(3): 779-789.

ZHANG H. L., EOM T., OLEYNIKOV Y., SHENOY S. M., LIEBELT D. A., DICTENBERG J. B., SINGER R. H. und BASSELL G. J. (2001). "Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility." Neuron **31**(2): 261-275.

ZHOU C., ARSLAN F., WEE S., KRISHNAN S., IVANOV A. R., OLIVA A., LEATHERWOOD J. und WOLF D. A. (2005). "PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes." BMC Biol **3**: 14.

ZHOU J., LIYANAGE U., MEDINA M., HO C., SIMMONS A. D., LOVETT M. und KOSIK K. S. (1997). "Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family." Neuroreport **8**(8): 2085-2090.

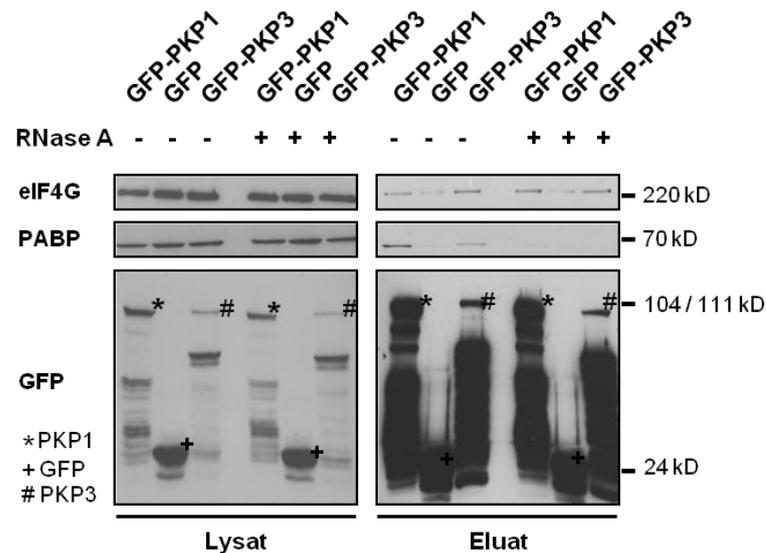
ZHOU M., SANDERCOCK A. M., FRASER C. S., RIDLOVA G., STEPHENS E., SCHENAUER M. R., YOKOIFONG T., BARSKY D., LEARY J. A., HERSHEY J. W., DOUDNA J. A. und ROBINSON C. V. (2008). "Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(47): 18139-18144.

ZHU B., MANDAL S. S., PHAM A. D., ZHENG Y., ERDJUMENT-BROMAGE H., BATRA S. K., TEMPST P. und REINBERG D. (2005). "The human PAF complex coordinates transcription with events downstream of RNA synthesis." Genes Dev **19**(14): 1668-1673.

ZUKER M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-3415.

## 7. Anhang

### 7.1. Ergänzende Ergebnisse



**Abb. 54 Die Interaktion zwischen Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP1 ist abhängig von der Bindung an eine gemeinsame RNA.** HEK-293-Zellen wurden mit pEGFP-Plakophilin-1, pEGFP-Plakophilin-3 und pEGFP transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit nicht-denaturierendem Puffer lysiert. Das Zelllysate wurde mit bzw. ohne 5 µg/ml RNase A für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine GFP-Präzipitation mit GFP-Trap<sup>®</sup>\_A durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden mit 2x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Durch die Behandlung mit RNase A geht die Assoziation zwischen Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP verloren, die Assoziation mit eIF4G bleibt bestehen.

### 7.2. Geräte

**Tab. 15 Liste der verwendeten Geräte.**

Gerät	Vertrieb
ÄKTA (Monitor: UPC-900, Pumpe P-920) - FPLC-System	GE Healthcare, München
AxioCam MR Rev3 - Kamera	Carl Zeiss, Jena
ECM <sup>®</sup> 830 - Elektroporator	VWR, Darmstadt
Finnpipetten F2	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
FRAC-950 - Fraktionssammler	GE Healthcare, München
Fusion-SL - Chemilumineszenz- und Fluoreszenzsystem	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Gaulin Micron Lab 40 - Hochdruckhomogenisator	APV, Lübeck
GeneQuant 1300, Version 4281 V1.6.1 - Spektralphotometer	GE Healthcare, München
Gradientenfraktionierer	BRANDL, Gaithersburg, Maryland, USA
Heidolph Duomax 1030 - Wippschüttler	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Hera Safe - Sterilbank	Kendro, Langenselbold
Heraeus cytoperm 2 - CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Pico 17 - Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Gerät	Vertrieb
Hettich Mikro 220R - Zentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Hettich Universal 16 - Zentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
iCycler IQ5 Systems - qRT-PCR-System	Bio-Rad, München
Incucell - Inkubator	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg
Infinite 200 PRO Nano Quant - Mikroplattenlesegerät	Tecan, Männedorf, Schweiz
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mini-PROTEAN-System - Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
MultiCal pH 526 - pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Multiskan RC Microplate Reader - Mikroplattenlesegerät	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Netzgerät, 250 V	VWR, Darmstadt
Nikon Eclipse E600 - Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Nukleofektor® II - Elektroporator	Lonza, Basel, Schweiz
Optima TM L-90 K, Rotor SW40TI - Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
PerfectBlue, SEDEC S - <i>Semi-Dry</i> -Elektroblotter	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Präzisionswaage - SBC 51	Scaltec, Göttingen
SB3 Stuart - Rotator	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Schüttelinkubator 3032	GFL, Burgwedel
Sigma 2-16PK, Rotor 12151 und 12148 - Zentrifuge	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Sorvall RC-5B, Rotor SS-34 und SLA-1500 - Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax T25 - Homogenisator	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
UP 200S - Ultraschallprozessor	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow
UV-Tisch	bts Biotech Trade & Service GmbH, Kraichtal
Vortex Genie 2 - Rührschüttler	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA
Vosskühler CCD-1300-QLN - Kamera	Nikon, Düsseldorf
Wasserbad	Memmert, Shanghai, China
Zeiss Axio Observer - Mikroskop	Carl Zeiss, Jena

### 7.3. Antikörper

**Tab. 16 Liste der verwendeten Primärantikörper.** Die hier aufgelisteten Primärantikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung entweder für die Immunfluoreszenz (IF) oder für den Western Blot (WB) eingesetzt.

Name	Spezies/Typ	Verdünnung	Vertrieb
Anti-Plakophilin-1	Maus / monoklonal	WB: 1:500 IF:1:250	Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Anti-Plakophilin-3	Maus / monoklonal	WB: 1:500 IF: 1:250	Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Anti-eIF4E	Maus / monoklonal	WB 1:2000	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-eIF4E	Kaninchen / polyklonal	IF: 1:100	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-eIF4G	Maus / monoklonal	WB: 1:500	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-eIF4G	Kaninchen / polyklonal	IF: 1:200	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

Name	Spezies/Typ	Verdünnung	Vertrieb
Anti-eIF4B	Kaninchen / polyklonal	WB: 1:500 IF: 1:100	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-eIF4A1	Ziege / polyklonal	WB: 1:250	Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Anti-eIF4A	Kaninchen / polyklonal	WB: 1:1000 IF: 1:200	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-eIF3c	Kaninchen / polyklonal	WB: 1:500 IF: 1:100	Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA
Anti-PABP C1	Maus / monoklonal	WB: 1:250	Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Anti-PABP C1	Kaninchen / polyklonal	IF: 1500	Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA
Anti-p0071	Maus / monoklonal	WB: 1:25	Progen, Heidelberg
Anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus / monoklonal	WB: 1:4000	Sigma Aldrich, München
Anti-cyclinD1	Maus / monoklonal	WB: 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Cdc42	Maus / monoklonal	WB: 1:500	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-eEF2	Maus / monoklonal	WB: 1:1000	Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA
Anti-eIF4E2	Kaninchen / polyklonal	WB:1:250	Proteintech Group, Chicago, Illinois, USA
Anti-c-myc	Maus / monoklonal	WB: 1:1000	Sigma Aldrich, München
Anti-Bcl-2	Kaninchen / polyklonal	WB: 1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-HA	Kaninchen / polyklonal	IF: 1:500	Rockland, Gilbertsville, Pennsylvania, USA
Anti-GFP	Kaninchen / polyklonal	WB: 1:2000	Invitrogen, Carlsbad
Anti-FLAG-M2	Maus / monoklonal	IF: 1:1000 WB:1:2000	Sigma Aldrich, München
Anti-GST	Maus / monoklonal	WB: 1:4000	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-His	Maus / monoklonal	WB: 1:4000	Qiagen, Hilden

**Tab. 17 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.** Die Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz (IF) waren mit den angegebenen Farbstoffen und die Sekundärantikörper für den Western-Blot (WB) mit der Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert.

Name	Spezies/Typ	Verdünnung	Vertrieb
Anti-Maus HRP	Ziege / polyklonal	WB: 1:10000	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen HRP	Esel / polyklonal	WB: 1:10000	Dianova, Hamburg
Anti-Ziege HRP	Esel / polyklonal	WB: 1:10000	Dianova, Hamburg
Anti-Maus Dylight 649	Esel / polyklonal	IF: 1:250	Dianova, Hamburg
Anti-Maus Cy3	Esel / polyklonal	IF: 1:500	Dianova, Hamburg
Anti-Maus Dylight594	Esel / polyklonal	IF: 1:250	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen Dylight488	Esel / polyklonal	IF: 1:250	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen Dylight649	Esel / polyklonal	IF: 1:250	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen Cy3	Esel / polyklonal	IF: 1:500	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen Alexa488	Esel / polyklonal	IF: 1:400	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

## 7.4. Vektoren

**Tab. 18 Liste der verwendeten Vektoren.**

Vektor	exprimiertes Protein	Vertrieb/Herkunft
pVenus1-FLAG-C	FLAG- <i>tag</i>	Prof. Dr. Hüttelmaier
pVenus2-HA-C	HA- <i>tag</i>	Prof. Dr. Hüttelmaier
pDsRed-N1	DsRed	BD Biosciences, Heidelberg
pEGFP-C2	EGFP	BD Biosciences, Heidelberg

Vektor	exprimiertes Protein	Vertrieb/Herkunft
pBD	GAL4-BD	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA
pGADT7	GAL4-AD	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pGADT7-eIF4A1-c241	GAL4-AD-eIF4A1	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pGex-5X-1	GST	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
pRSETA	His <sub>6</sub> -tag	Invitrogen, Carlsbad
pcDNA5 / TO	---	Invitrogen, Carlsbad
pcDNA3-FLAG	---	Prof. Dr. Hüttelmaier
pGEM-CAT-poly(A)	CAT	Prof. Dr. Ostareck-Lederer (OSTARECK D. H. <i>et al.</i> 2001; OSTARECK D. H. <i>et al.</i> 1997), RWTH Aachen
pEMC2.1-CAT	CAT	
pGEM-HCV-IRES-CAT	CAT	
CrPV-Luc-SREmin-pA-N40	Luc	B. Moritz (JESKE M. <i>et al.</i> 2011)

Tab. 19 Liste der klonierten cDNA-Konstrukte.

