

Dissertation

**„Der Einfluss der Protein-Kinase-C auf die Regulation der
desmosomalen Proteine in Mauskeratinozyten“**

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn Marvin Erdmann Neuholz

geb. am 19.01.1993

in Lüneburg

verteidigt am 09.12.21

Gutachter: Prof. Dr. M. Hatzfeld (Halle (Saale))

Prof. Dr. M. Schutkowski (Halle (Saale))

Prof. Dr. C. Grashoff (Münster)

Inhaltsverzeichnis

Abstract (deutsch)	4
Abstract (englisch)	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1. Haut	9
1.1.1. Zell-Zell-Kontakte	11
1.1.2. Desmosomen	12
1.1.2.1. Desmoplakin (DSP bzw. DP)	13
1.1.2.2. Plakoglobin (PG bzw. JUP)	15
1.1.2.3. Plakophilin (PKP)	17
1.1.2.4. Desmocollin (Dsc) und Desmoglein (Dsg)	20
1.2. MAP-Kinase und Akt-Signaling	21
1.3. Protein-Kinase C (PKC)	24
1.3.1. Regulation der PKCs	27
1.3.2. PKCs in der Haut	28
1.3.3. PKCs und Desmosomen	30
1.4. Fragestellung	31
2. Material und Methoden	32
2.1. Zusammensetzung der Puffer, Lösungen und Medien	33
2.2. Zelllinien	34
2.3. Zellkultur	35
2.4. Stimulation durch PMA, EGF, Insulin	35
2.5. Inhibierung und EGTA Behandlung	36
2.6. Knockdown	36
2.7. Lyse und Probenvorbereitung für Western-Blot bzw. Immunpräzipitation	37
2.8. Immunpräzipitation	37
2.9. SDS-PAGE und Western-Blot	38
2.10. Präparation der Immunfluoreszenz-Färbungen	41
2.11. Quantifizierungen	41
2.12. Expressionsanalyse	43
2.12.1. RNA-Isolation	43
2.12.2. cDNA-Synthese	43
2.12.3. Real Time PCR	44
2.13. Peptid-Chip-Kinase-Array	45
3. Ergebnisse	46
3.1. Modellsystem Mauskeratinozyten	46
3.2. Phosphorylierung desmosomaler Proteine	46

3.2.1.	Stimulation von MAP-Kinasen, Akt und PKCs	46
3.2.2.	Einfluss der PMA-Stimulation auf die Lokalisation	52
3.3.	Identifikation der verantwortlichen PKC-Isoform	54
3.3.1.	Expression der PKCs in Mauskeratinozyten	54
3.3.2.	Calciumentzug	55
3.3.3.	Inhibierung der PKCs und des MAP- sowie des Akt-Signalweges	56
3.3.4.	Der Einfluss von Sotrastaurin und Gö6976 auf die Lokalisation von PKP3 und DSP und den Effekt von PMA	61
3.3.5.	Differenzierungsabhängigkeit des PMA-Effektes	68
3.3.6.	Abhängigkeit der PKP3- und DSP-Phosphorylierung von anderen desmosomalen Proteinen	69
3.3.7.	<i>Knockdown</i> der PKC-Isoformen Alpha, Delta, Eta	74
3.3.7.1.	<i>Doppelknockdown</i> PKC α und PKC δ	82
3.3.7.2.	<i>Knockdown</i> RSK im Vergleich zu PKC δ	84
3.4.	Identifizierung möglicher PKP3-Phosphorylierungsstellen	85
3.4.1.	<i>In-Vitro</i> -Phosphorylierungs-Peptid-Kinase- <i>Array</i>	85
3.4.2.	Untersuchung von PKP3-Mutanten	87
3.5.	Zusammenfassung	92
4.	Diskussion	94
5.	Literaturverzeichnis	103
6.	Anhang	122
6.1.	Tabellen	122
6.2.	Abbildungen	127
6.3.	Listen	135
6.3.1.	Geräte-Liste	135
6.3.2.	Software-Liste	136
6.4.	Literaturverzeichnis Anhang	137
	Danksagung	140
	Lebenslauf & Publikationsliste	141
	Eidesstattliche Erklärung	142

Abstract (deutsch)

Desmosomen sind hochgradig regulierte Zell-Zell-Verbindungskomplexe, die die Intermediärfilamente mit der Plasmamembran verbinden. Sie sind essentiell für die mechanische Stabilität der Haut. Stabilität, Aufbau und Calciumabhängigkeit werden über posttranslationale Modifizierungen, wie Phosphorylierungen, an den desmosomalen Proteinen reguliert. Phorbol-ester-abhängige Aktivierung der Protein-Kinase-C Familie (PKC) hatte signifikante Adhäsionsverluste über PKC α -induzierte Phosphorylierung zufolge, wobei das Augenmerk bisher auf die Modifizierung des Desmoplakin (DSP) C-Terminus gelegt wurde. Jedoch ist zurzeit weder der Einfluss der übrigen PKC-Isoformen, noch ein direkter Effekt auf andere desmosomale Proteine genauer untersucht und verstanden worden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der PKCs auf die desmosomalen Proteine der Maus systematisch untersucht. Hierbei konnte erstmalig die Bedeutung der *novel* PKC δ für die Regulation der Desmosomen in Mauskeratinozyten gezeigt werden. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)-abhängige Aktivierung der PKCs führte zur Phosphorylierung von Plakophilin 3 (PKP3) in einem RXXS/T-Motiv, sowie von DSP am Serin 177/178 (S165/166 im Menschen), eine *Site* die bisher nicht mit PKCs in Verbindung gebracht wurde. Die RXXS/T-Motive von Plakophilin 1, Plakoglobin und Desmoglein 1/2 blieben hiervon unbeeinflusst. Die Phosphorylierung von PKP3 schwächte allgemein die PKP3-Membranlokalisation und sorgte zudem für einen deutlichen Verlust dieses Proteins an den trizellulären Zellkontakten, welche bedeutend für mechanische Stabilität sind. Der *Knockdown* der *novel* PKC δ milderte diesen PMA-Phänotyp deutlich ab und verhinderte außerdem die PKP3-Phosphorylierung. Weder der *Knockdown* der klassischen PKC-Isoformen α , noch der *novel* Isoform η zeigten vergleichbare Effekte. Anhand von Daten aus *in-vitro*-Peptid-Kinase-Assays, Massenspektrometrie und datenbankgestützten Phosphorylierungsvoraussagen wurden potentielle PKC δ -phosphorylierbare PKP3-*Sites* ausgewählt und zu Alanin mutiert. Über Austausch von Serin zu Alanin am Motiv S313/314 kam es zu einer deutlichen Reduktion des PKP3-Phosphorylierungssignals. Eine Phospho-Mimikmutante (Glutamat) dieses Motivs zeigte zudem verringerte PKP3-Lokalisation an der Membran und ähnelte dabei einem mit PMA behandeltem Wildtyp. Zusammengefasst sprechen diese Daten für eine PKC δ -abhängige Phosphorylierung des PKP3-S313/314-Motivs und eine daraus resultierende verringerte PKP3-Membranlokalisation, was wiederum die desmosomale Stabilität beeinflusst.

Abstract (english)

Desmosomes are highly regulated cell-cell-junction-complexes which link the intermediate filaments to the plasma membrane. They are one of the main structures responsible for mechanic stability in the skin. Stability, assembly and calcium dependency are regulated through post translational modifications like phosphorylation. Phorbol ester induced activation of the protein kinase C family (PKC) results in a significant loss of adhesion in a PKC α dependent manner. So far, the main reason responsible for this effect is believed to be the phosphorylation of the desmoplakin (DSP) C terminal domain. But so far, the involvement of other PKC isoforms and the effect on other desmosomal proteins has not been thoroughly investigated and is poorly understood.

The influence of the PKCs on the desmosomal proteins of mouse keratinocytes was therefore systematically investigated in this work. It could be shown for the first time that the novel PKC δ isoform is directly involved in desmosomal regulation in mouse keratinocytes. Phorbol-12-myristat-13-acetate (PMA)-dependent activation of PKC led to phosphorylation of plakophilin 3 (PKP3) on a RXXS/T motif and of desmoplakin on serine 177/178 (S165/166 in human), a site not yet related to PKC-dependent phosphorylation. RXXS/T motifs of plakophilin 1, plakoglobin or desmoglein were not modified. Activation of PKCs led to a weaker PKP3 membrane localization and loss of PKP3 at tricellular contacts which are important for mechanical stability. Knockdown of PKC δ considerably reduced this PMA-dependended phenotype and abolished phosphorylation of PKP3. Neither knockdown of the classical PKC α nor knockdown of the novel PKC η showed similar effects. Potential PKC δ -dependent phosphorylation sites were identified based on in-vitro peptide kinase assays, mass spectrometry and phosphorylation prediction databases and mutated to alanine. Mutation of serine 313/314 to alanine resulted in the loss of PMA-dependent PKP3 phosphorylation. Additionally, the phosphomimic mutant of this motif (serine to glutamate) led to reduced PKP3 localization at the membrane and strongly resembled the PMA-treatment of wild type cells. Taken together, these data strongly suggests that PKP3 is phosphorylated on serine 313/314 in a PKC δ dependent manner which weakens PKP3 membrane localization, possibly affecting desmosomal stability.

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AL	<i>Activation Loop</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
aPKC	atypische Protein-Kinase C
APS	<i>Adenomatous polyposis coli protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>
cPKC	klassische Protein-Kinase C
CT	<i>Cycle threshold</i>
DAG	Diacylglycerin
DP	Desmoplakin
DSP	Desmoplakin
Dsc	Desmocollin
DSCR	Desmoglein-spezifische zytoplasmatische Region
Dsg	Desmoglein
DTD	Desmoglein-terminale Domäne
DTT	Dithiothreitol
CRB3	Crumbs homolog 3
E	Glutamat
EC	Extrazelluläre Domäne
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDSFS	<i>Ectodermal dysplasia skin fragility syndrome</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
eIF4B	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 4B
ERK	Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase
FoxO	Forkhead Box O Transkriptionsfaktor
FXR	<i>Fragile-X-related protein</i>
G3BP	Ras-GAP-SH3-Bindeprotein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

GSK	Glykogen-Synthasekinase
HCM	<i>High calcium medium</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HM	Hydrophobes Motiv
IA	Intrazelluläre Ankerdomäne
ICS	Intrazelluläre Cadherin- <i>like</i> Sequenz
IF	Immunfluoreszenz-Färbung
IGF	<i>Insulin like growth factor</i>
IP	Immunpräzipitation
IPL	Interzelluläre prolinreiche Linkerdomäne
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
JUP	<i>Junction</i> Plakoglobin
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
KO	<i>Knockout</i>
LCM	<i>Low calcium medium</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAPKAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-aktivierte Protein-Kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase
MKZ	Mauskeratinozyten
MSK	Mitogen- und stressaktivierte Kinase
MT-Buffer	<i>Microtubule stabilisation buffer</i>
n.s.	nicht signifikant
nPKC	neue/novel Protein Kinase C
OD	Optische Dichte
PABPC1	Poly(A) Bindeprotein 1
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PB1	Phox und Bem1
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	Phosphoinosid-abhängige Kinase
PG	Plakoglobin
PI3K	Phosphoinosid-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Protein-Kinase B

PKC	Protein-Kinase C
PKN	Protein-Kinase N
PKP	Plakophilin
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POLR2	<i>DNA-directed RNA polymerase II subunit</i>
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PTM	Posttranslationale Modifizierung
pxl	Pixel
qRT	<i>Quantitative real time</i>
RIPA-Buffer	<i>Radioimmunoprecipitation buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Roy-Bz	<i>7α-acetoxy-6β-benzoyloxy-12-O-benzoylroyleanon</i>
RSK	Ribosomale S6 Kinase
RUD	<i>Repeat-Unit</i> Domäne
S	Serin
S6K	Ribosomale Protein-S6-Kinase
SDS	Natriumlaurylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sotra	Sotrastaurin
T	Threonin
Tab	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TM (Desmocollin/Desmoglein)	Transmembrandomäne
TM (Protein Kinase)	<i>Turn motif</i>
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
Trp	Tryptophan
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2 (Tuberin)</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
ZO	<i>Zonula Occludens</i>

1. Einleitung

1.1. Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und hat diverse essentielle Funktionen. Die offensichtlichste Aufgabe ist dabei die Abgrenzung des Körperinneren von der Außenwelt und somit der Schutz vor äußeren Bedrohungen, wie z.B. Pathogenen, Strahlung oder einfachen mechanischen Belastungen. Aber genauso ist sie auch für den Austausch zwischen Innen und Außen, also Sekretion und Aufnahmemechanismen, so wie die Hautatmung, zuständig. Darüber hinaus dient sie als Wahrnehmungsorgan und ist sehr sensitiv gegenüber Temperaturänderungen und Berührungen. Zusätzlich ist sie beispielsweise noch an Wärmeregulation, Stoffwechsel und Immunreaktionen beteiligt. Während kleinere Verletzungen der Haut problemlos von selbst verheilen, können größere Verletzungen, sowie der Verlust der Barrierefunktion fatale Folgen, bis hin zum Tod, haben. Entsprechend existiert ein großes Interesse daran, die Funktionen und Regulationen der Haut genau zu verstehen und somit Erkrankungen bekämpfen zu können (Lopez-Ojeda et al., 2021).