Plasmid	exprimiertes Protein	Ursprungsvektor	Restriktionsendonukleasen
pVenus1-FLAG-PKP1-wt	Venus1-FLAG-Plakophilin-1-wt	pVenus1-FLAG-C	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pVenus1-FLAG-PKP1-Kopf	Venus1-FLAG-Plakophilin-1-Kopf (AS 1–286)	pVenus1-FLAG-C	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pVenus1-FLAG-PKP1-repeats	Venus1-FLAG-Plakophilin-1-repeats (AS 287–726)	pVenus1-FLAG-C	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pVenus1-FLAG-PKP3-wt	Venus1-FLAG-Plakophilin-3-wt	pVenus1-FLAG-C	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pVenus1-FLAG-PKP3-Kopf	Venus1-FLAG-Plakophilin-3-Kopf (AS 1–342)	pVenus1-FLAG-C	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pVenus1-FLAG-PKP3-repeats	Venus1-FLAG-Plakophilin-3-repeats (AS 343–797)	pVenus1-FLAG-C	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pVenus2-HA-eIF4A1	Venus2-HA-eIF4A1	pVenus2-HA-C	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pVenus2-HA-eIF4E	Venus2-HA-eIF4E	pVenus2-HA-C	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pVenus2-HA-eIF4G	Venus2-HA-eIF4G	pVenus2-HA-C	<i>SacII</i> / <i>XbaI</i>
pVenus2-HA-eIF4B	Venus2-HA-eIF4B	pVenus2-HA-C	<i>SacII</i> / <i>BamHI</i>
pVenus2-HA-PABP	Venus2-HA-PABP-C1	pVenus2-HA-C	<i>MunI</i> / <i>SalI</i>
pVenus2-HA-eIF3c-wt	Venus2-HA-eIF3c-wt	pVenus2-HA-C	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pVenus2-HA-eIF3c-NT	Venus2-HA-eIF3c-NT (AS 1–711)	pVenus2-HA-C	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pVenus2-HA-eIF3c-CT	Venus2-HA-eIF3c-CT (AS 712–913)	pVenus2-HA-C	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pVenus2-HA-eIF3c-PCI	Venus2-HA-eIF3c-PCI (AS 712–846)	pVenus2-HA-C	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pDsRed-PKP1-wt	PKP1-wt-DsRed	pDsRed-N1	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pEGFP-PKP1-wt	EGFP-Plakophilin-1	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pEGFP-PKP3-wt	EGFP-Plakophilin-3	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pBD-PKP1-wt	GAL4-BD-Plakophilin-1-wt	pBD	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pBD-PKP1-Kopf	GAL4-BD-Plakophilin-1-Kopf (AS 1–286)	pBD	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pBD-PKP1-repeats	GAL4-BD-Plakophilin-1-repeats (AS 287–726)	pBD	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pBD-PKP3-wt	GAL4-BD-Plakophilin-3-wt	pBD	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pBD-PKP3-Kopf	GAL4-BD-Plakophilin-3-Kopf (AS 1–342)	pBD	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pBD-PKP3-repeats	GAL4-BD-Plakophilin-3-	pBD	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>

Plasmid	exprimiertes Protein	Ursprungsvektor	Restriktionsendonukleasen
	<i>repeats</i> (AS 343–797)		
pGADT7-eIF4E	GAL4-AD-eIF4E	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pGADT7-eIF4G-NT	GAL4-AD-eIF4G-NT (AS 1–571)	pGADT7	<i>MunI</i> / <i>XhoI</i>
pGADT7-eIF4G-MD	GAL4-AD-eIF4G-MD (AS 572–1092)	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pGADT7-eIF4G-CT	GAL4-AD-eIF4G-CT (AS 1093–1607)	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pGADT7-eIF4A1-wt	GAL4-AD-eIF4A1	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pGADT7-eIF4B-NT	GAL4-AD-eIF4B-NT (AS 1–337)	pGADT7	<i>NdeI</i> / <i>SalI</i>
pGADT7-eIF4B-CT	GAL4-AD-eIF4B-CT (AS 3328–612)	pGADT7	<i>NdeI</i> / <i>SalI</i>
pGADT7-PABP-NT	GAL4-AD-PABPC1-NT (AS 1–370)	pGADT7	<i>MunI</i> / <i>SalI</i>
pGADT7-PABP-CT	GAL4-AD-PABPC1-CT (AS 371–636)	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pGADT7-eIF3c-wt	GAL4-AD-eIF3c-wt	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pGADT7-eIF3c-NT	GAL4-AD-eIF3c-NT (AS 1–711)	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pGADT7-eIF3c-CT	GAL4-AD-eIF3c-CT (AS 712–913)	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pGADT7-eIF3c-PCI	GAL4-AD-eIF3c-PCI (AS 712–846)	pGADT7	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pGex-PKP1-wt	GST-Plakophilin-1-wt	pGex-5X-1	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pGex-PKP3-wt	GST-Plakophilin-3-wt	pGex-5X-1	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pGex-eIF4A1-wt	GST-eIF4A1	pGex-5X-1	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pRSET-PKP3-wt	His <sub>6</sub> -Plakophilin-3-wt	pRSETA	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>
pRSET-eIF4G-NT	His <sub>6</sub> -eIF4G-NT (AS 1–571)	pRSETA	<i>MunI</i> / <i>XhoI</i>
pRSET-eIF4G-MD	His <sub>6</sub> -eIF4G-MD (AS 572–1092)	pRSETA	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pRSET-eIF4G-CT	His <sub>6</sub> -eIF4G-CT (AS 1093–1607)	pRSETA	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pRSET-eIF4B	His <sub>6</sub> -eIF4B (wt)	pRSETA	<i>EcoRV</i> / <i>HindIII</i>
pRSET-PABP	His <sub>6</sub> -PABPC1 (wt)	pRSETA	<i>MunI</i> / <i>SalI</i>
pRSET-eIF3c-wt	His <sub>6</sub> -eIF3c-wt	pRSETA	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pRSET-eIF3c-NT	His <sub>6</sub> -eIF3c-NT (AS 1–711)	pRSETA	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pRSET-eIF3c-CT	His <sub>6</sub> -eIF3c-CT (AS 712–913)	pRSETA	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pRSET-eIF3c-PCI	His <sub>6</sub> -eIF3c-PCI (AS 712–846)	pRSETA	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pCDNA3-FLAG-PKP1-wt	FLAG-Plakophilin-1-wt	pCDNA3-FLAG	<i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>
pCDNA3-FLAG-PKP3-wt	FLAG-Plakophilin-3-wt	pCDNA3-FLAG	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>

## 7.5. DNA-Oligonukleotide

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide (siehe Tab. 20 und Tab. 21) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

**Tab. 20** Liste der verwendeten DNA-Oligonukleotide zur Klonierung. Die hervorgehobenen Sequenzen markieren die Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen.

Name	Sequenz 5'→3'
PKP1-wt <i>EcoRI</i> sense	CCT GAA TTC GCC ATG AAC CAC TCG CCG CTC AAG ACC

Name	Sequenz 5'→3'
	GCC
PKP1-wt <i>XhoI antisense</i>	CTC CTC GAG TTA GAA TCG GGA GGT GAA GTT CCT GAG GCT G
PKP1-Kopf <i>XhoI antisense</i>	GCC CTC GAG TTA CTG ATA GAC CTG TTG CTT GGC AGA TTC ATC C
PKP1-repeats <i>EcoRI sense</i>	CAG GAA TTC GAG ATG GGA GGC ATC TGC AAG CTG GTG GAC CTC
PKP3-wt <i>EcoRI sense</i>	GGA GAA TTC GCC ATG CAG GAC GGT AAC TTC CTG CTG
PKP3-wt <i>SalI antisense</i>	AGG GTC GAC CTA TGG GCC CAG GAA GTC CTC CTT CCG
PKP3-Kopf <i>SalI antisense</i>	GTG GTC GAC CTA GGC CGC TCC CAG CAC CTG CAG
PKP3-repeats <i>EcoRI sense</i>	GGA GAA TTC GCC ATG CAG CAC AAG TGC TAC AGC GAT GC
eIF4E <i>EcoRI sense</i>	GAT GAA TTC GCC ATG GCG ACT GTC GAA CCG G
eIF4E <i>SalI antisense</i>	GGT GTC GAC TTA AAC AAC AAA CCT ATT TTT AGT GGT GG
eIF4A1-wt <i>EcoRI sense</i>	AAT GAA TTC GCC ATG TCT TCT GCG AGC CAG GAT TCC
eIF4A1-wt <i>SalI antisense</i>	GAC GTC GAC TCA GAT GAG GTC AGC AAC ATT GAG
eIF4G <i>SacI sense</i>	AAA CCG CGG AGC CAT GAA CAA AGC TCC ACA GTC C
eIF4G <i>XbaI antisense</i>	TTT TCT AGA TCA GTT GTG GTC AGA CTC CTC
eIF4G-NT <i>MunI sense</i>	AAA CAA TTG GCC ATG AAC AAA GCT CCA CAG TCC
eIF4G-NT <i>XhoI antisense</i>	TTT CTC GAG TTA GGG CAC ACC ACT GCC CTC
eIF4G-MD <i>EcoRI sense</i>	AAA GAA TTC GCC ATG CCA CGT CCT GAG GAA GCA
eIF4G-MD <i>XhoI antisense</i>	TTT CTC GAG CTA AAA GAG CTG GTT GTT AGA ATC GAT
eIF4G-CT <i>EcoRI sense</i>	AAA GAA TTC GCC ATG GCA CCT GGA GGG CGA CT
eIF4G-CT <i>XhoI antisense</i>	AAA CTC GAG TCA GTT GTG GTC AGA CTC CTC
eIF4B-wt <i>EcoRV sense</i>	AAA GAT ATC GCC ATG GCG GCC TCA GCA AAA AAG
eIF4B-wt <i>HindIII antisense</i>	TTT AAG CTT CTA TTC GGC ATA ATC TTC TCC CTC
eIF4B-wt <i>SacI sense</i>	AAA CCG CGG C GCC ATG GCG GCC TCA GCA AAA AAG
eIF4B-wt <i>BamHI antisense</i>	TTT GGA TCC CTA TTC GGC ATA ATC TTC TCC CTC
eIF4B-NT <i>NdeI sense</i>	CCC CAT ATG GCC ATG GCG GCC TCA GCA AAA AAG
eIF4B-NT <i>SalI antisense</i>	TTG GTC GAC CTA ACC TCT ATC ATC ACG CCT ATA ATC ATC
eIF4B-CT <i>NdeI sense</i>	CGT CAT ATG GCC ATG CCC CCC CAA AGA CCC AAA C
eIF4B-CT <i>SalI antisense</i>	TGT GTC GAC CTA TTC GGC ATA ATC TTC TCC CTC
PABPC1-wt <i>MunI sense</i>	AGC CAA TTG GAG ATG AAC CCC AGT GCC G
PABPC1-wt <i>SalI antisense</i>	TGA GTC GAC TTA AAC AGT TGG AAC ACC GGT GG
PABPC1-NT <i>SalI antisense</i>	GAT GTC GAC TTA AAC AGT TGG AAC ACC GGT GGC
PABPC1-CT <i>EcoRI sense</i>	GCT GAA TTC GCC ATG AAA GAA GAG CGC CAG GCT CAC
eIF3c-wt <i>EcoRI sense</i>	CGC GAA TTC GCC ATG TCG CGG TTT TTC ACC
eIF3c-wt <i>XhoI antisense</i>	GTG CTC GAG TCA GTA GGC CGT CTG AG
eIF3c-NT <i>XhoI antisense</i>	GTG CTC GAG TTA GCT GAT CAT GCG TCG GCG GGC
eIF3c-CT <i>EcoRI sense</i>	TT GAA TTC GCC ATG AAG CAG TTC CAC CAC CAG CTG CGC
eIF3c-PCI <i>XhoI antisense</i>	GTG CTC GAG TTA GCG GTG CAT CAC CAC TGT CTG TGT

Tab. 21 Liste der verwendeten DNA-Oligonukleotide für die qRT-PCR.

Gen	Sequenz 5'→3'
PKP1 (Maus) <i>sense</i>	CAG CCA GCA AGG GGC TGA TGT
PKP1 (Maus) <i>antisense</i>	GTG CAG CAC AGG GTG GCG AG
RPLP0 (Maus) <i>sense</i>	TTC CCA CTT ACT GAA AAG GTC AAG GC
RPLP0 (Maus) <i>antisense</i>	GCG GTT TTG CTT TTT CAT CCT GCT
eIF4B (Maus) <i>sense</i>	CAG CCG TCC CCT ACA AGT GGT G
eIF4B (Maus) <i>antisense</i>	TCC CTC CAT CCC CGG GAC CA
eIF4E2 (Maus) <i>sense</i>	GGC ACC TTT GCC TCT GTG GAG C
eIF4E2 (Maus) <i>antisense</i>	GCA GCG GGA AGC TAA GCC CT
cyclinD1 (Maus) <i>sense</i>	AAG TGT GAC CCG GAC TGC CT
cyclinD1 (Maus) <i>antisense</i>	CCC GGT GGC CCT CAG ATG TC
PPBP (Maus) <i>sense</i>	GCG CTG GCT CCC CTT ACA GC
PPBP (Maus) <i>antisense</i>	TGT GGC TAT CAC TTC CAC ATC AGC A
MAPK6 (Maus) <i>sense</i>	TGG CCT GGC ACG GAT CAT GG
MAPK6 (Maus) <i>antisense</i>	TCA TGT GCA CCT GCA AAG AGG GT

Gen	Sequenz 5'→3'
MED10 (Maus) <i>sense</i>	CGG GGC TGA GCC AGA AGC TAA A
MED10 (Maus) <i>antisense</i>	AGC TAG AGC CCT CTC CAG GCA
GADD45A (Maus) <i>sense</i>	CCG AAA GGA TGG ACA CGG TGG
GADD45A (Maus) <i>antisense</i>	GCC ACA TCC CGG TCG TCG T
TSEN34 (Maus) <i>sense</i>	CGC AAC CAT GGC TTG GCC CT
TSEN34 (Maus) <i>antisense</i>	CCA CCG GCT TCT TGG CCT C
WTIP (Maus) <i>sense</i>	TGT GGG AGA CGG CTC CGT GG
WTIP (Maus) <i>antisense</i>	GCC AAG GGC CTG CAG AAT CAT CT
VPS54(Maus) <i>sense</i>	CGA GCG TTG GAA GCA GGC TGA
VPS54(Maus) <i>antisense</i>	ACA GCA AGA CGG TTC CGA CAA CT
eEF2 (Maus) <i>sense</i>	ACG ATG AGG CCG CCA TGG GTA T
eEF2 (Maus) <i>antisense</i>	CCC AGG CGT GTA GTT GGG GC
eIF4E (Maus) <i>sense</i>	ATG GCG ACT GTG GAA CCG GA
eIF4E (Maus) <i>antisense</i>	CCA GAG TGC CCA CCT GTT CTG T
Bcl-2 (Maus) <i>sense</i>	ATG GCG CAA GCC GGG AGA AC
Bcl-2 (Maus) <i>antisense</i>	CTG GCA GCC ATG TCC CGG TG
myc (Maus) <i>sense</i>	TCC TGT ACC TCG TCC GAT TC
myc (Maus) <i>antisense</i>	GGT TTG CCT CTT CTC CAC AG
Cdc42 (Maus) <i>sense</i>	TGC CAA GAA CAA ACA GAA GC
Cdc42 (Maus) <i>antisense</i>	ACA CCT GCG GCT CTT CTT C
β-actin (Mensch) <i>sense</i>	TCC AGC CTT CCT TCC TGG GCA T
β-actin (Mensch) <i>antisense</i>	GAT GGA GGG GCC GGA CTC GT
PKP1 (Mensch) <i>sense</i>	GGA GCA GCT ACT ACT CCA AGT
PKP1 (Mensch) <i>antisense</i>	CGG CTC GCC TTG ATT TTC T
PPBP (Mensch) <i>sense</i>	TGG CGA AAG GCA AAG AGG AAA GTC
PPBP (Mensch) <i>antisense</i>	GGG AGC ATC TGG GTC CAG GCA
MAPK6 (Mensch) <i>sense</i>	GCG GGT CGG GGT TAC ATG GC
MAPK6 (Mensch) <i>antisense</i>	TGA TAC AAC GGG ACT TCT CCG ACT
MED10 (Mensch) <i>sense</i>	GCC GGG CTC AAC CAA AAG CTG AAT
MED10 (Mensch) <i>antisense</i>	GCT AGA GCC CTC TCC AGG CAC T

## 7.6. siRNAs

Die verwendeten siRNAs (siehe Tab. 22) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

**Tab. 22** Liste der verwendeten siRNAs.

siRNA	Sequenz 5'→3'
Kontrolle	UGC GCU AGG CCU CGG UUG CdTdT
PKP1 (Mensch)	GAC CAU GCG UAA CUA CUC AdTdT
PKP1 (Maus)	CAA CCG AGG UUC CAU GUA UdTdT
PKP3 (Mensch)	GAC UCC GAA AGC UCA UCU UCA dTdT
eIF3c (Mensch)	CAC AGA CAG UGG UGA UGC AdTdT

## 7.7. Verwendete Kitsysteme

In der vorliegenden Arbeit kamen folgende Kitsysteme zum Einsatz (siehe Tab. 23).

**Tab. 23** Verwendete Kitsysteme

Kitsystem	Hersteller
Amaya™ Cell Line Nucleofector™ Kit V	Lonza, Basel, Schweiz
Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Jetquick Gel Extraction Kit	Genomed, Löhne
Jetquick PCR Purification Kit	Genomed, Löhne
MEGAscript T7 Kit	Ambion, Austin, Texas, USA
MicroBC Assay: Protein Quantification Kit	Interchim, Montluçon, Frankreich

Kitsystem	Hersteller
NucleoBond® Xtra EF Midi-Präparationskit	Macherey-Nagel, Düren
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim

### 7.8. Berechnung des Vertrauenswertes (TS)

Für jede Einzelmessung (insgesamt vier Stück: jeweils Doppelbestimmung der RNA-Konzentration in der Monosomen- bzw. Polysomenfraktion) wurde der pVal-score wie folgt bestimmt. Wenn der pVal-Wert der Messung  $< 0,001$  war so wurde ein pVal-score von 0,5 festgelegt, ansonsten einer von 0. Der pVal-Wert ist dabei das Ergebnis eines t-Tests der Beads einer bestimmten RNA, gegenüber einem Set von negativen Kontroll-Beads und er gibt an, mit welcher Sicherheit die Nullhypothese, dass die gemessene Fluoreszenz dem Hintergrundsignal entstammt, abgelehnt werden kann.