Strukturell lässt sich die Haut in drei Schichten einteilen (Abb.1). Die tiefste Schicht ist die Subcutis (Unterhaut), darüber liegt die Dermis (Lederhaut, Corium) und darauf wiederum die Epidermis (Oberhaut). Als unterste Schicht verankert die Subcutis die Haut mit den Muskeln bzw. Knochen. Die Unterhaut selbst besteht dabei größtenteils aus Fettzellen und Bindegewebe, hierdurch dient sie als Energiespeicher und Wärmeisolator. Des Weiteren durchziehen Nerven und Blutgefäße diese Schicht bis hin ins Corium und ermöglichen so die Sinneswahrnehmung und Versorgung der Haut. Die Dermis besteht hauptsächlich aus Kollagen (maßgeblich I und III) (Meigel et al., 1977) und Elastinfasern, die für eine hohe Reißfestigkeit sorgen. Man unterscheidet dabei zwischen zwei Bereichen: Der über der Subcutis liegenden Netzschicht (*stratum reticulare*), bestehend aus hauptsächlich straffem Bindegewebe und der darüber liegenden Papillarschicht (*stratum papillare*), bestehend aus hauptsächlich lockerem Bindegewebe (Diegel et al., 2018). Des Weiteren befinden sich in der Dermis die Haarwurzeln, Hautdrüsen und ein Großteil der Sinnesrezeptoren. Die am häufigsten auftretenden Zellen sind Fibroblasten, aber auch Histozyten, Mastzellen und Fettzellen sind von Bedeutung (Brown und Krishnamurthy, 2021). Die Epidermis wird in fünf Schichten eingeteilt, von außen nach innen sind dies die Hornzellschicht (*stratum corneum*), die Glanzschicht (*stratum lucidum*), die Körnerzellschicht (*stratum granulosum*), die

Stachelzellschicht (*stratum spinosum*) und die Basalschicht (*stratum basale*). Darunter befindet sich die Basalmembran, die Dermis und Epidermis abgrenzt (Yousef et al., 2021). Die Basalschicht ist über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden und durch die hier stattfindende Zellteilung ein essentieller Ort für Wundheilung und Proliferation. Hier entstandene Keratinozyten wandern zum Teil in die Stachelzellschicht, beginnen dort mit der Keratinisierung (Verhornung) bis sie im *Stratum Corneum* als Korneozyten ankommen (Maynard und Downes, 2019). Neben Keratinozyten befinden sich im *Stratum Basale* auch Melanozyten und Merkel-Zellen. Im *Stratum Spinosum* kommt es zu einer verstärkten Ausbildung von Desmosomen, wodurch sich die Stabilität der Zellkontakte erhöht (SNELL, 1965). Zudem befinden sich in dieser Schicht Langerhanszellen, welche eine Rolle bei der Immunantwort spielen. Im *Stratum Granulosum* sind die Keratinozyten abgeflacht und ihr Zytoplasma wird durch Keratinaggregation granular, es kommt zur Absonderung von Glykolipiden, welche die Zellenverbindungen weiter verstärken (Anton-Lamprecht, 1984). Das *Stratum Lucidum* ist eine zusätzliche Schicht, die nur in dickschichtigen Hautbereichen, wie den Handflächen und Fußsohlen auftritt und zusätzliche Barrierefunktion und Stabilität bringt. In allen anderen Bereichen folgt auf die Körnerzellschicht die Hornzellschicht. Hier haben die Keratinozyten ihre Differenzierung zu Korneozyten abgeschlossen. Es handelt sich hierbei um totes Gewebe, vergleichbar mit Nägeln, Krallen, Haaren usw. (Yousef et al., 2021; Eckert und Rorke, 1989).

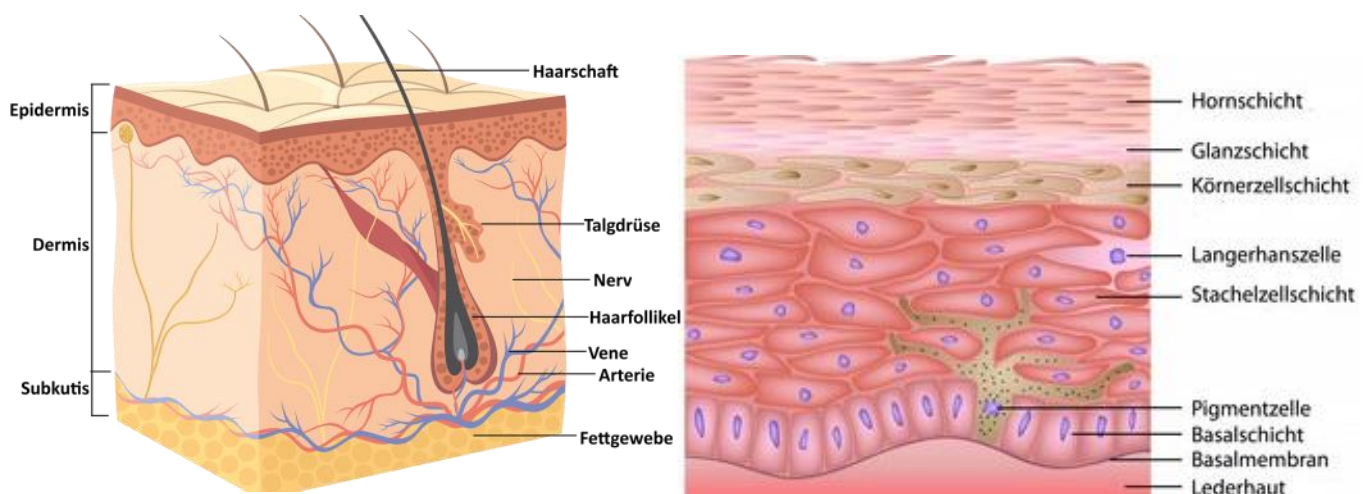


Abb. 1 Der Aufbau der Haut

Links ist der Aufbau der Hautschichten dargestellt (https://doglike.de/wp-content/uploads/2018/02/Hunde_Hautaufbau_DE-600x424.png, 2018). Rechts ist die Struktur der Epidermis gezeigt (<https://medlexi.de/images/Epidermis.jpg>, 2013).

1.1.1. Zell-Zell-Kontakte

Die Zellen der Haut sind durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden. Generell wird zwischen drei Gruppen von Kontakten unterschieden. Dies sind zum einen die *Gap Junctions*, die dichten Verbindungen (*Tight Junctions*) und die Adhärenzverbindungen (*Adherens Junctions*) zu denen auch die Desmosomen gehören.

Bei *Gap Junctions* handelt es sich um Verbindungen, die für die Signalweitergabe und den Stoffaustausch zwischen Zellen genutzt werden. Sechs Connexin-Moleküle bilden hierfür einen Zylinder, der von dem Zytoplasma durch die Plasmamembran in den interzellulären Bereich ragt und sich dort mit dem Connexin-Hexamer einer benachbarten Zelle zu einem Tunnel verbindet (Söhl und Willecke, 2004). Ionen und kleine Moleküle können über diesen Tunnel frei vom Cytoplasma der einen in das Zytoplasma der anderen Zelle diffundieren (Alexander und Goldberg, 2003). Die hierüber ermöglichte Signalweitergabe ist für die Kommunikation der Zellen von essentieller Bedeutung und spielt beispielsweise auch bei der Wundheilung der Haut eine wichtige Rolle (Churko und Laird, 2013).

Tight Junctions hingegen sind Verbindungen, die eine Barrierefunktion ausüben (Yuki et al., 2007). Sie verhindern generell, dass Stoffe, einschließlich Ionen, von einer Seite der Zelle auf die andere gelangen. Je nach Struktur und mit Hilfe von Ionenkanälen ist aber der Transport bestimmter Moleküle bzw. Ionen möglich (Tang und Goodenough, 2003). Als weitere Funktion unterbinden sie außerdem die Diffusion von Lipiden und Membranproteinen zwischen apikaler und basolateraler Seite der Plasmamembran (Zihni et al., 2016). Strukturell bestehen *Tight Junctions* aus Transmembranproteinen, die im interzellulären Raum mit den entsprechenden Proteinen der anderen Zelle interagieren und im Zytoplasma über Adapterproteine (*Zonula Occludens* [ZO]) mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind. Die Transmembranproteine werden in zwei Gruppen gegliedert, den *Tetraspan*-Proteinen (Claudin, Occludin, Trizellulin), welche vier in der Membran befindliche Abschnitte besitzen, sodass C- und N-Terminus im Zytoplasma liegen und den *Singlespan*-Proteinen (*junctional adhesion molecule* [JAM], *crumbs homolog 3* [CRB3]), welche nur eine in der Membran befindliche Domäne aufweisen (Balda und Matter, 2008). Claudin scheint hierbei eine essentielle Rolle für die Funktion zu haben, während beispielsweise Occludin eher eine regulatorische Rolle zugeschrieben wird (Furuse und Tsukita, 2006; Saitou et al., 1998; Furuse et al., 2002).

Adhärenzverbindungen sind für die Ausbildung stabiler, aber dynamischer Zell-Zell-Kontakte zuständig. Hierzu interagieren klassische oder desmosomale Cadherine zweier Zellen im interzellulären Bereich miteinander. Auf zytoplasmatischer Seite bildet sich ein Cadherin/Catenin-Komplex, welcher mit den Aktinbündeln und den Intermediärfilamenten verbunden ist (Harris und Tepass, 2010). Adhärenzverbindungen sind generell calciumabhängig. In der Haut sind zwei klassische Cadherine exprimiert, P-Cadherin in der Basalschicht und E-Cadherin gleichmäßig in allen Schichten (Brandner et al., 2010). Durch das Fehlen von E-Cadherin kommt es zu starkem Wasserverlust aufgrund der gestörten Barrierefunktion der Haut, was letztendlich zum Tod führt. Interessanterweise ist dies auf eine gestörte Regulation der *Tight Junctions* zurückzuführen (Tunggal et al., 2005). Der Verlust von P-Cadherin zeigt in der Maus keinen offensichtlich veränderten Phänotyp (Radice et al., 1997).

1.1.2. Desmosomen

Desmosomen (*macula adhaerens*) sind spezielle Adhärenzverbindungen, die für ihre besonders starken stabilitätsfördernden Eigenschaften bekannt sind. Sie treten hauptsächlich in Geweben auf, die einer starken mechanischen Belastung ausgesetzt sind, wie dem Herzmuskel und der Haut (Delva et al., 2009). Die desmosomalen Cadherine (Desmocollin 1-3 und Desmoglein 1-4) interagieren mit den jeweiligen Proteinen einer anderen Zelle im interzellulären Raum und bilden dabei eine sehr stabile Verbindung aus. Auf zytoplasmatischer Seite binden sie an die desmosomalen Plaque-Proteine Plakoglobin (JUP) und Plakophilin (1-3). Die Plaque-Proteine werden wiederum über Desmoplakin mit den Intermediärfilamenten verbunden (Kowalczyk und Green, 2013). Eine besondere Eigenschaft der Desmosomen ist, dass sie einen hyperadhäsiven Zustand erreichen können, in dem sie deutlich stabiler und zudem calciumunabhängig (resistent gegen Behandlung mit Calciumchelatoren z.B. EGTA) werden (Garrod und Taberner, 2014). Es wird angenommen, dass die Ca^{2+} -Unabhängigkeit über Phosphorylierungen durch die Protein-Kinase C α (PKC α) aufgehoben werden kann und dies essentiell für Wundheilung ist (Wallis et al., 2000). Innerhalb der Haut sind die desmosomalen Proteine zum Teil unterschiedlich exprimiert und können daher als Marker für die Keratinozytendifferenzierung genutzt werden (Dubash und Green, 2011; Brandner et al., 2010) (Abb.2).

Neben den Desmosomen existieren die Hemidesmosomen, welche anstatt einer Verbindung zwischen zwei Zellen eine Verbindung zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix herstellen. Hemidesmosomen haben ihren Namen aufgrund des ähnlichen Erscheinungsbildes im Elektronenmikroskop. Ihre Zusammensetzung unterscheidet sich jedoch vollständig von der der Desmosomen. Die Funktionen von Desmocollin und Desmoglein werden in Hemidesmosomen von Integrinen übernommen (Walko et al., 2015).