Zusätzlich wurde die Standardabweichung für die einzelnen Messwerte vom Mittelwert der Doppelbestimmung ermittelt. Bei einer Standardabweichung  $< 20\%$  wurde ein SD-score von 1 festgelegt, ansonsten einer von 0.

Der Vertrauenswert (TS) ergibt sich schließlich als Summe der einzelnen pVal-scores und dem SD-score:

$$TS = \sum_{i=0}^4 (score_{pval}) + score_{SD}$$

Maximal ergibt sich also ein Vertrauenswert von 3 und minimal einer von 0, wobei die Signifikanz des ermittelten Ergebnisses umso höher liegt, je höher der resultierende Vertrauenswert ist.

### 7.9. Daten der Microarray-Analyse

**Tab. 24 Berechnung des Polysomen-Monosomen-Verhältnisses sowie der Gesamt-RNA-Konzentration der zur Microarray-Analyse eingesetzten, präparierten RNA-Proben.** Die Tabelle zeigt die Konzentration (c), das Polysomen-Monosomen-Verhältnis (PS/MS) sowie die Gesamt-RNA-Konzentration (PS+MS) der zur Microarray-Analyse eingesetzten, präparierten RNA-Proben.

	c in ng/μl	PS/MS	PS+MS in ng/μl
<b>PKP1<sub>knockdown</sub>-Probe1-MS</b>	368	0,27	469
<b>PKP1<sub>knockdown</sub>-Probe1-PS</b>	101		
<b>PKP1<sub>knockdown</sub>-Probe2-MS</b>	367	0,29	474
<b>PKP1<sub>knockdown</sub>-Probe2-PS</b>	107		
<b>Kontrolle-Probe1-MS</b>	381	0,30	495
<b>Kontrolle-Probe1-PS</b>	114		
<b>Kontrolle-Probe2-MS</b>	381	0,31	499
<b>Kontrolle-Probe2-PS</b>	118		

**Tab. 25 Daten der Microarray-Analyse I.** Vollständige Übersicht der mRNAs mit einer mindestens 1,33-fach verminderten relativen Polysomenassoziation nach PKP1-*knockdown* und einem Vertrauenswert  $\geq 2$ .

PROBE_ID	Symbol	rel. Polysomenassoziation (PKP1 <sup>knockdown</sup> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_3121687	1700029P11Rik	0,746266699	3
ILMN_2732877	1700034H14Rik	0,737006087	2,5
ILMN_2892211	2310002J15Rik	0,746188269	3
ILMN_1226476	2310004I24Rik	0,748144638	3
ILMN_1219918	2310011J03Rik	0,744801846	2
ILMN_2992403	2810452K22Rik	0,704440201	3
ILMN_2836246	3110023B02Rik	0,691538786	2,5
ILMN_2835012	5730449L18Rik	0,718344199	3
ILMN_2808336	Aes	0,744050328	2
ILMN_3159275	Ahnak	0,718932053	2,5
ILMN_1235909	Ak2	0,71601125	3
ILMN_3147944	Ap2b1	0,727313328	2
ILMN_2983714	Apitd1	0,741218388	3
ILMN_2955362	Appbp1	0,708919353	3
ILMN_1241924	Arl6ip5	0,724107444	2
ILMN_1249334	Arpc4	0,705878822	3
ILMN_1223734	Atf4	0,698406202	3
ILMN_2998139	Atg5	0,732036808	3
ILMN_2603662	B230312A22Rik	0,745005985	2
ILMN_2960822	BC085271	0,742603756	2
ILMN_3115281	Capg	0,71059323	3
ILMN_2944226	Ccdc124	0,679381259	2,5
ILMN_2669793	Ccnd1	0,657891013	3
ILMN_2754990	Cd44	0,742528622	3
ILMN_1230457	Cd99l2	0,733964549	3
ILMN_2657844	Cdc2a	0,742165695	3
ILMN_3118569	Cdc2l5	0,730385151	3
ILMN_2946862	Cdc42	0,655563323	2
ILMN_3163014	Cdc42se1	0,723005274	3
ILMN_2809202	Cdca4	0,73218186	3
ILMN_2693785	Cenph	0,696850231	3
ILMN_2722081	Clcn3	0,731550611	3
ILMN_1233809	Cmtm7	0,730711689	3
ILMN_1235186	Cox15	0,672016193	3
ILMN_1246295	Cryz1l	0,741941735	3
ILMN_3155380	Cyca	0,718264194	2
ILMN_2652909	Ddit3	0,730827713	2,5
ILMN_1227366	Dera	0,717251949	3
ILMN_1254444	Dus4l	0,747982548	3
ILMN_2589181	Eef2	0,654800151	3
ILMN_2781805	Egln2	0,694481917	3
ILMN_2753323	Eif4b	0,70642495	2
ILMN_3065816	Eif4e2	0,580500138	3
ILMN_2686044	Eif5a	0,702571126	3
ILMN_2859678	Elac2	0,731624707	3
ILMN_2744237	Emg1	0,738837595	3
ILMN_2719001	Erc8	0,745553195	3
ILMN_2717387	Fbxo36	0,72349383	3
ILMN_2776025	Fkbp1a	0,7375302	3
ILMN_2924831	Gas7	0,685565016	3
ILMN_2672297	Gcnt1	0,672519972	3
ILMN_2650812	Gdi2	0,742027583	2,5
ILMN_3100812	Gpx4	0,595701591	3
ILMN_3139405	Hbs1l	0,708803864	3
ILMN_2795040	Hist1h2ad	0,686000654	3

PROBE_ID	Symbol	rel. Polysomenassoziation (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_2981801	Hist1h2ag	0,719400055	3
ILMN_2730329	Hist1h2ah	0,68147289	3
ILMN_2847144	Hist1h2ak	0,687721023	3
ILMN_2719202	Hist1h2bf	0,710341786	3
ILMN_2891646	Hist1h2bm	0,702137668	2,5
ILMN_2951691	Hist1h3e	0,717707209	3
ILMN_1256989	Hist1h4j	0,652381946	3
ILMN_2785454	Hist2h2ab	0,569864714	3
ILMN_2788073	Hmox1	0,646749351	2,5
ILMN_2758452	Hn1	0,69517481	3
ILMN_2839973	Kat5	0,69973106	3
ILMN_1233185	Klra15	0,746362757	3
ILMN_2669869	Lin7c	0,73102309	3
ILMN_1233901	LOC100041500	0,68503126	3
ILMN_1230278	LOC100044702	0,576637566	3
ILMN_2699167	LOC100046918	0,716055581	3
ILMN_2628591	LOC100047009	0,711571223	2,5
ILMN_1255556	LOC100047214	0,725413772	2,5
ILMN_2741726	Lsm2	0,734388637	3
ILMN_2984828	Ly6e	0,656495025	3
ILMN_1238479	Mgst3	0,729691385	3
ILMN_2657857	Mpv17	0,722273435	2
ILMN_2679770	Mrpl9	0,710353371	3
ILMN_2691360	Mrps10	0,738062959	2
ILMN_2772380	Mrto4	0,734005571	3
ILMN_2900910	Myl6	0,622856157	2
ILMN_2710185	Mylc2b	0,613819608	3
ILMN_2851330	Nagk	0,74458502	3
ILMN_2691460	Ndufa5	0,711254551	2
ILMN_1227012	Ndufb4	0,743673805	2
ILMN_1224781	Ndufs2	0,715943068	2
ILMN_1234521	Ndufs4	0,67866243	3
ILMN_2640944	Ndufs4	0,745594385	3
ILMN_2681622	Nit2	0,682121183	3
ILMN_2979052	Nudt21	0,732312722	2
ILMN_2742042	Nupr1	0,739815057	3
ILMN_2975041	Nxt1	0,731778702	3
ILMN_1237644	P2rx4	0,720762539	2
ILMN_1259379	Pdzd11	0,748235733	3
ILMN_2643723	Pef1	0,747346177	3
ILMN_3109989	Pfdn4	0,71890387	3
ILMN_2863965	Pfn1	0,640970806	3
ILMN_2623216	Pgrmc1	0,72945226	3
ILMN_2861331	Pnrc2	0,689959913	3
ILMN_1245284	Polr1d	0,692463887	2
ILMN_1215772	Polr3k	0,731951046	3
ILMN_1228102	Ppbp	0,656904519	2
ILMN_2908435	Ppbp	0,732233027	3
ILMN_2647627	Ppp1cb	0,701344725	3
ILMN_3129825	Prosc	0,6906476	2,5
ILMN_2934533	Prpf19	0,638389099	2
ILMN_2793488	Psma7	0,735257428	3
ILMN_2671124	Psmb4	0,699708412	3
ILMN_2674720	Ptges3	0,719669934	3
ILMN_2928051	Rab8a	0,698389243	3
ILMN_1252850	Rbm8a	0,72096369	3
ILMN_1215212	Rhob	0,709384168	3
ILMN_2637639	Rps3	0,740275747	3
ILMN_2729771	Rrn3	0,74448335	3

PROBE_ID	Symbol	rel. Polysomenassoziation (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_2728729	Sdc4	0,719172188	3
ILMN_2647172	Serhl	0,73744759	3
ILMN_3085841	Shroom3	0,652436831	3
ILMN_2733277	Slc25a36	0,732193498	2
ILMN_2603540	Slc39a7	0,749002711	3
ILMN_1247582	Snrpa	0,735441099	3
ILMN_1244776	Snrpd3	0,585080322	3
ILMN_2728320	Spcs1	0,732932373	3
ILMN_2610531	Spr	0,747333646	3
ILMN_2990390	Sprr2k	0,73376343	3
ILMN_2776231	Sumo3	0,718692815	3
ILMN_1248569	Timm9	0,712906385	3
ILMN_2803344	Tmem143	0,739129437	2
ILMN_1234558	Tmem33	0,664937178	3
ILMN_1234112	Tomm70a	0,684948376	3
ILMN_2719460	Trmt1	0,7323723	3
ILMN_2912170	Trmt2b	0,669730794	2,5
ILMN_2916705	Tuba1a	0,688325737	3
ILMN_1255473	Txndc12	0,728733241	3
ILMN_1247173	Tyms	0,747778956	3
ILMN_2690506	Vac14	0,709399947	2,5
ILMN_2881480	Vamp3	0,677849525	3
ILMN_2429025	Wbp5	0,741428893	3
ILMN_1235834	Wbscr27	0,73537905	3
ILMN_2656894	Wdr46	0,670889567	3
ILMN_1256643	Wdr46	0,694397541	3
ILMN_2659440	Zfand2b	0,742246011	3
ILMN_2440789	Zfp330	0,745744767	3
ILMN_2966034	Zfp365	0,70768355	3
ILMN_2438078	Zfp524	0,74144487	3
ILMN_2914957	Znhit3	0,720684834	3

**Tab. 26 Daten der Microarray-Analyse II.** Vollständige Übersicht der mRNAs mit einer mindestens 1,33-fach erhöhten relativen Polysomenassoziation nach PKP1-*knockdown* und einem Vertrauenswert  $\geq 2$ .