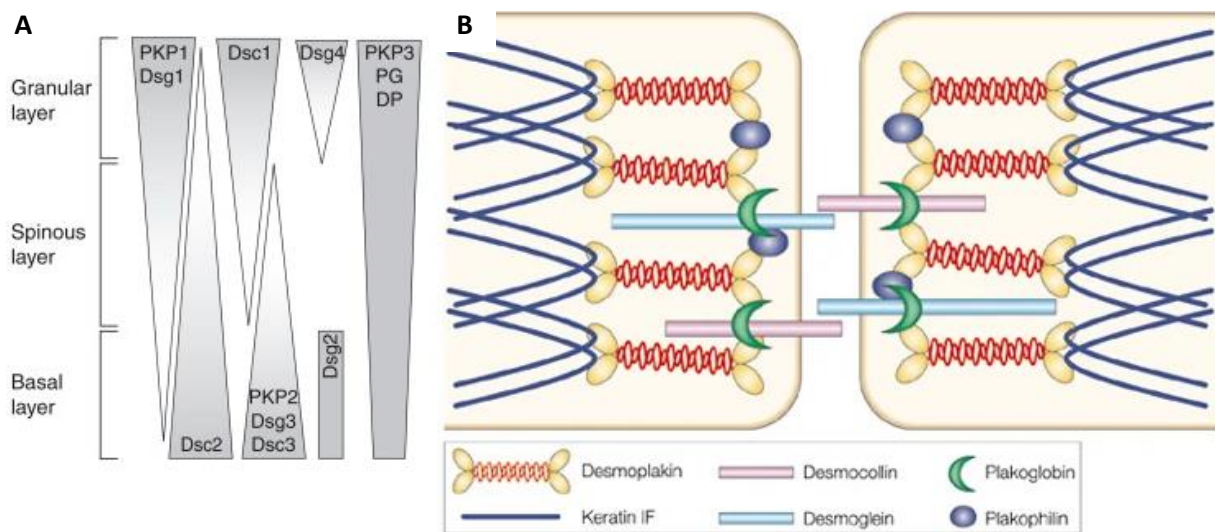


Abb. 2 Verteilung desmosomaler Proteine in der Haut und Struktur des Desmosoms

Abbildung A nach Dubash und Green, 2011. Die desmosomalen Proteine sind wie folgt abgekürzt: Plakophilin (PKP), Desmoglein (Dsg), Desmocollin (Dsc), Desmoplakin (DP), Plakoglobin (PG). PKP1, DSG1, Dsg4 und Dsc1 sind am abundantesten in der Körnerzellschicht exprimiert, während PKP2, Dsg2, Dsg3, Dsc2 und Dsc3 verstärkt in der Basalschicht auftreten. PKP3, Plakoglobin und Desmoplakin sind relativ gleichmäßig in allen Schichten vertreten. Abbildung B nach Fuchs und Raghavan, 2002, zeigt den schematischen Aufbau der Desmosomen.

1.1.2.1. Desmoplakin (DSP bzw. DP)

Desmoplakin gehört zur Familie der Plakin-Zytolinkerproteine. Es besteht aus einer N-terminalen Plakin-Domäne (sechs Spektrin *Repeats*), einer zentralen *Coiled-Coil-Rod* Domäne und drei homologen Plakin-*Repeat*-Domänen, gefolgt von einer Glycin-Serin-Argininreichen Region (Sonnenberg und Liem, 2007; Sonnenberg et al., 2007) (Abb.3). Zwei Splicevarianten wurden beschrieben (332 und 260 kDa), wobei der Variante 2 ein großer Teil

der Rod-Domäne fehlt (Green et al., 1990; O'Keefe et al., 1989). Über den N-terminalen Bereich wird die Interaktion mit Plakoglobin und der Kopfdomäne von Plakophilin 1 und 3 ermöglicht (Kowalczyk et al., 1997; Bonn  et al., 2003; Kowalczyk et al., 1999). Die zytoplasmatische Region von Desmoglein 1 kann hingegen direkt an die dahinter befindliche Plakin-Domäne binden (Kami et al., 2009; Choi und Weis, 2016).  ber die C-terminalen Plakin-*Repeat*-Domänen wird die Verankerung mit den Intermediärfilamenten ermöglicht. Hierbei wurden beispielsweise direkte Interaktionen mit diversen Keratinen, Vimentin und Desmin gezeigt (Choi et al., 2002; Kouklis et al., 1994; Meng et al., 1997) (Abb.3). Der Glycin-Serin-Arginin-reiche Bereich ist Ziel von postrationalen Modifizierungen (PTMs), wie Methylierung und Phosphorylierung. Es wird angenommen, dass hierüber die Interaktion mit den Intermediärfilamenten und die Bildung (*assembly*) der Desmosomen reguliert wird (Albrecht et al., 2015; Godsel et al., 2005; Stappenbeck et al., 1994). Dabei wurden bereits Einflüsse der PKCs, der Glykogen-Synthasekinase-3 (GSK3) und der Protein-Arginin-Methyltransferase-1 (PRMT-1) gezeigt (Bass-Zubek et al., 2008; Albrecht et al., 2015). Der Verlust von Desmoplakin hat letale Folgen. Im Mausmodell kommt es in der frühen embryonalen Phase zum Tod. Es können schwere Fehlfunktionen im Herzmuskel, Neuro- und Hautepithel beobachtet werden (Gallicano et al., 1998; Gallicano et al., 2001). Entsprechend sind auch schwere Folgen für Herz und Haut durch Fehlfunktionen und Mutationen dieses Proteins beschrieben worden (Armstrong et al., 1999; Jonkman et al., 2005; Norgett et al., 2000; Vasioukhin et al., 2001), darunter Keratoderma und Kardiomyopathie (Lai Cheong et al., 2005; Yang et al., 2006).

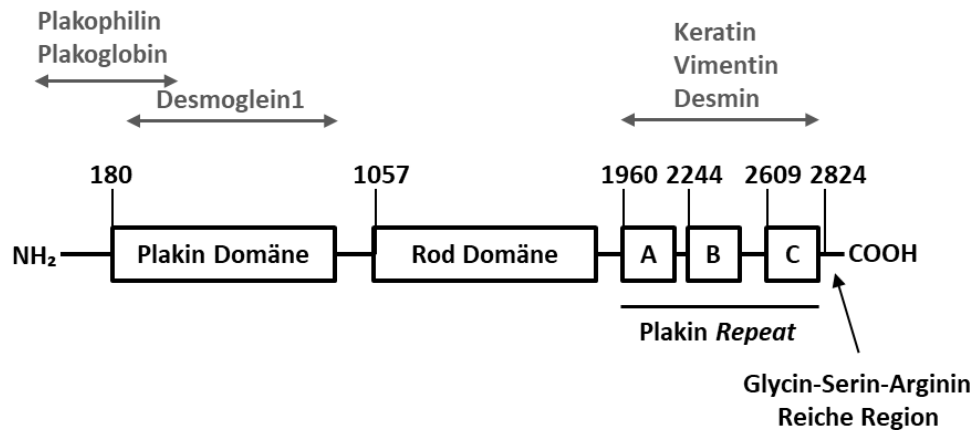


Abb. 3 Strukturschema der Desmoplakin Splicevariante 1 mit Interaktionspartnern

Dargestellt sind die Domänen der Desmoplakin Splicevariante 1. Der Beginn der entsprechenden Domäne ist mit der dazugehörigen Aminosäureposition gekennzeichnet. Interaktionspartner und Interaktionsbereich sind oberhalb der entsprechenden Domäne dargestellt.

1.1.2.2. Plakoglobin (PG, Gen-Name JUP)

Plakoglobin (γ -Catenin) und die Plakophiline gehören zu den *Armadillo-Repeat*-Proteinen, wie beispielsweise auch β -Catenin, welches in *Drosophila spec.* (Fallén, 1823) Armadillo genannt wird und namensgebend für die Familie ist (Peifer et al., 1992; Hatzfeld, 2005). Strukturell zeichnen sich die *Armadillo-Repeat*-Proteine durch einen ungeordneten N- und C-terminalen Bereich aus, der durch zwölf (Plakoglobin) bzw. neun (Plakophilin) *Armadillo-Repeat*-Domänen verbunden ist (Choi und Weis, 2005b; Choi et al., 2009).

Plakoglobin wurde erstmalig als 83 kDa großes Protein des desmosomalen Plaques beschrieben (Franke et al., 1983). Es ist essentiell für die Desmosomenbildung und somit auch für die mechanische Stabilität von Haut und Herz (Lewis et al., 1997). So hat ein *Knockout* von Plakoglobin durch den Verlust der Desmosomen bereits in der embryonalen Phase letale Folgen (Bierkamp et al., 1996). Strukturell gibt es sehr große Ähnlichkeiten zu β -Catenin, dem homologen Protein der herkömmlichen Adhärenzverbindungen, sodass Interaktionen mit Bindepartnern wie E-Cadherin und α -Catenin möglich sind, wenn auch mit geringerer Affinität (Piepenhagen und Nelson, 1993; Knudsen und Wheelock, 1992; Sacco et al., 1995). Hingegen kann Plakoglobin im Gegenzug dazu faktisch alle desmosomalen Proteine binden. Hierbei sind je nach Protein die einzelnen *Armadillo-Repeat*-Domänen von Bedeutung (Abb.4). So wird die Interaktion zu den Desmogleinen durch die ersten *Repeats* ermöglicht, während für die

Desmocolline auch die hinteren *Repeats* eine Rolle spielen (Mathur et al., 1994; Roh und Stanley, 1995; Witcher et al., 1996). Die Interaktion mit den Plakophilinen wird ebenfalls über die C-terminalen *Repeats* ermöglicht (Bornslaeger et al., 2001; Bonn  et al., 2003; Kirchner et al., 2012), während für die Bindung zu Desmoplakin alle Domänen relevant sind (Kowalczyk et al., 1997). Neben der direkten Beteiligung an der Zell-Zell-Adhärenz ist Plakoglobin aber auch in *Signaling*-Prozesse involviert. So sind beispielsweise Interaktionen mit dem Insulin-Rezeptor und den Tumorsuppressoren p53 und APC (*adenomatous polyposis coli* Protein) beschrieben worden (Aktary et al., 2013; Cohen et al., 2014; Shibata et al., 1994), sodass Plakoglobin im Gegensatz zu β -Catenin tumor- und metastaseunterdr ckende Eigenschaften zugeschrieben werden (Aktary et al., 2017).  ber Phosphorylierung der Serin-, Threonin- und Tyrosinreste werden Löslichkeit, Lokalisation und Interaktion von Plakoglobin reguliert (Pasdar et al., 1995). Hierbei sind besonders die Wnt-, Src- und Rezeptor-Tyrosin-Kinase-abhängige Signalwege von Bedeutung (Hegland et al., 1999; Bradley et al., 1993; Franzen et al., 2012). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es durch die Aktivierung des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) zu Plakoglobin-Tyrosin-Phosphorylierung kommt, wodurch es zum Verlust von DSP an den Desmosomen und somit zu verringerter Adhäsion kommt (Yin et al., 2005).

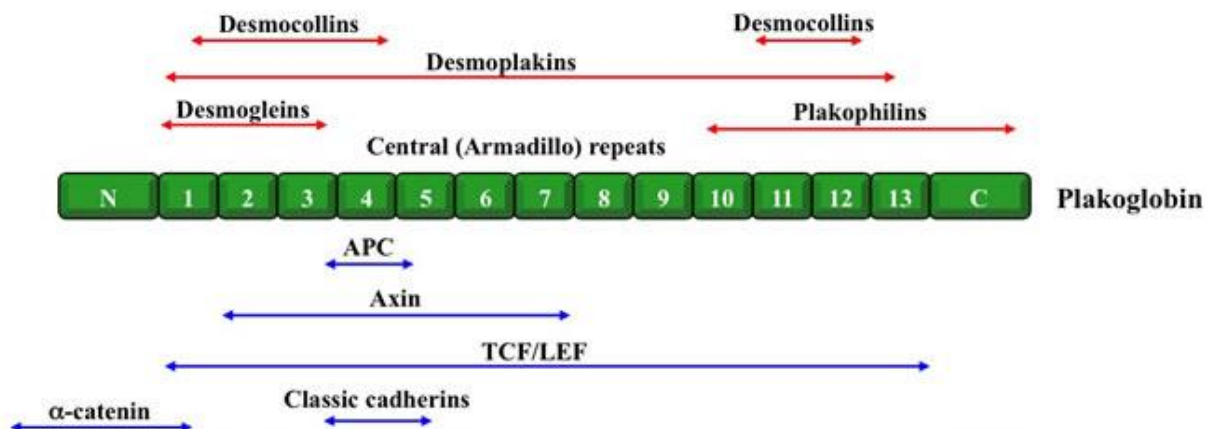


Abb. 4 Interaktionen von Plakoglobin (Aktary et al., 2017)

Gezeigt ist Plakoglobin mit seinen Interaktionspartnern. In Rot sind Interaktionspartner gezeigt, die nur mit Plakoglobin interagieren können, in Blau jene, die sowohl an Plakoglobin, als auch an β -Catenin binden. APC steht für *adenomatous polyposis coli protein* und TCF/LEF für *T-cell factor/Lymphoid enhancer factor*. Sie und Axin sind in den Wnt-Signalweg involviert.