PROBE_ID	Symbol	rel. Polysomenassoziation (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_2766279	1500010J02Rik	1,64141711	3
ILMN_2879506	2310037I24Rik	1,397299713	3
ILMN_2845980	2410001C21Rik	1,358970536	3
ILMN_2727004	3300001P08Rik	1,348938882	3
ILMN_1241522	4921505C17Rik	1,340849979	3
ILMN_2895908	4932441K18Rik	1,370775705	2,5
ILMN_2704715	6330409N04Rik	1,530551955	3
ILMN_2606136	AA691260	1,511904924	3
ILMN_2699477	Abtb1	1,380434262	2
ILMN_1241610	Adrb2	1,346156945	3
ILMN_2717696	Ahctf1	1,402923187	3
ILMN_2627299	Akap9	1,373921157	3
ILMN_2771712	Ankfy1	1,346831201	3
ILMN_2594128	Arglu1	1,476700645	3
ILMN_2786164	Arhgap1	1,390751498	3
ILMN_2652518	Atg2b	1,388635094	3
ILMN_1247682	Atp6v0a1	1,332773969	3
ILMN_2727329	Bckdha	1,526638983	2
ILMN_2611022	Bcl11b	1,384937455	2,5
ILMN_1231553	Bdh1	1,38831403	3

PROBE_ID	Symbol	rel. Polysomenassoziation (PKP1 <sup>knockdown</sup> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_2923865	Casp6	1,411431091	3
ILMN_2707308	Cct5	1,389468841	3
ILMN_2754425	Cdc5l	1,362257449	3
ILMN_2606470	Clip4	1,376815526	3
ILMN_2879995	Col17a1	1,347361601	3
ILMN_2665387	Coro1c	1,388931891	3
ILMN_2737982	Dapk1	1,385105417	2,5
ILMN_2620930	Ddb1	1,366426271	3
ILMN_2720451	Dnmt1	1,702640284	2
ILMN_1226126	Dolk	1,519708705	3
ILMN_2622345	Dyrk1a	1,359699565	3
ILMN_2605819	Egln3	1,403422997	3
ILMN_2731629	Eif1b	1,371259815	3
ILMN_2668178	Fam109a	1,393851981	3
ILMN_3132949	Fbln2	1,461071877	3
ILMN_2972232	Fbxl14	1,445739641	3
ILMN_3162369	Fbxo33	1,357897037	2
ILMN_2641669	Fem1c	1,437971597	2,5
ILMN_1255453	Gcs1	1,402297934	3
ILMN_2682362	Gemin4	1,345786404	3
ILMN_2682279	Gkap1	1,421111104	2
ILMN_2754253	Gna13	1,467993882	2
ILMN_2624544	Helb	1,384748582	3
ILMN_1226785	Homer1	1,451615096	2
ILMN_2763051	Hps6	1,378551025	2
ILMN_2716098	Hsp105	1,44426886	2
ILMN_1216764	Ier3	1,332228025	3
ILMN_2961005	Ier5l	1,484996044	3
ILMN_2651575	Ifngr1	1,396587494	2
ILMN_2834777	Irf1	1,362223787	3
ILMN_1257077	Jag1	1,404868471	2,5
ILMN_1226528	Kctd2	1,388047662	3
ILMN_1239729	Kif1b	1,350407718	2
ILMN_2670778	Kif1b	1,344547914	2
ILMN_1254031	Klf9	1,39744355	3
ILMN_2856166	Klhdc4	1,395440755	3
ILMN_2740710	Klhdc4	1,373010622	3
ILMN_2924601	Klhl17	1,338040328	2
ILMN_2647313	Klhl26	1,333750261	3
ILMN_2943176	Klhl8	1,362806088	2
ILMN_1249514	Large	1,449539568	2
ILMN_2879746	Lasp1	1,331328672	3
ILMN_2893999	Lass2	1,353049626	3
ILMN_1255510	Lmna	1,332934738	3
ILMN_1216623	LOC100047369	1,356664156	3
ILMN_1377918	LOC100048105	1,387352117	3
ILMN_2588050	LOC100048105	1,379894471	3
ILMN_2641150	LOC677144	1,33089191	2
ILMN_2672708	Lrp11	1,440170908	3
ILMN_2942276	Luzp1	1,366305961	3
ILMN_2970532	Mcm10	1,397458928	3
ILMN_2936427	Mcm4	1,444664056	3
ILMN_3128178	Med15	1,353594469	3
ILMN_2607297	Mon1a	1,547612234	2
ILMN_2829295	Mrps31	1,334585921	3
ILMN_3109573	Mterf	1,400571738	3
ILMN_2887065	Mvp	1,383299427	2,5
ILMN_2797642	Ncaph	1,345351199	3
ILMN_2718600	Nfyb	1,363919909	3

PROBE_ID	Symbol	rel. Polysomenassoziation (PKP1 <sup>knockdown</sup> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_1235500	Nup62	1,350018225	3
ILMN_2732190	Pbrm1	1,396798595	3
ILMN_2737959	Plekhm1	1,37823923	3
ILMN_1255053	Plk1	1,448299281	3
ILMN_2598548	Pole	1,365976515	2,5
ILMN_2956881	Ppp2r5d	1,382074018	3
ILMN_2611431	Ppp3ca	1,381617565	2
ILMN_1237939	Prkrir	1,401219164	3
ILMN_2635197	Psap1	1,437561542	2
ILMN_2915861	Psmd1	1,515637877	3
ILMN_2737758	Ptpns	1,395698523	3
ILMN_2770585	Pyroxd1	1,34221978	3
ILMN_3104139	Rbm12	1,421698067	2
ILMN_2680406	Rnf44	1,338743569	3
ILMN_2728118	Rrp12	1,341492337	3
ILMN_2880346	Rrp1b	1,369045696	3
ILMN_2670271	Rshl2a	1,408401758	3
ILMN_2724545	Sbk	1,331395822	3
ILMN_1215120	Sema4a	1,365205968	3
ILMN_2822850	Serpinh1	1,401042507	3
ILMN_2675811	Slc11a1	1,703428875	3
ILMN_2834915	Slc22a5	1,345749555	3
ILMN_1258159	Slc2a1	1,438199679	3
ILMN_2889274	Snx14	1,344122982	3
ILMN_2597886	Snx18	1,449312056	3
ILMN_2671671	Snx8	1,36948073	3
ILMN_2744217	Spag5	1,434004721	3
ILMN_2622605	Srr	1,534712737	3
ILMN_1240445	Stard4	1,403830295	2
ILMN_2661458	Supt5h	1,337463425	3
ILMN_2628258	Syvn1	1,376192817	3
ILMN_1241137	Taf6	1,393382769	3
ILMN_3140913	Tbc1d2	1,386189852	3
ILMN_2954881	Tcirg1	1,345297637	3
ILMN_2789239	Tgfbr3	1,421276742	3
ILMN_2697248	Tmbim6	1,330282003	3
ILMN_2894396	Tmem184a	1,335497852	3
ILMN_2463181	Tnc	1,380827946	3
ILMN_1221311	Ttyh3	1,558901217	2,5
ILMN_3004864	Unc84b	1,377391925	3
ILMN_2781353	Ush2a	1,602481171	3
ILMN_2824683	Usp4	1,358412147	3
ILMN_1227993	Vav3	1,415615285	3
ILMN_2474887	Whsc2	1,47690755	3
ILMN_2946726	Zfp212	1,464974968	3
ILMN_1253077	Zfp346	1,398441923	2
ILMN_2814051	Zfp512	1,405632293	3

**Tab. 27 Daten der Microarray-Analyse III.** Vollständige Übersicht der mRNAs mit einem mindestens 1,5-fach verminderten relativen Gesamt-mRNA-Level<sup>17</sup> nach PKP1-*knockdown* und einem Vertrauenswert  $\geq 2$ .

PROBE_ID	Symbol	rel. Gesamt-mRNA-Level (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_2879506	2310037I24Rik	0,573387866	3
ILMN_2741063	2810003C17Rik	0,557110386	3
ILMN_2704715	6330409N04Rik	0,585020592	3
ILMN_2650106	6330578E17Rik	0,6571998	3
ILMN_2517060	9630015D15Rik	0,574090705	3
ILMN_3033533	Add1	0,569639494	3
ILMN_3107228	Add1	0,653113874	3
ILMN_1245795	Ahcyl1	0,64803476	3
ILMN_2874554	Aldh4a1	0,640357469	3
ILMN_1238547	Areg	0,588312907	3
ILMN_1232762	Atox1	0,559320616	3
ILMN_2685769	AW555464	0,631357809	3
ILMN_2741677	Bach1	0,564506392	2,5
ILMN_1242176	BC008163	0,588793299	3
ILMN_2974737	BC065085	0,651931919	3
ILMN_3161878	Bid	0,659221821	3
ILMN_2617468	Chac1	0,442681663	3
ILMN_2633492	Chek2	0,647681605	3
ILMN_2682800	Cox5a	0,543878092	3
ILMN_3018017	Cxadr	0,64183889	3
ILMN_2514377	Cxadr	0,653181056	3
ILMN_2665301	Dixdc1	0,583157343	3
ILMN_2922334	Dtx4	0,61542254	3
ILMN_2605819	Egln3	0,613577466	3
ILMN_2745614	Fam134b	0,609943168	3
ILMN_3117381	Fhl1	0,467166734	3
ILMN_2713285	Fhl1	0,467791102	3
ILMN_1229680	Flrt3	0,649251834	3
ILMN_2947568	Gadd45a	0,588175219	3
ILMN_2742152	Gadd45a	0,606318536	3
ILMN_1256299	Gcnt1	0,557166647	3
ILMN_2672297	Gcnt1	0,632363215	3
ILMN_2815107	Gosr2	0,600654895	3
ILMN_2601090	Gps1	0,459307936	3
ILMN_1234702	Gpt2	0,602474113	3
ILMN_2786070	Gtf3c5	0,637104035	2,5
ILMN_2729958	Hist1h3d	0,634068864	3
ILMN_2663585	Jdp2	0,614216457	3
ILMN_1226055	Kcnk2	0,63555898	2,5
ILMN_1252006	LOC100038897	0,639373056	3
ILMN_1230278	LOC100044702	0,596849124	3
ILMN_2694153	LOC100045359	0,561161231	3
ILMN_2669699	LOC100048530	0,547327871	2,5
ILMN_2640862	Lrig1	0,60445279	3
ILMN_2681776	Mapk6	0,43785233	3
ILMN_3147112	Mapk6	0,477371567	3
ILMN_1216732	Mcl1	0,630127329	3
ILMN_2879382	Med10	0,562350972	3
ILMN_2878548	Mthfd2	0,634193089	3
ILMN_1238603	Pcolce2	0,646239201	3
ILMN_2627441	Peli1	0,65380792	2,5

<sup>17</sup> Die Gesamt-RNA-Level bezeichnet hier die Summe der RNAs die in Monosomen, Polysomen und freien RNPs vorliegen; andere mRNAs, wie zum Beispiel nukleäre mRNAs, werden nicht berücksichtigt.

PROBE_ID	Symbol	rel. Gesamt-mRNA-Level (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_2762109	Pkp1	0,325339562	3
ILMN_2630993	Ppap2b	0,431593485	3
ILMN_1228102	Ppbb	0,39437659	3
ILMN_2908435	Ppbb	0,420013798	3
ILMN_2760840	Ppp1r8	0,636121946	3
ILMN_2953411	Ppp3r1	0,606279096	3
ILMN_1237939	Prkrir	0,623613242	3
ILMN_2934533	Prpf19	0,621707155	3
ILMN_1225414	Rab5c	0,617318589	3
ILMN_1249467	Rap2c	0,458256034	3
ILMN_3135473	Rap2c	0,466635953	3
ILMN_3058391	Rap2c	0,518059422	3
ILMN_2836501	Rdh12	0,419786928	3
ILMN_1215212	Rhob	0,578022534	3
ILMN_2868579	Rnf14	0,498477249	3
ILMN_2604922	Rnf34	0,654283706	3
ILMN_3149024	Scoc	0,435259148	3
ILMN_1216231	Scoc	0,453750719	3
ILMN_2639239	Serpinf1	0,574977375	3
ILMN_2602597	Sh3rf1	0,624465418	3
ILMN_2675811	Slc11a1	0,643102369	3
ILMN_2822071	Slc25a16	0,466055559	3
ILMN_2948143	Slc7a11	0,48679417	3
ILMN_2907928	Smek2	0,656837252	3
ILMN_1221952	Steap1	0,625489426	3
ILMN_2690441	Tfb1m	0,656499116	2,5
ILMN_2745450	Tlk1	0,514566897	3
ILMN_2454204	Tnfrsf22	0,64505823	3
ILMN_2440997	Tnrc6a	0,611932392	3
ILMN_1225528	Trib3	0,344864187	3
ILMN_1221311	Ttyh3	0,531440339	2,5
ILMN_2718217	Tubb6	0,602828133	3
ILMN_2516899	Uvrag	0,607647543	3
ILMN_1227993	Vav3	0,655117218	3
ILMN_2796472	Vldlr	0,46966315	3
ILMN_2515601	Vldlr	0,509371425	3
ILMN_1218264	Vldlr	0,531946444	3
ILMN_1250815	Wsb1	0,642170181	3

**Tab. 28 Daten der Microarray-Analyse IV.** Vollständige Übersicht der mRNAs mit einem mindestens 1,5-fach erhöhten relativen Gesamt-mRNA-Level<sup>18</sup> und einem Vertrauenswert  $\geq 2$ .

PROBE_ID	Symbol	rel. Gesamt-RNA-Level (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_2650275	1810055G02Rik	1,50806744	3
ILMN_2895908	4932441K18Rik	1,80073895	2,5
ILMN_2901284	Add3	1,5223426	3
ILMN_2703427	Agrp	1,56055943	3
ILMN_3159275	Ahnak	1,60446967	2,5
ILMN_2965660	Apcdd1	1,54478857	3
ILMN_2663872	Atp6v1e1	1,51185361	3
ILMN_2796382	Cdsn	1,52738934	3
ILMN_2870295	Cldn1	1,69160436	3
ILMN_3103652	Csnk1d	1,50657639	3

<sup>18</sup> Die Gesamt-RNA-Level bezeichnet hier die Summe der RNAs die in Monosomen, Polysomen und freien RNPs vorliegen; andere mRNAs, wie zum Beispiel nukleäre mRNAs, werden nicht berücksichtigt.

PROBE_ID	Symbol	rel. Gesamt-RNA-Level (PKP1 <sub>knockdown</sub> vs. Kontrolle)	TS
ILMN_2863264	Ctdsp2	1,56463979	3
ILMN_2687586	Cxcl16	1,60526907	3
ILMN_2589181	Eef2	1,54707262	3
ILMN_2598103	Emp2	1,64783835	3
ILMN_2713305	F11r	1,5464196	3
ILMN_1225730	Fdps	1,50125999	3
ILMN_1225918	Golga1	1,60231159	2,5
ILMN_1248849	Gsta2	1,74357805	3
ILMN_1244324	Hdgf	1,50988986	3
ILMN_1242399	Hist1h2bc	2,90771937	3
ILMN_1216764	Ier3	1,65668314	3
ILMN_1243407	Klk10	1,7604592	2,5
ILMN_2654952	LOC100040592	1,54585612	3
ILMN_1224279	Mall	2,02836824	3
ILMN_2719296	Mfn1	1,92528532	3
ILMN_2950837	Mfn1	1,697346	3
ILMN_2673601	Pcgf3	1,53936595	3
ILMN_2757150	Pctk1	2,04877397	3
ILMN_2601884	Prei4	1,59953465	2,5
ILMN_2884869	Ralgps2	1,59195016	3
ILMN_2833985	Rilpl2	1,51168151	3
ILMN_2927025	Sdcbp	1,50427979	3
ILMN_2919263	Slc25a1	1,59398737	3
ILMN_2790373	Snn	1,6011392	3
ILMN_2597886	Snx18	1,5721066	3
ILMN_2699139	Sprr1b	1,53701677	3
ILMN_2515363	Tpm4	1,72028368	3
ILMN_2628175	Tsen34	3,35046405	3
ILMN_2451470	Vps54	2,01517328	3
ILMN_2424268	Wtip	2,06162278	3

### 7.10. AU-reiche Elemente der Zieltranskripte

Die Analyse der Zieltranskripte auf AU-reiche Elemente (ARE) erfolgte unter Verwendung des Programms AREsite 1.0 der Universität Wien, Institut für Theoretische Chemie (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/AREsite.cgi>, GRUBER A. R. *et al.* 2011) (siehe Tab. 29). Dabei wurden die Zieltranskripte auf folgende Motive auf Basis der entsprechenden Sequenz aus der Maus analysiert:

- AUUUA
- WWAUUUAUWW
- WUAUUUAUW
- UUAUUUAUU
- WWWAUUUUAWWWW
- WWUAUUUAUWW
- WWWWAUUUAUWWWWW
- WWWUAUUUAUWWWWW

Tab. 29 Übersicht der ARE in den identifizierten Zieltranskripten.