1.1.2.3. Plakophiline (PKP)

Im Gegensatz zu Plakoglobin finden die Interaktionen der Plakophiline hauptsächlich über ihre N-terminale ungeordnete Domäne statt. Diese ist bei den Plakophilinen deutlich länger, dafür ist aber die C-terminale Domäne sehr klein. Dazwischen liegen die neun *Armadillo-Repeat*-Domänen, wobei es zwischen Domäne fünf und sechs eine kleine Insertion gibt, wodurch das Protein eine leicht sichelförmige Struktur erhält (Choi und Weis, 2005b) (Abb.5). Es sind drei Isoformen bekannt, welche sich deutlich in der Sequenz der N-terminalen Domäne unterscheiden. Jede Isoform erfüllt verschiedenste Aufgaben und zeigt ein individuelles Expressionsmuster (Neuber et al., 2010; Schmidt und Jäger, 2005; Hatzfeld, 2007). Die Expression von PKP1 ist auf mehrschichtige Epithelien begrenzt. In der Haut ist es von Basal- bis Granularschicht zunehmend exprimiert (Dubash und Green, 2011). Es ist maßgeblich an dem Aufbau der Desmosomen beteiligt, indem es Desmoplakin rekrutiert (Hatzfeld et al., 2000; Sobolik-Delmaire et al., 2006). Durch gemeinsame Bindung mit Plakoglobin an Desmoplakin kommt es dann zu verstärkter Desmosomenbildung (Bornslaeger et al., 2001). Ebenso sind Interaktionen mit Desmocollin 1 und Desmoglein 1 beschrieben worden (Smith und Fuchs, 1998; Hatzfeld et al., 2000). Entsprechend führt das Fehlen von PKP1 zu deutlich verringerter Desmosomenzahl und -größe, sowie verstärkter Zellmigration (South et al., 2003). Auch eine Anreicherung von Desmoglein 3 im Desmosom findet dann nicht statt (Fuchs et al., 2019). Ein *Knockdown* von PKP1 verringert deutlich die mechanische Stabilität und verhindert Hyperadhäsion (Hatzfeld et al., 2017; Keil et al., 2016). Ein *Knockout* im Mausmodell hat gezeigt, dass neben dieser deutlich verringerten mechanischen Stabilität auch die Barrierefunktion von innen nach außen gestört ist, sodass neugeborene Mäuse binnen 24 h an den Folgen des Wasserverlustes versterben (Rietscher et al., 2016). Auch hier ist dies auf eine Fehlregulation der *Tight Junctions* zurückzuführen (Rietscher, 2018). Im Menschen führen Mutationen von PKP1 zu schweren Hautkrankheiten, darunter EDSFS (*ectodermal dysplasia skin fragility syndrome*) (Hamada et al., 2002; McGrath et al., 1997; McMillan et al., 2003). Neben der offensichtlichen Beteiligung an der Zell-Zell-Adhäsion, wurden aber noch weitere Eigenschaften von PKP1 beschrieben. Beispielsweise lokalisiert PKP1 im Nukleus. Es existiert sogar eine unterrepräsentierte Splicevariante, die bisher ausschließlich dort und nicht in Desmosomen nachgewiesen wurde (Schmidt et al., 1997). Jedoch ist die genaue Funktion nicht geklärt, wobei während der Apoptose eine starke Abwanderung aus dem Kern

beobachtet wird und daher ein möglicher Zusammenhang mit dem Überleben der Zellen diskutiert wird (Weiske et al., 2001; Sobolik-Delmaire et al., 2010). Des Weiteren werden auch Effekte auf die Translation beschrieben (Wolf et al., 2010; Wolf und Hatzfeld, 2010) und der Einfluss von PKP1 auf den Wnt-Signalweg wird untersucht (Miyazaki et al., 2016). PKP1 selbst wird unter anderem über Phosphorylierungen reguliert, so verändert sich das Verhältnis vom desmosomalen zum zytoplasmatischen Pool in Abhängigkeit der Modifizierung (Hatzfeld et al., 2014). In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise gezeigt werden, dass insulinabhängige Phosphorylierung von PKP1 durch Akt2 zu reduzierter Zell-Zell-Adhäsion und erhöhter Proliferation führt (Wolf et al., 2013).

PKP2 ist die dominante Isoform des Herzmuskels (Gandjbakhch et al., 2011). Fehlfunktionen bzw. die Abwesenheit dieses Proteins führen daher zu Herzleiden, wie arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (Antoniades et al., 2006; van Tintelen et al., 2006). *Knockout*-Versuche im Mausmodell sind in der Embryonalphase letal, was ebenfalls auf Fehler in der Herzregulation zurückzuführen ist (Grossmann et al., 2004). In der humanen Epidermis ist PKP2 hauptsächlich in der Basalschicht, aber zum Teil auch im Stachelzellenepithel exprimiert (Dubash und Green, 2011). In der Maushaut ist es auf Proteinebene nicht nachweisbar. Über die N-terminale Kopfdomäne interagiert es mit diversen desmosomalen Proteinen, wie Desmoplakin, Plakoglobin, Desmoglein 1-2 und Desmocollin 1-2, aber auch Interaktionen mit β -Catenin und Keratin sind beschrieben (Chen et al., 2002; Hofmann et al., 2000). Hierbei hat PKP2 auch regulatorische Eigenschaften. So konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Bindung von Desmoplakin und PKC α zur Phosphorylierung von Desmoplakin führt, wodurch DSP verstärkt ins Desmosom integriert wird (Bass-Zubek et al., 2008). Ähnlich wie PKP1 kann auch PKP2 im Nukleus nachgewiesen werden (Mertens et al., 1996). Dort kommt es zur Interaktion mit der großen Untereinheit der RNA-Polymerase III, jedoch ist noch unklar, was dies bewirkt (Mertens et al., 2001). Die Translokation in den Kern wird über eine Phosphorylierung am Serin 82 durch die Kinase C-TAK 1 reguliert. Es kommt daraufhin zur Interaktion von PKP2 mit 14-3-3 Proteinen (konservierte, regulatorische Proteine siehe Fu et al., 2000), wodurch PKP2 außerhalb des Nukleus bleibt (Müller et al., 2003).

PKP3 ist in der Epidermis relativ gleichmäßig exprimiert (Dubash und Green, 2011). Neben der Bindung am Desmosom existiert auch ein vergleichsweise großer zytoplasmatischer Pool und im Gegensatz zu den anderen Plakophilinen konnte bisher keine offensichtliche

Kernlokalisierung gezeigt werden (Schmidt et al., 1999). PKP3 bindet über die Kopfdomäne, mit Ausnahme der anderen Plakophiline, quasi alle desmosomalen Proteine (Bonné et al., 2003). Es wird angenommen, dass es für den Aufbau des zytoplasmatischen Teils der Desmosomen zuständig ist und durch die Interaktion mit der Rap1-GTPase ebenfalls eine Rolle für die Reifung der herkömmlichen Adhärenzverbindungen hat (Todorovic et al., 2014; Hogan et al., 2004). Jedoch sind Desmosomen, die PKP3 enthalten, deutlich dynamischer und weniger hyperadhäsiv (Keil et al., 2016). Der *Knockout* von PKP3 im Mausmodell zeigt einen deutlich milderen Phänotyp, als bei den anderen PKPs. So sind die PKP3-Null-Mäuse lebensfähig, zeigen aber vermehrte Entzündungsreaktionen und milde Störungen in der Haut und Haarregulation (Sklyarova et al., 2008). Es wird angenommen, dass die anderen Plakophiline den PKP3 Verlust zum Teil kompensieren können (Neuber et al., 2010). Dennoch konnte in verschiedenen Krebsarten sowohl erhöhte als auch verringerte Expression von PKP3 beobachtet werden (Breuninger et al., 2010; Demirag et al., 2011; Demirag et al., 2012; Kundu et al., 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass posttranslationale Modifizierungen von PKP3 deutlich Einfluss auf die Desmosomen nehmen und durchaus gegensätzliche Effekte haben. So führt EGF (*epidermal growth factor*)-abhängige Phosphorylierung von PKP3 an den Serinen 134/135 durch RSKs (ribosomale S6 Kinase) zu verstärkter Lokalisation von PKP3 an die Desmosomen (Müller et al., 2020), während Phosphorylierung von Tyrosin 195 über die Src-Kinase zu einem Verlust von PKP3 an den Desmosomen führt (Neuber et al., 2015). Neben dem Einfluss auf Zell-Zell-Kontakte konnte für PKP3 auch ein Effekt auf die posttranskriptionelle Genregulation beobachtet werden, indem es mit RNA-Bindeproteinen interagiert, wie beispielsweise dem Poly (A)-Bindeprotein 1 (PABPC1), dem *fragile-X-related*-Protein (FXR1) und dem ras-GAP-SH3-Bindeprotein (G3BP) (Hofmann et al., 2006).

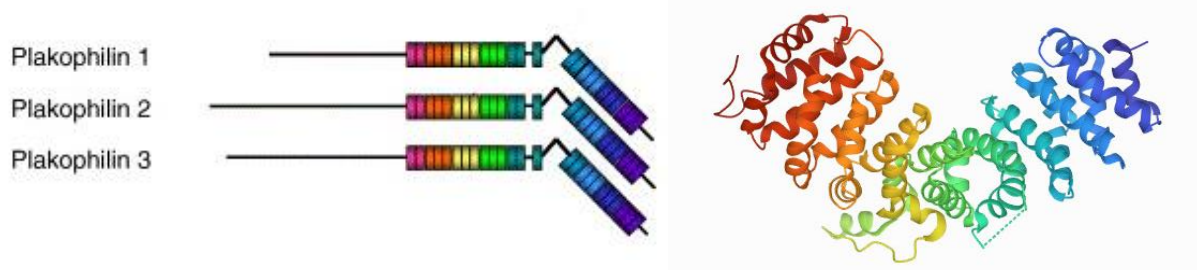


Abb. 5 Struktur der Plakophiline (Hatzfeld, 2007; Choi und Weis, 2005a)

Links sind die Plakophiline schematisch dargestellt. Rechts ist die Struktur der *Armadillo-Repeat*-Domänen von PKP1 in Cartoondarstellung PDB:1XM9 gezeigt. Die einzelnen *Armadillo-Repeat*-Domänen sind farblich gekennzeichnet.

1.1.2.4. Desmocollin (Dsc) und Desmoglein (Dsg)

Die desmosomalen Cadherine sind für die Verknüpfung der Desmosomen zweier Zellen über den extrazellulären Raum zuständig. Es sind vier Desmogleine (Dsg) und drei Desmocollin (Dsc) Isoformen beschrieben worden. Von letzteren existieren jeweils die Splicevarianten a und b, wobei Variante b ein Teil der zytoplasmatischen Domäne fehlt. In der Epidermis sind die desmosomalen Cadherine unterschiedlich exprimiert. So sind Dsg1, 4 und Dsc1 am stärksten in der Körnerzellschicht exprimiert und Dsg2, 3 und Dsc2, 3 am stärksten in der Basalschicht (Dubash und Green, 2011) (Abb. 2a). Strukturell sind sie wie folgt aufgebaut: N-terminal liegen die fünf extrazellulären Domänen (EC1-5), gefolgt von der Transmembrandomäne (TM), der intrazellulären Ankerdomäne (IA) und der intrazellulären Cadherin-like Sequenz (ICS) (Chidgey und Garrod, 2016). Desmogleine haben eine deutlich längere zytoplasmatische Domäne als Desmocolline und herkömmliche Cadherine. So folgt bei ihnen nach der ICS eine interzelluläre prolinreiche Linkerdomäne (IPL), eine *Repeat Unit*-Domäne (RUD) und mit Ausnahme von Dsg3 eine Desmoglein-terminale-Domäne (DTD). Die Anzahl der *Repeats* in der RUD variiert je nach Dsg-Isoform (Chidgey und Garrod, 2016) (Abb.6). Die Interaktionen im extrazellulären Raum finden, ähnlich wie bei herkömmlichen Cadherinen, über die hydrophobe Seitenkette eines konservierten Tryptophans (Trp2) der EC1-Domäne statt (Nie et al., 2011; Tariq et al., 2015). Hierbei kommt es aber nahezu nur zur Ausbildung von Dsg-Dsc-Heterodimeren, da einzelne, geladene Aminosäuren die Ausbildung von Homodimeren unterbinden (Harrison et al., 2016). Die einzelnen Isoformen der desmosomalen Cadherine haben unterschiedliche Bedeutung für die Haut, wie man an den Folgen von *Knockout*-Versuchen sieht. Der Verlust von Dsg2 und Dsc3 ist letal in der Embryonalphase (Eshkind et al., 2002; Den et al., 2006), während der *Knockdown* von Dsc2 keine offensichtlichen Phänotypveränderungen hervorruft (Rimpler, 2014). *Knockout* von Dsc1 führt zu lebensfähigen Tieren, jedoch mit entzündeter, fragiler, schnell proliferierender Haut und Haarausfall (Chidgey et al., 2001). Der Verlust von Dsg4 hat maßgeblichen Einfluss auf die Regulation des Haarwachstums (Kljuic et al., 2003; Zhang et al., 2008) und der *Knockout* von Dsg3 führt zur Blasenbildung in der Haut und ebenfalls zu Haarausfall (Koch et al., 1997). Zu Dsg1 liegen dahingehend bisher keine Daten vor, da in der Maus drei Gene (DSG1a, b, c) existieren, die deletiert werden müssten. Fehlfunktionen der desmosomalen Cadherine führen auch beim Menschen oft zu schweren Haut- oder Herzkrankheiten. Eine der bekanntesten ist *pemphigus vulgaris*, eine

Autoimmunerkrankung, die sich meist gegen Dsg1 und/oder Dsg3 richtet (Walter et al., 2019). Es kommt zu schwerer Blasenbildung und Entzündung der Haut, die tödlich enden kann (Porro et al., 2019; Spindler und Waschke, 2014). Dsg1 hat vor einigen Jahren an Aufmerksamkeit gewonnen, da gezeigt werden konnte, dass es inhibierend auf den EGF-Rezeptor (EGFR) wirkt und somit Differenzierung fördert (Getsios et al., 2009). Für die Desmogleine wurde auch ein regulatorischer Einfluss der PKCs beschrieben (Denning et al., 1998), der für die Motilität und Metastasierung von Krebszellen von Bedeutung sein kann (Brown et al., 2014).

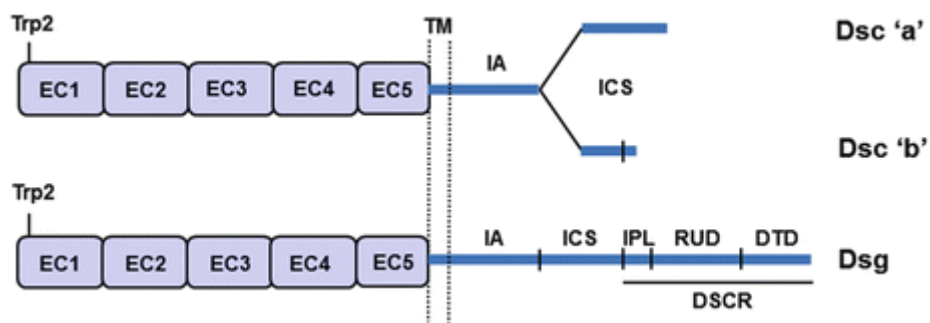


Abb. 6 Struktur der desmosomalen Cadherine

Dargestellt sind die Domänen der desmosomalen Cadherine: EC steht dabei für die extrazellulären Domänen, IA für intrazelluläre Ankerdomäne, ICS für intrazelluläre Cadherin-like-Sequenz, IPL für interzelluläre prolinreiche Linkerdomäne, RUD für *Reapet-Unit*-Domäne, DTD für Desmoglein-terminale-Domäne, TM für Transmembranbereich und DSCR für Desmoglein-spezifische zytoplasmatische Region.

1.2. MAP Kinase und AKT Signaling

Wie in den vorherigen Kapiteln erwähnt wurde, werden die Desmosomen über verschiedene Signalwege reguliert und nicht selten sind die einzelnen desmosomalen Proteine Ziel von posttranslationalen Modifizierungen, wie Phosphorylierungen. Jedoch sind bis heute noch nicht alle Zusammenhänge und Funktionen geklärt. Die meisten Kinase-Kaskaden werden als Reaktion auf Verletzung, Stress oder durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Hierrüber werden unzählige Prozesse kontrolliert, die die Funktionalität und das Überleben von Geweben gewährleisten, darunter beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Wundheilung. An der Entwicklung und Regulation der Epidermis sind verschiedene Wachstumsfaktoren beteiligt, darunter der *epidermal growth factor* (EGF), der *insulin-like*

growth factor (IGF), bzw. Insulin selbst, der *transforming growth factor* (TGF) und der *keratinocyte growth factor* (KGF) (Carpenter et al., 1986; Edmondson et al., 2003; Lawrence, 1996; Yen et al., 2014). Über die Basalmembran kommt es zum Austausch von Wachstumsfaktoren zwischen der Dermis und der Epidermis. Sie binden dann an extrazelluläre Rezeptoren, wodurch die Kinase-Kaskaden aktiviert werden. Zwei komplexe Signalwege sind hier von besonderer Bedeutung, der MAP-Kinase- (mitogen aktivierte Protein) (Guo et al., 2020) und der Akt-Kinase- (Protein Kinase B) Signalweg (Manning und Toker, 2017) (Abb.7).

Der MAP-Kinase-Signalweg ist maßgeblich an der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Zelltod/Überleben und Stressantworten beteiligt (Keshet und Seger, 2010; Sabio und Davis, 2014; Eckert et al., 2002). Die Kaskade besteht aus einer Serie von Kinasen, die jeweils ihre entsprechenden *Downstream*-Kinasen phosphorylieren und aktivieren, bis hin zur eigentlichen mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK), die ihrerseits ein breites Spektrum an weiteren Kinasen aktivieren kann. Je nach Position oberhalb der MAPK spricht man von MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) oder MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) usw. Unterhalb MAPK spricht man von MAPK-aktivierten Protein-Kinasen (MAPKAPK) (Qi und Elion, 2005). Es existieren vier unterschiedliche MAPKs mit entsprechenden, unterschiedlichen Up- und *Downstream*-Kinasen und unterschiedlichen Effekten auf die Zelle. Dies sind die extrazellulär-Signal-regulierte Kinase (ERK1/2), beteiligt an Wachstum, Differenzierung, Zellüberleben und Entwicklung, die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), die p38 MAPK, beide beteiligt an Immunantwort, Apoptose, Wachstum und Differenzierung und ERK5, beteiligt an Wachstum, Differenzierung und Entwicklung (Morrison, 2012). Da für diese Arbeit der ERK1/2-MAPK-Signalweg eine Rolle spielen wird, wird dieser im Folgenden genauer beschrieben. Upstream von ERK befinden sich die Enzyme MEK (MAPKK) und Raf (MAPKKK). Die Aktivierung von Raf ist vergleichsweise kompliziert. Sie ist abhängig von PKC und Src-bedingter Phosphorylierung, sowie der Bindung an das G-Protein Ras (Terrell und Morrison, 2019; Stokoe und McCormick, 1997; Schönwasser et al., 1998; Corbit et al., 2003). Die Aktivierung der GTPase Ras wird über die Rezeptor-Tyrosin-Kinase EGFR (*epidermal growth factor receptor*) mediiert (Margolis und Skolnik, 1994), welche über Stimulation der Phospholipase C- γ (PLC γ) auch aktivierend auf die PKCs wirkt (Ullrich und Schlessinger, 1990). Entsprechend lässt sich der MAPK-Kinase-Signalweg über den Wachstumsfaktor EGF aktivieren (Carpenter und Cohen, 1990). Downstream von ERK existieren unzählige *Targets*, darunter ribosomale

S6-Kinasen (RSK), mitogen- und stressaktivierte Kinasen (MSK) und Phospholipase A2 (Ünal et al., 2017; Wortzel und Seger, 2011). Verstärkte oder dauerhafte Aktivierung bzw. Fehlregulation dieses Signalweges haben schwerwiegende Folgen und gehen meistens mit Krebs einher (Dhillon et al., 2007; McCubrey et al., 2007).

Ebenso von großer Bedeutung ist der Akt (PKB) Signalweg. Er spielt eine zentrale Rolle im Glucose-Metabolismus, in der Proliferation und der Regulation des Zellüberlebens bzw. der Apoptose (Fresno Vara et al., 2004). Es sind drei Isoformen in Säugetieren beschrieben worden. Akt1 ist ubiquitär exprimiert, Akt2 in insulinempfindlichem Gewebe und Akt3 am höchsten im Hirn und den Hoden (Franke, 2008). Sie zeigen eine hohe Homologie zu den PKCs (Bellacosa et al., 1993). Ihre Aktivierung verläuft über die Stimulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wodurch Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) an die Membran rekrutiert und aktiviert werden. Hierdurch entsteht Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃). Durch Bindung von PIP₃ an die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) wird diese stimuliert (Vanhaesebroeck et al., 2010). Es kommt zur Phosphorylierung von Akt an den konservierten Motiven T308 und S473 (Nummerierung Akt1), wodurch dieses bei gleichzeitiger Interaktion mit PIP₃ aktiv wird (Alessi et al., 1997). Potente Aktivatoren dieses Signalweges sind Insulin und der *Insulin like Growth Factor 1* (IGF-1) (Alessi et al., 1996a). Downstream von Akt sind über hundert verschiedene Enzyme bekannt, die phosphoryliert werden, wobei dies abhängig vom Protein sowohl eine aktivierende als auch eine deaktivierende Wirkung haben kann (Manning und Cantley, 2007). Darunter befinden sich beispielsweise die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3), die *Forkhead-Box-O*-Transkriptionsfaktoren (FoxO) und der Tumorsuppressor Tuberin (TSC2), wodurch der am Zellwachstum beteiligte mTOR-Komplex aktiviert wird (Brunet et al., 1999; Cross et al., 1995; Inoki et al., 2002).

Obwohl die ERK und Akt Signalwege ähnliche Mechanismen der Aktivierung nutzen und sich einige *Targets* überschneiden, wirken sie dennoch inhibierend aufeinander. Daher wird auch bei PKC-Stimulation und einhergehender MAPK-Aktivierung eine Deaktivierung von Akt beobachtet (Mendoza et al., 2011; Lu et al., 2011; Khamaisi et al., 2016).

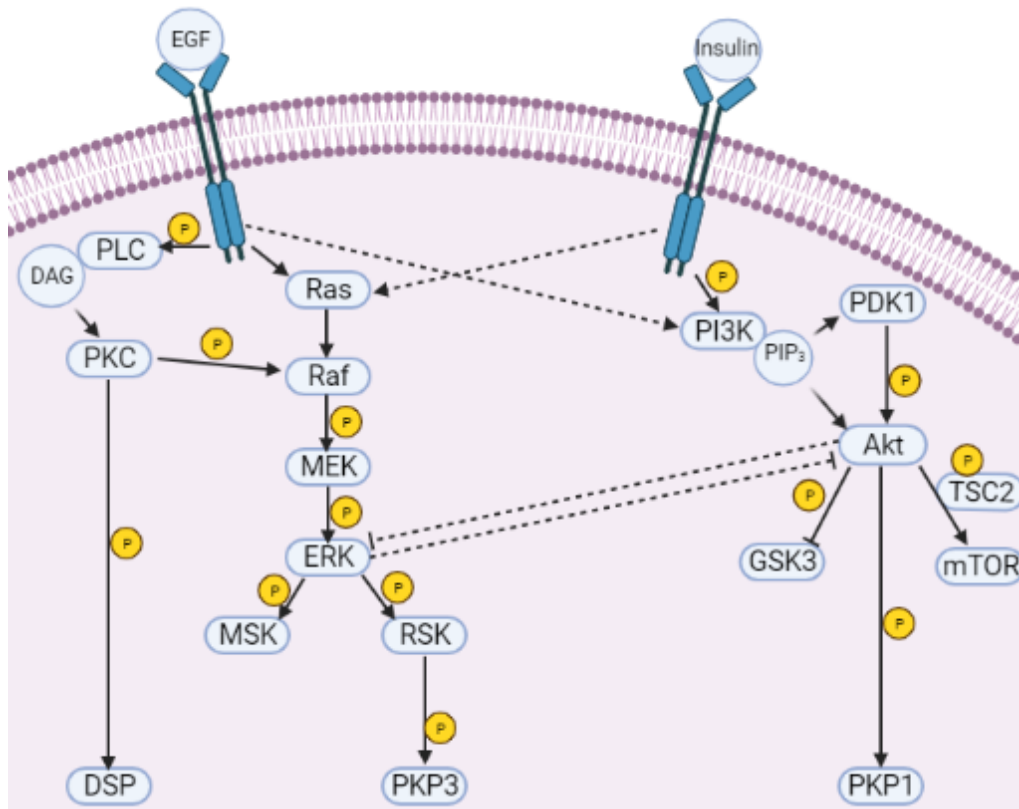


Abb. 7 Vereinfachtes Schema des MAPK- und Akt-Signalwegs

Dargestellt ist die vereinfachte Signaltransduktion des ERK- und des Akt-Signalweges in Abhängigkeit von EGF- und Insulinstimulation. Zusätzlich sind der Einfluss der klassischen und *novel* PKCs, sowie publizierte desmosomale *Targets* dargestellt. DAG steht für Diacylglycerin, ein Aktivator der PKCs. Diese Abbildung wurde mittels BioRender.com (2021) erstellt.