Zieltranskript	Motiv	Anzahl	Position (Nukleotide)
Bcl-2	AUUUA	15	2079–2083, 2102–2106, 2118–2122, 2134–2138, 2138–2142, 2142–2146, 3201–3205, 3290–3294, 3683–3687, 3972–3976, 4452–4456, 4544–4548, 5217–5221, 5941–5945, 6070–6074
	UUUAUUUAUUU (WWUAUUUAUWW)	1	2135–2145
	UUAUUUAUU	2	2136–2144, 5215–5223

Zieltranskript	Motiv	Anzahl	Position (Nukleotide)
	(WU AUUU AUU)		
	AUUU AUUU AUUU (WWWU AUUU AUWWW)	1	2134–2146
	UUU AUUU AUUU (WWW AUUU AUWWW)	1	2135–2145
	AUUU AUUU AUUU (WWW AUUU AUWWW)	1	2134–2146
	UU AUUU AUU	2	2136–2144, 5215–5223
	UU AUUU AUU (WW AUUU AUW)	2	2136–2144, 5215–5223
<b>Cdc42</b>	AUUUA	1	1435–1439
<b>eIF4E2</b>	AUUUA	4	1634–1638, 2228–2232, 2469–2473, 2817–2821
	UAAUUUAUA (WW AUUU AUW)	1	2226–2234
<b>MAPK6</b>	AUUUA	4	3547–3551, 3605–3609, 3637–3641, 3841–3845
	UU AUUU AUU (WU AUUU AUU)	1	3603–3611
	UU AUUU AUU	1	3603–3611
	UU AUUU AUU (WW AUUU AUW)	1	3603–3611
<b>MED10</b>	---	---	---
<b>TSEN34</b>	---	---	---
<b>PPBP</b>	AUUUA	1	642–646
<b>VPS54</b>	AUUUA	7	3430–3434, 3567–3571, 3629–3633, 3725–3729, 3745–3749, 3797–3801, 3917–3921
	UU AUUU AAU (WW AUUU AUW)	1	3428–3436
	UAAUUUAAA (WW AUUU AUW)	1	3743–3751
<b>WTIP</b>	AUUUA	1	1494–1498

## 7.11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Armadillo-Proteinfamilie. ....	2
Abb. 2	Schematischer Aufbau des Desmosoms. ....	3
Abb. 3	Die <i>cap</i> -abhängige Initiation der Translation. ....	11
Abb. 4	Schematische Darstellung der IRES-vermittelten Initiation der Translation. ....	15
Abb. 5	Die Überexpression von Plakophilin 3 stimuliert die globale Proteinsynthese. ....	45
Abb. 6	Reinigung von Plakophilin 3. ....	45
Abb. 7	Plakophilin 3 stimuliert die <i>cap</i> - und die EMCV-abhängige Translation <i>in vitro</i> . ....	47
Abb. 8	Reduktion der Zellzahl und der Proliferation nach <i>knockdown</i> von Plakophilin 1 und Plakophilin 3. ....	48
Abb. 9	Der <i>knockdown</i> von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität. ....	49
Abb. 10	Plakophilin 1 und Plakophilin 3 haben einen Einfluss auf die Zellgröße. ....	49
Abb. 11	Die Plakophilin-3-Kopfdomäne ist nicht toxisch und zeigt keine Autoaktivierung. ....	50

---

Abb. 12 Plakophilin 3 kann mit 7-Methyl-GTP-Sepharose präzipitiert werden. ....	52
Abb. 13 Plakophilin 1 und Plakophilin 3 assoziieren mit Komponenten des <i>cap</i> -mRNA-Bindekomplexes. ....	53
Abb. 14 Hefe-Dihybrid-Analyse zur Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E. ....	55
Abb. 15 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E im <i>GST-pulldown</i> . ....	56
Abb. 16 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E mittels BiFC. ....	57
Abb. 17 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4E mittels PLA. ....	58
Abb. 18 Schematische Darstellung der eIF4G-Fragmente. ....	59
Abb. 19 Nachweis der Assoziation von eIF4G mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mittels Hefe-Dihybrid-System. ....	60
Abb. 20 Nachweis der Assoziation von eIF4G mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mittels <i>GST-pulldown</i> . ....	61
Abb. 21 Nachweis der Interaktion von eIF4G mit Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mittels BiFC. ....	62
Abb. 22 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4G mittels PLA. ....	63
Abb. 23 Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 mittels Hefe-Dihybrid-System. ....	64
Abb. 24 Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 mittels <i>GST-pulldown</i> . ....	65
Abb. 25 Analyse der Assoziation von Plakophilin 3 und eIF4A1 <i>in vivo</i> . ....	66
Abb. 26 Schematische Darstellung der eIF4B-Fragmente. ....	67
Abb. 27 Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B im Hefe-Dihybrid-System. ....	68
Abb. 28 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B im <i>GST-pulldown</i> . ....	68
Abb. 29 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B mittels BiFC. ....	69
Abb. 30 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF4B mittels PLA. ....	70
Abb. 31 Schematische Darstellung der PABP-Fragmente. ....	72
Abb. 32 Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP mittels Hefe-Dihybrid-System. ....	72

Abb. 33 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP <i>in vitro</i> mittels GST-pulldown. ....	73
Abb. 34 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP mittels BiFC.....	74
Abb. 35 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABP mittels PLA.....	75
Abb. 36 Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels GST-pulldown. ....	77
Abb. 37 Plakophilin 3 und Plakophilin 1 kopräzipitieren mit eIF3c. ....	78
Abb. 38 Analyse der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels BiFC.....	79
Abb. 39 Nachweis der Assoziation von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit eIF3c mittels PLA.....	80
Abb. 40 Einfluss von eIF3c auf die Rekrutierung von Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex.....	81
Abb. 41 Schematische Darstellung der eIF3c-Fragmente.....	82
Abb. 42 Identifizierung der Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Bindungsstelle in eIF3c mittels Hefe-Dihybrid-Analyse. ....	83
Abb. 43 Identifizierung der Plakophilin-1- und Plakophilin-3-Bindungsstelle in eIF3c mittels GST-pulldown. ....	83
Abb. 44 Die eIF3c-Fragmente kopräzipitieren mit Plakophilin 3.....	84
Abb. 45 Einfluss der PCI-Domäne auf die Rekrutierung von Plakophilin 1 und Plakophilin 3 in den Translationsinitiationskomplex. ....	86
Abb. 46 Plakophilin 1, Plakophilin 3 und eIF3c kolokalisieren mit Poly(A)-mRNA.....	88
Abb. 47 RNAs mit einer veränderten relativen Polysomenassoziation nach Plakophilin-1-knockdown, zusammengefasst nach der Funktion der kodierten Proteine. ....	91
Abb. 48 Einfluss von Plakophilin 1 auf den Proteinlevel ausgesuchter Zielgene.....	92
Abb. 49 Der Einfluss von Plakophilin 1 auf die Proteinstabilität von Cdc42, Bcl-2 und eIF4E2. ....	93
Abb. 50 RNAs mit einem veränderten relativen Gesamt-mRNA-Level nach Plakophilin-1-knockdown, zusammengefasst nach der Funktion der kodierten Proteine. ....	95
Abb. 51 Analyse der Gesamt-mRNA-Level ausgewählter RNAs nach Plakophilin-1-knockdown.....	96
Abb. 52 Analyse der Gesamt-mRNA-Level ausgewählter RNAs nach Plakophilin-1-Überexpression.....	97
Abb. 53 Modell über die putativen Funktionen der Plakophiline 1 und 3 in der Translation. ....	109

Abb. 54 Die Interaktion zwischen Plakophilin 1 und Plakophilin 3 mit PABC1 ist abhängig von der Bindung an eine gemeinsame RNA. ....	XVI
--	-----

## 7.12. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verwendete <i>E.-coli</i> -Stämme.....	18
Tab. 2 Allgemeiner Ansatz für M9-Minimal-Agar .....	19
Tab. 3 Verwendete <i>S.-cerevisiae</i> -Stämme .....	19
Tab. 4 Verwendete humane und murine Zelllinien.....	20
Tab. 5 Allgemeiner Ansatz für die Reverse Transkription .....	21
Tab. 6 Programm für die qRT-PCR .....	23
Tab. 7 Allgemeiner Ansatz für den Restriktionsverdau .....	25
Tab. 8 Allgemeiner Ansatz für die Ligation .....	25
Tab. 9 Zusätze für DMEM/Ham's-F12- <i>low-Calcium</i> -Medium.....	28
Tab. 10 Allgemeiner Ansatz für die Calcium-Phosphat-Präzipitation (2-cm-Kulturschale).....	29
Tab. 11 Schematischer Aufbau eines <i>Semi-Dry-Western-Blots</i> .....	36
Tab. 12 Übersicht zur Expression von GST- und His <sub>6</sub> -Fusionsproteinen.....	37
Tab. 13 Zusammenfassung der Interaktionsstudien.....	86
Tab. 14 Auswahl an mRNAs, deren relativer mRNA-Level nach Plakophilin-1- <i>knockdown</i> im Vergleich zur Kontrolle in der Microarray-Analyse beeinflusst war und deren mRNA-Level mittels qRT-PCR genauer untersucht wurde.....	95
Tab. 15 Liste der verwendeten Geräte. ....	XVI
Tab. 16 Liste der verwendeten Primärantikörper.....	XVII
Tab. 17 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	XVIII
Tab. 18 Liste der verwendeten Vektoren.....	XVIII
Tab. 19 Liste der klonierten cDNA-Konstrukte.....	XIX
Tab. 20 Liste der verwendeten DNA-Oligonukleotide zur Klonierung. ....	XX
Tab. 21 Liste der verwendeten DNA-Oligonukleotide für die qRT-PCR.....	XXI
Tab. 22 Liste der verwendeten siRNAs. ....	XXII
Tab. 23 Verwendete Kitsysteme.....	XXII
Tab. 24 Berechnung des Polysomen-Monosomen-Verhältnisses sowie der Gesamt-RNA-Konzentration der zur Microarray-Analyse eingesetzten, präparierten RNA-Proben.....	XXIII
Tab. 25 Daten der Microarray-Analyse I. Vollständige Übersicht der mRNAs mit einer mindestens 1,33-fach verminderten relativen Polysomenassoziation nach PKP1- <i>knockdown</i> und einem Vertrauenswert $\geq 2$ .....	XXIV

Tab. 26 Daten der Microarray-Analyse II. Vollständige Übersicht der mRNAs mit einer mindestens 1,33-fach erhöhten relativen Polysomenassoziation nach PKP1- <i>knockdown</i> und einem Vertrauenswert $\geq 2$ .....	XXVI
Tab. 27 Daten der Microarray-Analyse III. Vollständige Übersicht der mRNAs mit einem mindestens 1,5-fach verminderten relativen Gesamt-mRNA-Level nach PKP1- <i>knockdown</i> und einem Vertrauenswert $\geq 2$ .....	XXIX
Tab. 28 Daten der Microarray-Analyse IV. Vollständige Übersicht der mRNAs mit einem mindestens 1,5-fach erhöhten relativen Gesamt-mRNA-Level und einem Vertrauenswert $\geq 2$ .....	XXX
Tab. 29 Übersicht der ARE in den identifizierten Zieltranskripten.....	XXXI