1.3. Protein-Kinase C (PKC)

PKCs wurden erstmalig als Enzyme beschrieben, die Histone phosphorylieren (Inoue et al., 1977; Takai et al., 1977). Seitdem haben sie stetig an Bedeutung gewonnen. Durch PKC-abhängige Phosphorylierung werden diverse Signalkaskaden aktiviert, die Einfluss auf beispielsweise Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Immunantwort und Hirnaktivität nehmen (Callender und Newton, 2017; Black und Black, 2013; Reyland, 2009). Bei vielen Krankheiten bzw. gesundheitlichen Beeinträchtigungen wird der Einfluss der PKCs untersucht, darunter auch Diabetes (Gerald und King, 2010) und Herzinfarkte (Singh et al., 2017b). Gerade auch in der Krebsforschung spielt das Verständnis der PKC-Regulation eine essentielle Rolle (Garg et al., 2014; Kang, 2014).

Die Familie der PKCs umfasst 10 Isoenzyme und gehört zu der Gruppe der AGC-Kinasen (benannt nach Proteinkinase A, G und C), wie beispielsweise auch PKBs (Akt), PKNs, RSKs und

die PDK1. Sie zeichnen sich durch ihre konservierte katalytische Domäne aus, welche mit Hilfe von ATP Serin- und Threonin-Reste in Gegenwart von Arginin und/oder Lysin phosphoryliert. Wichtig ist, dass sich Arginin oder Lysin hierfür an der -2 oder -3 Position befindet. Es existieren fünf Konsensusmotive, die maßgeblich von PKCs erkannt werden: [R/K]X[S/T]; [R/K][R/K]X[S/T]; [R/K]XX[S/T]; [R/K]X[S/T][R/K] und [R/K]XX[S/T]X[R/K] (Kang et al., 2012). Alle PKCs haben außerdem eine N-terminale regulatorische Domäne. Diese beinhaltet einen autoinhibitorischen Pseudosubstrat-Bereich (Konsensusmotiv in dem S/T durch Alanin (A) ersetzt ist), der das Enzym in einer inaktiven Konformation hält und die sogenannten C-Module, welche für die Aktivierung und die Lokalisation, also beispielsweise die Bindung an die Plasmamembran, zuständig sind (Hurley, 2006). Anhand der regulatorischen Domäne lassen sich die PKCs in drei Unterfamilien aufteilen: Die herkömmlichen/klassischen PKCs (α ; β 1; β 2; γ), die neuen/*novel* PKCs (δ ; ϵ ; η ; θ) und die atypischen PKCs (ζ ; ι/λ) (Abb.8). Die klassischen PKCs haben die Module C1A und C1B, welche eine Aktivierung über Diacylglycerin (DAG) und Phorbolster (Zhang et al., 1995) ermöglichen und das C2-Modul, welches anionische Lipide in Abhängigkeit von Calcium bindet. Eine Aktivierung der klassischen PKCs (cPKC) benötigt entsprechend DAG und Calcium. Die *novel* PKCs (nPKC) haben ebenfalls die C1A- und C1B-Module, jedoch ist ihr C2-Modul calciumunabhängig, sodass zur Aktivierung der *novel* PKCs lediglich DAG benötigt wird. Die atypischen PKCs (aPKC) haben ein C1-Modul, welches statt DAGs Phosphatidylinositol bindet und ein Protein-Protein-Interaktions-Modul, welches mit Phox- und Bem1- (PB1) Domänen interagiert. Das C2-Modul ist nicht vorhanden. Entsprechend sind atypische PKCs weder abhängig von Calcium, noch durch DAG aktivierbar (Steinberg, 2008; Newton, 2010). Zur Aktivierung der PKCs ist, mit Ausnahme von PKC δ (Liu et al., 2006), außerdem noch eine Phosphorylierung im sogenannten *Activation Loop* (AL) notwendig. Dieser befindet sich im C-terminalen Bereich der Kinase-Domäne (Freeley et al., 2011). Dahinter befinden sich das *Turn*-Motiv (TM) und das hydrophobe Motiv (HM). Je nach Isoform ist zusätzlich auch die Phosphorylierung eines dieser Motive für die Aktivität notwendig (Freeley et al., 2011). Nach Aktivierung der PKCs kommt es oftmals zu einer Abspaltung der regulatorischen Domäne, was zu einer Daueraktivität führt (Kishimoto et al., 1989). Häufig wird die Phosphorylierung des AL, TM oder HM als Marker für PKC-Aktivität genutzt. Das ist jedoch nicht ideal, da (A) auch inaktive PKC phosphoryliert wird, bzw. eine Phosphorylierung nicht zwangsläufig bedeutet, dass die PKC auch aktiviert wird, (B) eine

Dephosphorylierung von aktiver PKC nicht zwangsweise zu einer Inaktivierung führt und (C) der Effekt der einzelnen Motive sehr unterschiedlich je nach Isoform ist (Freeley et al., 2011).

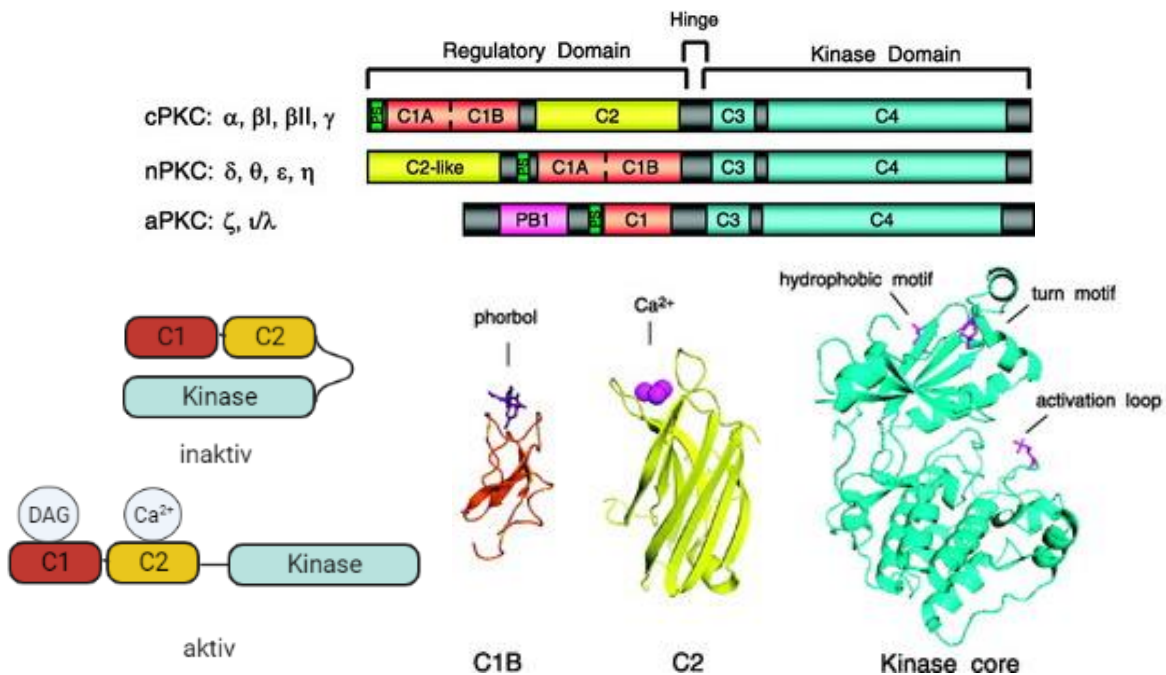


Abb. 8 Struktur der PKC-Unterfamilien

Oben wird die Struktur der unterschiedlichen PKC-Isoenzyme gezeigt. Die Pseudosubstratregion (PS) ist grün, die C1 Domäne rot, die C2 Domäne gelb, die Kinase-Domäne türkis und die PB1-Domäne lila dargestellt. Links unten ist vereinfacht die Aktivierung der cPKCs dargestellt. DAG steht für Diacylglycerin. Rechtsunten sind die C1B, die C2 und die Kinase-Domäne in *Ribbon*-Ansicht präsentiert. Bindepartner sind lila dargestellt (Steinberg, 2008).

Die einzelnen PKC-Isoformen sind auf unterschiedliche Weise an verschiedenen Prozessen beteiligt. Sie wirken dabei aber oft entgegengesetzt und so sind auch viele widersprüchlich erscheinende Erkenntnisse publiziert worden (Black und Black, 2013). Allgemein führt die Aktivierung der Isoformen Alpha, Epsilon, Zeta und Iota/Lambda in den meisten Fällen zu verringertem Zellsterben, während PKC δ Apoptose induziert (Reyland, 2009). Mit Ausnahme von PKC γ sind alle Isoformen an der Regulation von T-Zellen beteiligt (Koretzky et al., 1989), wobei PKC θ dabei eine besonders wichtige Rolle einzunehmen scheint (Berry und Nishizuka, 1990; Freeley und Long, 2012; Wang et al., 2012). PKC γ ist hingegen hauptsächlich im Gehirn und anderen neuronalen Geweben von großer Bedeutung (Cardell et al., 1997; Saito und Shirai, 2002).

1.3.1. Regulation der PKCs

Klassische und *novel* PKCs lassen sich allgemein über ihr C1-Modul mittels DAGs, Phorbolestern und Phosphatidylserinen aktivieren (Nishizuka, 1988). Je nach Art der Aktivierung, kann es Unterschiede im Phosphorylierungsmuster der Substrate geben (Robinson, 1992). In-vivo spalten Phospholipase-C-Enzyme, nach Aktivierung über G-Proteine oder Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie dem EGF-Rezeptor (EGFR), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltriphosphat und Diacylglycerin, wodurch es zur Aktivierung der c- und nPKCs kommt (Kadamur und Ross, 2013). Der bekannteste und meist verwendete, artifizielle Aktivator ist der Tumor-Promoter Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), er wird oft auch als 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) bezeichnet (Castagna et al., 1982). Vor kurzem wurde von der Entdeckung eines für PKC δ selektiven Aktivators 7 α -acetoxy-6 β -benzoyloxy-12-O-benzoylroyleanon (Roy-Bz) berichtet (Bessa et al., 2018). Atypische PKCs sind hingegen generell über Phosphatidylinositol und somit indirekt über Insulinstimulation aktivierbar (Velnati et al., 2021; Beeson et al., 2003; Standaert et al., 2001).

Zur Inhibierung der PKCs sind diverse kleine Moleküle beschrieben worden. Jedoch wurde für die wenigsten der Effekt für alle Isoformen bestimmt (siehe Anhang Tab. A1) (Ringvold und Khalil, 2017). Es gibt verschiedene Möglichkeiten die PKCs zu hemmen. Beispielsweise kann die ATP- oder Substrat-Bindung unterbunden, die katalytische Domäne geblockt oder die Öffnung der regulatorischen Domäne verhindert werden. Während es einige Inhibitoren gibt, die potentiell alle PKC-Isoformen inhibieren (Sotrastaurin, Staurosporin) (Evenou et al., 2009; Wagner et al., 2009; Tamaoki et al., 1986), gibt es nur wenige, die wirklich spezifisch für eine Isoform sind. Mit Gö6976, CGP53353, GF109203X und Ly379196 existieren Substanzen, die vergleichsweise gut auf Vertreter der klassischen PKCs wirken (Chalfant et al., 1996; Martiny-Baron et al., 1993; Slosberg et al., 2000; Toullec et al., 1991), aber für die *novel* PKCs gibt es, mit Ausnahme der Inhibitoren für PKC θ (Tumey et al., 2009; Niu et al., 2009) und den peptidbasierten Verbindungen KCe12 und KCe16 für PKC ϵ (Shafrir et al., 2006; Yonezawa et al., 2009), keine Substanzen, die sie von klassischen PKCs unterscheiden können. Für PKC δ wurde zwar der „selektive“ Inhibitor Rottlerin beschrieben und oft verwendet (Gschwendt et al., 1994). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Spezifität dieser Verbindung nicht gegeben ist und es wurde seither davon abgeraten diesen Inhibitor zu verwenden (Soltoff, 2007).