### 7.13. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
ARE	AU-reiches Element
Arg	Arginin
ARHGEF9	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 9</i>
ARVC	<i>arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy</i>
ARVCF	<i>Armaddillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome</i>
AS	Aminosäure
ASC1	alternativ für RACK1 - <i>Receptor for activated C kinase</i>
Asp	Asparaginsäure
A-Stelle	Aminoacyl-Stelle
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AUF1	<i>AU-rich element RNA-binding factor 1</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BD	Bindedomäne
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
BP	Bindeprotein
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cdc	<i>Cell division control protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CL	Chemilumineszenz
CrPV	Cricket-Paralysis-Virus

CSN	<i>COP9 signalosome complex</i>
CT	C-Terminus
C <sub>T</sub>	<i>cycle threshold</i>
C-TAK1	<i>Cdc25C-associated kinase 1</i>
Ctr9	<i>RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog</i>
cycD1	cyclin D1
D	Asparaginsäure
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dd	doppelt destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DNM-1L	<i>dynammin-1-like</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DsRed	<i>Discosoma species red fluorescent protein</i>
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDSF	<i>ectodermal dysplasia/skin fragility</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF	<i>eukaryotic elongation factor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
eIF	<i>eukaryotic initiation factor</i>
eIF2AK4	<i>eIF2<math>\alpha</math> kinase 4</i>
EMCV	Enzephalomyokarditis-Virus
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
E-Stelle	Exit-Stelle
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FXR1	<i>fragile-X-related protein 1</i>
G	Guanin
G3BP	<i>ras-GAP-SH3-binding protein</i>
GADD45A	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
H2B	Histon 2B

H3K4	Histon 3, methyliert an Lysin 4
H3K79	Histon 3, methyliert an Lysin 79
HA	Hämagglutinin-Epitop
HaCaT	<i>human adult low Calcium high temperature keratinocytes</i>
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HeLa	Menschliche Zelllinie aus Zervixkarzinomzellen der Patientin Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HK	Hauptkultur
hPaf1C	<i>human Paf1 complex</i>
HRI	<i>heme-regulated inhibitor kinase</i>
hsc	<i>heat shock cognate</i>
hsp	<i>heat shock protein</i>
HuR	<i>Hu antigen R</i>
IDP	<i>inner dense plaque</i>
IEC	<i>ion-exchange chromatography</i>
IGR	intergenische Region
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
IRP	<i>iron regulatory protein</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
L	Leucin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDH	L-Laktat-Dehydrogenase
Leo1	<i>RNA polymerase-associated protein LEO1</i>
Luc	Luciferase
MAPK6	<i>mitogen-activated protein kinase 6</i>
MD	mittlere Domäne
MED10	<i>mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10</i>
Met	Methionin
MNK	<i>MAP kinase interacting Ser/Thr kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Monosomen
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
ND	N-terminale Domäne
NPRAP	<i>neural plakophilin-related armadillo repeat protein</i>
NT	N-Terminus
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i>
OD	optische Dichte
ODP	<i>outer dense plaque</i>
OLR	offener Leserahmen
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PABC	Poly(A)-Bindepotein C-terminale Domäne
PABP	Poly(A)-Bindepotein
Paf1	<i>RNA polymerase II-associated factor 1</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>

Paip	PABP-interagierendes-Protein
PAM	<i>PABP interacting motif</i>
PAP	<i>poly(A) polymerase</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBSE	<i>phosphat-buffered saline-EDTA</i>
PCI	bezeichnet eine Proteindomäne, die in den folgenden drei Proteinkomplexen zu finden ist: Proteasom, COP9 und Initiationsfaktor 3
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PERK	<i>PKR-like endoplasmatic reticulum kinase</i>
PG	Plakoglobin
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PIC	<i>preinitiation complex</i>
PKP	Plakophilin
PKR	<i>protein kinase RNA-activated</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PM	Plasmamembran
PPBP	<i>Pro-platelet basic protein</i>
PS	Polysomen
P-Stelle	Peptidyl-Stelle
PV	Poliovirus
qRT	<i>quantitative reverse transcription</i>
R	Arginin
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
RP	<i>ribosomal protein</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
Rtf1	<i>RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S6K	<i>p70 S6 kinase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Ser	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Ski8	alternativ für <i>WD repeat-containing protein 61</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
Src	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
ss	<i>single stranded</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
SV	Säulenvolumen
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>

---

TBST	<i>Tris-buffered saline-Tween20</i>
TC	<i>ternary complex</i>
Tris	<i>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol</i>
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TS	<i>trust score, engl. für Vertrauenswert</i>
TSEN34	<i>tRNA-splicing endonuclease subunit Sen34</i>
Tub	Tubulin
U	Uracil
UAS	<i>upstream activation sequence</i>
ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierter Bereich
V1 bzw. V2	Venus1 bzw. Venus2
Vol.	Volumen
VPS54	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 54</i>
vs.	<i>versus</i>
W	Tryptophan
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
WTIP	<i>Wilms tumor protein 1-interacting protein</i>
YT	Hefeextrakt-Trypton
ZBP1	<i>zipcode binding protein 1</i>
ZEB1	<i>zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>

## Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke....

an erster Stelle Frau Prof. Dr. Hatzfeld, die mir es ermöglichte diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und die mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Wahle und Herrn Prof. Dr. Seufferlein für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Knut Krohn für die Anfertigung der Microarray-Analyse und für seine hilfreichen Kommentare zur Auswertung.

Herrn Prof. Dr. Hüttelmaier, Frau Kristin Wächter, Frau Dr. Nadine Stöhr und Herrn Marcel Köhn für Ihre Hilfe bei der Microarray-Analyse – sie unterstützten mich nicht nur bei der Präparation der RNA sondern auch bei der Auswertung der Daten.

Herrn Prof. Dr. Hüttelmaier für die Bereitstellung der BiFC-Vektoren, Frau Prof. Dr. Ostareck-Lederer für das *cap*-, EMCV- und HCV-CAT-Konstrukt, Herrn Bodo Moritz für das CrPV-Luc-Konstrukt, Herrn Prof. Dr. Magin für die Maus-Keratinocyten und Herrn Marcel Köhn für seine Hilfe bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung.

allen Mitgliedern des GRK 1591, insbesondere meinen Betreuern – es war eine überaus interessante, lehrreiche und unterhaltsame Zeit die wir gemeinsam erlebt haben.

Frau Dr. Annika Wolf für ihre Hilfe bei der Anfertigung der *In-vitro*-Translationsstudien, für zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

im Besonderen Herrn Andrej Mun, aber auch Frau Aileen Wingefeld und Herrn Jens Thomas für die Unterstützung im Labor.

allen Mitgliedern der AG Hatzfeld für die wirklich tolle Atmosphäre, für zahlreiche Kommentare und Hilfestellungen bei der Vorbereitung von Präsentationen und auch für zahlreiche schöne Abende außerhalb des Labors.

von ganzem Herzen meiner Familie, meinem Partner und all meinen Freunden für ihre bedingungslose Unterstützung, ihre permanenten Aufmunterungen und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.

## Angaben zur Person und zum Werdegang

### Persönliche Angaben:

---

Name:	Kießling
Vorname:	Christina Ann-Susann
Akademischer Grad:	Diplom-Biochemikerin
Geburtsdatum:	22.02.1985
Geburtsort:	Plauen
Geschlecht:	weiblich
Wohnsitz und Korrespondenzanschrift:	Michael-Kazmierczak-Str. 26 04157 Leipzig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Fachgebiet der Promotion:

---

Biochemie, Molekular- und Zellbiologie

### Werdegang:

---

06/2003	Abitur am Julius-Mosen-Gymnasium Oelsnitz
10/2003-08/2008	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Diplom, 08/2008  Titel der Diplomarbeit: „Rab11 - Aktivierung und Transport in der Cytokinese“; angefertigt am Institut für Molekulare Medizin, Abteilung Pathobiochemie bei Frau Prof. M. Hatzfeld
10/2008-08/2012	Anfertigung der Promotionsarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Institut für Molekulare Medizin, Abteilung Pathobiochemie in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. M. Hatzfeld  10/2008-04/2010: Wissenschaftliche Mitarbeiterin  04/2010-08/2012: Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs 1591 „Posttranscriptional control of gene expression - mechanisms and role in pathogenesis“
seit 03/2013	Mitarbeiterin in der Abteilung Forschung und Entwicklung der Catgut GmbH Markneukirchen

## **Publikationen**

Keil R., Kiessling C. and Hatzfeld M. (2009). Targeting of p0071 to the midbody depends on KIF3. *J Cell Sci.* 122, 1174-83.

## **Poster**

Christina Kiessling, A. Wolf and M. Hatzfeld, "Plakophilin3 functions in translation initiation", Gesamtarbeitsbesprechung des Biowissenschaftlichen Netzwerkes „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“, 04.-05. März 2010, Halle

Christina Kiessling, A. Wolf and M. Hatzfeld, "The role of Plakophilins 1 and 3 in translation", EMBO Conference Series on Protein Synthesis and Translational Control, 07.-11. September 2011, Heidelberg

Christina Kiessling, A. Wolf and M. Hatzfeld, "Plakophilins 1 and 3 are involved in the regulation of translation", First International Meeting of the GRK1591 "Posttranscriptional control of gene expression - mechanisms and role in pathogenesis", 15.-17. März 2012, Halle

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel und Quellen, als die hier aufgeführten, benutzt habe. Alle, den benutzten Werken, wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass ich keine, schon vergeblichen, Promotionsversuche unternommen habe und dass diese Arbeit in der gegenwärtigen Form bzw. in einer anderen Fassung keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

---

Christina Kießling