1.3.2. PKCs in der Haut

Anfänglich galt PKC α als die einzig bedeutende PKC-Isoform in der Haut. Im Laufe der Zeit konnten aber weitere Isoformen nachgewiesen werden, wobei gerade die Isoformen Delta, Epsilon, Eta und Zeta deutlich an Bedeutung gewannen (Hirabayashi et al., 1990; Wang et al., 1993; Osada et al., 1990; Helfrich et al., 2007; Basu, 2019; Papp et al., 2003).

PKC α assoziiert vorwiegend mit dem Keratinzytoskelett und den desmosomalen Zell-Zellkontakten (Jansen et al., 2001). Es wird angenommen, dass PKC α eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Wundheilung, Adhäsion und Tumorgenese spielt (Lee et al., 1998; Matsui et al., 1992; Singh et al., 2017a; Singh et al., 2017b). Auch bei Entzündungsreaktionen ist der Einfluss von PKC α gezeigt worden, so kommt es beispielsweise bei einer Überexpression zur verstärkten Expression von proinflammatorischen Mediatoren (Wang und Smart, 1999). Durch Stimulation mittels EGF und HGF (*hepatocyte growth factor*) kommt es zur Translokation an die Plasmamembran (Sharma et al., 2005). In diesem Zusammenhang kann bei gleichzeitiger Überexpression eine verstärkte und bei *Knockdown* eine verlangsamte Wundheilung beobachtet werden (Sharma et al., 2007). Oft wird eine entgegengesetzte Wirkung zu PKC δ beschrieben und man geht zur Zeit von einer Apoptose-verhindernden Wirkung von PKC α aus (Michie und Nakagawa, 2005). Auf Desmosomen bezogen wurde beschrieben, dass die PKC α -abhängige Phosphorylierung von DSP zu einem Adhäsionsverlust und einer Destabilisierung führt (Kröger et al., 2013), dieser Effekt wird deutlich durch die Abwesenheit von Keratin 5 begünstigt (Loschke et al., 2016).

PKC δ ist an Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose beteiligt (Li et al., 2002; Heit et al., 2001; Dietrich et al., 2001). So führt beispielsweise die Aktivierung von PKC δ zu einer Translokation in verschiedene Bereiche, die z.B. im Falle einer Wanderung zum Kern, inhibierend für das Zellwachstum wirkt (Heit et al., 2001). In epidermalen Basalzellen kommt es hingegen zur Interaktion mit den Hemidesmosomen, wodurch es zu einem Adhäsionsverlust kommt, der wiederum Wundheilung begünstigt (Alt et al., 2001). PKC δ funktioniert außerdem maßgeblich als Tumorschutzmechanismus. UV-bedingte Apoptose der Hautzellen wird beispielsweise durch konstitutiv aktive PKC δ (Abspaltung der regulatorischen Domäne) bedingt (Fukunaga et al., 2001; Denning et al., 2002). Des Weiteren wird der MAP-Kinase-Signalweg (MEK/ERK/RSK) über PKC δ aktiviert (Ueda et al., 1996) und zusammen mit PKC η spielt er über Regulation der p38-MAPK eine wichtige Rolle in der

Keratinocytdifferenzierung (Denning, 2010). PKC δ selbst wird über *Src-Signaling* reguliert, indem es zu Tyrosinphosphorylierungen kommt. Jedoch existieren sowohl Publikationen, die einen aktivierenden (Li et al., 1994), als auch welche, die einen inhibierenden Effekt (Denning et al., 1993; Joseloff et al., 2002) beschreiben.

PKC η ist besonders hoch in der Epidermis, vor allem in der Stachelzellschicht (*stratum spinosum*) exprimiert. Innerhalb der Zellen lokalisiert es vorwiegend im perinukleären Bereich und am rauen endoplasmatischen Retikulum. (Chida et al., 1994). PKC η Überexpression in Keratinocyten führt zum Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase (*G1 arrest*) indem es an den CyclinE/cdk2/p21-Komplex bindet und die cdk2- (*cyclin dependent kinase 2*) Kinaseaktivität inhibiert (Kashiwagi et al., 2000). Es leitet außerdem Differenzierung über die Aktivierung der Transglutaminase 1 und Involucrin ein (Kashiwagi et al., 2002; Denning, 2010). Zusätzlich kommt es zur Aktivierung des Fyn-Signalweges und zu verringerter Expression des EGF-Rezeptors (EGFR) (Cabodi et al., 2000). Durch das Fehlen von PKC η kommt es zu erhöhter Karzinogenese, entsprechend scheint PKC η eine tumorunterdrückende Wirkung zu haben (Kashiwagi et al., 2002).

PKC ϵ wird in Keratinocyten hauptsächlich mit Proliferation und Differenzierung in Verbindung gebracht. Jedoch ist die genaue Wirkung größtenteils noch unbekannt. Bekannt ist aber, dass PKC ϵ mit der Raf-1 Kinase interagiert und damit die Produktion von Wachstumsfaktoren induziert (Ueffing et al., 1997) und generell für MAP-Kinase-Aktivierung von Bedeutung ist (Hamilton et al., 2001). PKC ϵ ist außerdem über die Bindung an Intermediärfilamente und die Phosphorylierung von Vimentin in Mechanismen der Zelladhäsion und des Zellspreizens (*Cell Spreading*) involviert (Berrier et al., 2000; Ivaska et al., 2005). Eine Überexpression von PKC ϵ wirkt krebsfördernd (Li et al., 2005), führt aber auch zu erhöhter Wundheilung (Sharma et al., 2007).

Für PKC ζ ist beschrieben, dass es an der calciumabhängigen Differenzierung beteiligt ist (Nishikawa et al., 1997). Durch Interaktion mit Keratin 10 kommt es zur Deaktivierung von PKC ζ , was letztendlich zum Stopp des Zellzyklus führt (Paramio et al., 2001). Während im Gegensatz zu PKC ι/λ keine direkte Anreicherung von PKC ζ an den *Tight Junctions* gezeigt werden konnte (Helfrich et al., 2007), scheint PKC ζ dennoch eine wichtige Rolle bei der Zellpolarität zu haben (Suzuki et al., 2002; Parkinson et al., 2004).

1.3.3. PKCs und Desmosomen

Allgemein gilt die Annahme, dass es durch die Aktivierung der PKCs zu einer Schwächung der bestehenden Desmosomen kommt und somit die Zelladhäsion verringert wird (Amar et al., 1998), sie aber trotzdem zur Ausbildung neuer Desmosomen beiträgt (van Hengel et al., 1997). Gerade für Prozesse wie die Wundheilung spielt das eine bedeutende Rolle und der direkte Einfluss der PKCs konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden (Thomason et al., 2012). Schon früh wurde erkannt, dass PKCs die Desmosomen im calciumabhängigen Zustand halten bzw. in diesen versetzen und Inaktivierung Calciumunabhängigkeit fördert. Sie sind somit ein Regulator von Hyperadhäsion (Wallis et al., 2000; Kimura et al., 2007). Über Inhibitorstudien mittels Gö6976 erwies sich PKC α als bedeutend (Garrod et al., 2005). PKC α -abhängige Phosphorylierung von humanem DSP am Serin 2849 stört die Interaktion zwischen DSP und den Intermediärfilamenten und vermindert somit Desmosomenstabilität (Stappenbeck et al., 1994; Hobbs und Green, 2012). Jedoch führt sie gleichzeitig zu verstärkter Desmosomenbildung durch Rekrutierung von DSP (Godsel et al., 2005), ein Effekt der über Interaktion von PKP2 mit PKC α und DSP mediiert wird (Bass-Zubek et al., 2008). Jedoch wird PKP2 nicht in allen Desmosomen-bildenden Zellen exprimiert und es ist unbekannt, inwieweit die anderen PKP-Isoformen PKP2 in diesem Zusammenhang ersetzen können. Aber auch für PKP3 konnte eine Kolo-kalisation mit PKC α gezeigt werden, die mit einem Rückgang der Zell-Zell-Adhäsion assoziiert wird (Keil et al., 2016). Insgesamt ist noch unklar, welche desmosomalen Proteine direkt Ziel von PKC-abhängiger Phosphorylierung sind und obwohl auch die *novel* PKCs an Keratinozytendifferenzierung und der Regulation von essentiellen Signalwegen, wie des MAPK- und Akt-*Signaling* beteiligt sind, konnten direkte Effekte auf die Desmosomen bisher nur über PKC α gezeigt werden (Adhikary et al., 2010). Entsprechend wurde der Fokus in dieser Arbeit auf die Identifizierung desmosomaler PKC *Targets* und die Bestimmung der beteiligten PKC-Isoformen gelegt.

1.4. Fragestellung

Die Stabilität und Adhäsion der Desmosomen werden unter anderem über Phosphorylierungen reguliert. Dies ist bedeutend für die Fähigkeit der Haut, auf äußere Einflüsse zu reagieren. Für Wundheilung ist es beispielsweise notwendig, dass die Desmosomen dynamischer und weniger adhäsiv werden (Garrod et al., 2005). Die Familie der PKCs scheint maßgeblich an dieser Regulation beteiligt zu sein. Jedoch ist der Einfluss auf die einzelnen desmosomalen Proteine, sowie der Einfluss der unterschiedlichen PKC-Isoformen bisher weitgehend noch unverstanden. Im Zuge dieser Arbeit soll daher systematisch ergründet werden, welche desmosomalen Proteine PKC-abhängig phosphoryliert werden, welche PKC-Isoform/en hierfür verantwortlich sind und welchen Effekt dies auf die Desmosomen und deren Adhäsion hat.

2. Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Cayman Chemical (Ann Arbor, USA), Selleckchem (Houston, USA), Sigma Aldrich (St. Louis, USA), Roche (Basel, Schweiz), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben. SiPools kamen von siTools Biotech (Planegg, Deutschland), Zell-Kultur-Medium wurde von PAN-Biotech (Pasching, Österreich) erworben. Plastik und Verbrauchsmaterialien, wie Kulturschalen usw. kamen von VWR (West Chester, USA), BD Bioscience (San José, USA), TPP (Trasadingen, Schweiz), und Corning (Tewksbury, USA). Das Blot-Papier wurde von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und die Nitrozellulosemembranen von Whatman (Kent, UK) gekauft. Verwendete Geräte und Software sind unter Anhang 6.3. verzeichnet.

2.1. Zusammensetzung der Puffer, Lösungen und Medien:

Blot Puffer I:	0,3 M Tris/HCl; 20 % (V/V) Methanol; pH 10,4
Blot Puffer II:	25 mM Tris/HCl; 20 % (V/V) Methanol; pH 10,4
Blot Puffer III:	25 mM Tris/HCl; 40 mM ϵ -Aminocapronsäure; 20 % (V/V) Methanol; pH 9,4
ECL A:	100 mM Tris/HCl; 25 mM Luminol; 0,4 mM Cumarinsäure; pH 8,5
ECL B:	100 mM/Tris/HCl; 0,02 % H ₂ O ₂ ; pH 8,5
Elektrophorese-Puffer:	25 mM Tris/HCl; 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3
High Calcium Medium (HCM):	DMEM/Ham's F12 (3,5/1,1); Calcium (1,2 mM); 10 % (V/V) FBS Superior (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM Glutamat; 0,18 mM Adenin; 0,5 μ g/ml Hydroxycortison; 5 μ g/ml Insulin; 10 ng/ml EGF; 100 pM Cholera toxin
Low Calcium Medium (LCM):	DMEM/Ham's F12 (3,5/1,1); Calcium (50 μ M); 10 % (V/V) FBS Superior (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM Glutamat; 0,18 mM Adenin; 0,5 μ g/ml Hydroxycortison; 5 μ g/ml Insulin; 10 ng/ml EGF; 100 pM Cholera toxin

Medium ohne Zusätze (serumfrei):	DMEM/Ham's F12 (3,5/1,1)
Mowiol:	5 % (m/V) Mowiol; 30 % (V/V) Glycerin; 0.25% (m/V) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
MT Puffer:	100 mM PIPES; 2mM EDTA; 1 mM EGTA; 4 M Glycerin; 0,5 % (V/V) Triton X-100; pH 6,9
PBS (10x):	1,35 M NaCl; 25 mM; KCl 10 mM KH ₂ PO ₄ ; 100 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
PBSE (10x):	1,35 M NaCl; 25 mM; KCl 10 mM KH ₂ PO ₄ ; 100 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,5 mM EDTA; pH 7,4
Ponceaulösung:	0,2 % Ponceau S; 3 % Trichloressigsäure; 3 % Sulfosalicylsäure
Reaktionspuffer Peptid-Chip-Array:	5 mM MOPS; 2,5 mM β-Glycerophosphat; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM EGTA; 0,4 mM EDTA; 50 μM DTT; pH 7,2
RIPA:	150 mM NaCl; 1 % (m/V) NP-40; 0,5 % (m/V) Natriumdesoxycholat; 0,1 % (m/V) SDS; 50 mM Tris pH 8 + Phosphatase und Protease Inhibitoren: 0,2 mM NaF; 10 ng/ml Aprotinin; 20 ng/ml Leupeptin; 2 μM Pefablock® SC (alternativ AEBSF); 1 mM NaVO ₃
SDS-Probenpuffer (4x):	250 mM Tris-HCl (pH 7,5); 8 % (m/V) SDS; 30 % (V/V) Glycerin; 10 % (V/V) β-Mercaptoethanol; 0,25 % (V/V) Bromphenolblau
Stripping-Puffer:	0,2 M Glycin; 0,05 % (V/V) Tween-20; pH 2,5
Superscript-Puffer (5x):	250 mM Tris/HCl; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; pH 8,3
TBS (10x):	100 mM Tris/HCl; 1 mM NaCl; pH 7,6
TBST (10x):	100 mM Tris/HCl; 1 mM NaCl; 1 % Tween-20; pH 7,6
Trizol	0,8 M Guanidiniumisothiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat pH 5; 5 % (V/V) Glycerin; 48 % (V/V) Aqua-Roti-Phenol
Wet-Blot-Puffer:	25 mM Tris/HCL; 0,192 M Glycin; 20 % Methanol; pH 8,3

2.2. Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1 Zelllinien

Die MKZ-Desmoplakin-KO-Linie wurde von der AG Magin zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Linien wurden von Dr. R. Keil und Dr. K. Rietscher (AG Hatzfeld), wie von Rietscher, 2018 beschrieben, generiert.

Zelllinie	Herstellung	Literatur
MKZ Desmoplakin KO	Spontan immortalisierte Mauskeratinozyten isoliert aus DSP ^{-/-} Maus	(Vasioukhin et al., 2001)
MKZ + GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ wt	(Rietscher, 2018)
MKZ PKP1 KO	Spontan immortalisierte Mauskeratinozyten isoliert aus PKP1 ^{-/-} Maus	(Rietscher et al., 2016)
MKZ + PKP1-GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ wt	Dr. R. Keil (AG Hatzfeld)
MKZ + PKP3-GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ wt	Dr. R. Keil (AG Hatzfeld)
MKZ PKP3 KO	Spontan immortalisierte Mauskeratinozyten isoliert aus PKP3 ^{-/-} Maus	(Sklyarova et al., 2008; Keil et al., 2016)
MKZ PKP3 KO + PKP3-GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ PKP3 KO	(Rietscher, 2018)
MKZ PKP3 KO + PKP3 S92/93/95A-GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ PKP3 KO	Dr. R. Keil (AG Hatzfeld)
MKZ PKP3 KO + PKP3 S134/135A-GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ PKP3 KO	(Rietscher, 2018)
MKZ PKP3 KO + PKP3 S280/283/285A-GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ PKP3 KO	(Rietscher, 2018)
MKZ PKP3 KO + PKP3 S313/314A-GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ PKP3 KO	(Rietscher, 2018)
MKZ PKP3 KO + PKP3 S313/314E-GFP	Generiert aus lentiviraler Transduktion von MKZ PKP3 KO	(Rietscher, 2018)
MKZ wt	Spontan immortalisierte Mauskeratinozyten isoliert aus Geschwistertieren der PKP1 ^{+/+} Maus	(Rietscher et al., 2016)

2.3. Zellkultur

Zellen wurden auf mit Kollagen I beschichteten Schalen in LCM, bei 32 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum Beschichten wurden 50 µg/µl Kollagen I in 0,02 M Essigsäure auf die Schalen gegeben und diese für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS. Für alle Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, Mauskeratinozyten der Passagen 20 bis 50 verwendet (MKZ-wt).

Zum Passagieren wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und daraufhin mit 2 ml Trypsinlösung (0,02 % Trypsin in PBSE) pro 10 cm² für 10 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren von der Schale gelöst und in ein 15 ml Grainer-Röhrchen mit 3 ml LCM pro 10 cm Schale überführt. Es wurde bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert und das Medium abgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml LCM pro eingesetzter Schale resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 ausgesät. Das Passagieren erfolgte je nach Zelldichte alle 2 bis 3 Tage.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden vor dem Aussäen 20 µl der Zellsuspension in 380 µl PBS aufgenommen und durchmischt. 10 µl hiervon wurden auf eine Neubauer Zellzählkammer (Laboroptik; Friedrichshof; Deutschland) gegeben. Das Auszählen erfolgte mit Hilfe eines Wilovert A -Mikroskops (Hund; Wetzlar, Deutschland).

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Pellet nach Trypsinbehandlung in LCM + 10 % DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C in einem Isopropanol-Gefrierbehälter eingefroren. Zum Auftauen der Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension in 9 ml LCM pro ml Zellsuspension aufgenommen und bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen, wie oben beschrieben, ausgesät.

2.4. Stimulation durch PMA, EGF, Insulin

MKZ wurden in LCM ausgesät (50000 – 60000 Zellen pro cm² für Western-Blot (WB), 40000 Zellen pro cm² für Immunfluoreszenz (IF)). Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel zu HCM. Die Zellen wurden je nach Experiment für 24 bis 72 h in HCM kultiviert. Daraufhin wurden sie entweder 2x mit PBS gewaschen und für 4 h mit Medium ohne Zusätze inkubiert (Serumentzug) oder direkt mittels PMA (1 µM), EGF (100 ng/ml) bzw. Insulin (5 µg/ml)

stimuliert. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Stimulationsdauer 15 min. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Inhibitoren wurde der jeweilige Inhibitor vorgelegt.

2.5. Inhibierung und EGTA Behandlung

MKZ wurden wie in 2.3. beschrieben in LCM ausgesät und nach 24 h für die entsprechende Zeit in HCM kultiviert, daraufhin wurde der jeweilige Inhibitor (gelöst in DMSO) für eine bzw. zwei Stunde/n hinzugegeben. Die Konzentration der Inhibitoren im Medium war dabei wie in Tab. 3 angegeben. Als Kontrolle wurde DMSO, entsprechend der mit den Inhibitoren zugesetzten DMSO-Menge, verwendet. Die EGTA Behandlung 1 bzw. 2 h lief nach einem identischen Schema ab. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Inhibitor und EGTA wurde der Inhibitor eine Stunde vorgelegt. Es wurden 3,3 mM EGTA verwendet.

Tab. 3 Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Ziel	Konzentration [μM]	Händler
Gö6976	PKC α	2	Cayman Chemical; Ann Arbor; USA
Sotrastaurin	Alle PKCs	3	Cayman Chemical; Ann Arbor; USA
U0126	MEK	10	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA
Fr180204	ERK	25	Selleckchem; Houston; USA
BI-D1870	RSK	10	Selleckchem; Houston; USA
Rapamycin	mTOR	0,1	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA

2.6. Knockdown

Für die *Knockdown*-Experimente wurden die Zellen mit Hilfe von Lipofectamin RNAiMax (0,75 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) mit den spezifischen siRNA-POOLS (PKC α 2,5 pmol/ cm^2 ; PKC δ/η 1 pmol/ cm^2 ; RSK 2 pmol/ cm^2) transfiziert. Jeder siPOOL bestand aus 30 verschiedenen siRNAs, welche spezifisch für das jeweilige Zielgen sind. Durch die geringe Konzentration der einzelnen siRNAs werden *Offtarget*-Effekte minimiert (Hannus et al., 2014). Als Kontrolle wurde ein Negativ-Kontroll-siPOOL (2,5 pmol/ cm^2), bestehend aus 30 siRNAs, die nicht mit Mausgenen interagieren, verwendet. Der jeweilige siPOOL und Lipofectamin RNAiMax wurden für 5 min alleine und anschließend gemeinsam für maximal 30 min bei RT in Medium ohne Zusätze

(50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) vorinkubiert, anschließend wurde der Ansatz zusammen mit LCM (200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) auf frisch ausgesäte Zellen gegeben. Am nächsten Tag fand ein Mediumwechsel statt.

2.7. Lyse und Probenvorbereitung für Western-Blot bzw. Immunpräzipitation

Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, daraufhin in 600 μl RIPA Buffer mit Protease-/Phosphataseinhibitoren pro 10 cm Schale lysiert und von der Schale gelöst. Der Zellaufschluss erfolgte durch mehrmaliges auf- und abpipettieren durch Kanülen verschiedener Größe. Zelltrümmer wurden bei 13000 rpm für 15 min abzentrifugiert. 500 μl des Überstandes wurden für die Immunpräzipitation (IP) genutzt. Die übrigen 100 μl wurden mit 33 μl 4xSDS Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt (Input). Wenn keine IP durchgeführt wurde, wurden die gesamten 600 μl mit 200 μl 4xSDS Probenpuffer gemischt und ebenfalls für 5 min bei 95 °C erhitzt (Input).

2.8. Immunpräzipitation

Pro IP wurden 20 μl Protein-A-Agarose verwendet. Die Agarose wurde 3x in RIPA-Puffer (500 μl) equilibriert und für 2 h mit dem jeweiligen Antikörper in 500 μl RIPA-Puffer bei 4 °C am Rotator inkubiert (1 μl PKP3 #2; 1 μl DSP 616; 5 μl DSG1+2 Progen; 20 μl JUP 618). Daraufhin wurden die Agarose 2x mit RIPA-Puffer mit Protease/Phosphataseinhibitoren (500 μl) gewaschen. Danach wurden 500 μl Lysat auf die Agarose gegeben und wieder für 2 h bei 4 °C am Drehrad inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Agarose nochmals 3x mit RIPA-Puffer mit Protease-/Phosphataseinhibitoren (500 μl) gewaschen. Die Agarose wurde abzentrifugiert (4000 rpm), Überstand verworfen und in 50 μl 1x SDS Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C erhitzt (Eluat). Für die Spezifitätskontrolle siehe Anhang Abbildung A1.

Zur Präzipitation von PKP1 wurde eine PKP1-GFP-Überexpressionslinie verwendet. PKP1-GFP wurde über eine GFP-Trap (ChromoTek, Planegg, Deutschland) präzipitiert. 15 μl GFP-Trap-Agarose pro IP wurden 3x in RIPA-Puffer mit Protease-/Phosphataseinhibitoren (500 μl)

equilibriert. Danach wurde 500 µl Lysat auf die Agarose gegeben und dieses für mindestens 1 h bei 4 °C am Rotator inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Agarose nochmals 3x mit RIPA-Puffer mit Protease-/Phosphataseinhibitoren (500 µl) gewaschen. Die Agarose wurde abzentrifugiert (4000 rpm), Überstand verworfen und in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C erhitzt (Eluat).

2.9. SDS-PAGE und Western-Blot

Die Proteinproben wurden mittels SDS-Page aufgetrennt (Laemmli, 1970). Hierzu wurden Polyacrylamid-Gele mit 10 % Polyacrylamid für Proteine ≤ 120 kDa und 8 % Polyacrylamid für Proteine ≥ 120 kDa verwendet. Pro Probe wurden 20 µl auf das Gel geladen. Die Laufkammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Auftrennung erfolgte für 20 min bei 80 V und anschließend für 2-3 h bei 100 V.

Danach wurden die Proteine mittels *Wet-Blot* oder *Semi-dry*-Verfahren auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Zur Übertragung mittels *Semi-dry*-Verfahren wurde ein PerfectBlue *Semi-Dry*-Blotter verwendet. Der Aufbau erfolgte nach folgendem Schema: Kathode (-), 3x Whatman Zellulosefilterpapier getränkt in Blot-Puffer III, SDS-Gel, Nitrozellulosemembran getränkt in Blot-Puffer II, 3x Whatman Zellulosefilterpapier getränkt in Blot-Puffer II; 3x Whatman Zellulosefilterpapier getränkt in Blot-Puffer I, Anode (+). Die Übertragung erfolgte bei 1 mA/cm² für 45 min und anschließenden 1,5 mA/cm² für 30 min.

Der Transfer über das *Wet-Blot*-Verfahren erfolgte für 1 h bei 110 V in einer mit *Wet-Blot*-Puffer gefüllten Kammer (Mini Trans-Blot[®] Cell, Bio-Rad, Hercules, USA) nach folgendem Schema: Kathode (-), Schwamm, 2x Whatman Zellulosefilterpapier, SDS-Gel, Nitrozellulosemembran, 2x Whatman Zellulosefilterpapier, Schwamm, Anode (+). Der Erfolg des Transfers wurde bei beiden Methoden über eine Ponceaufärbung kontrolliert (5 min Färbung in Ponceaulösung, Entfärbung: 5 min in TBST).

Anschließend wurden die Membranen mit 3 % BSA/PBS Lösung geblockt und mit den gewünschten primären Antikörpern über Nacht inkubiert (Tab. 3). Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x mit TBST gewaschen und anschließend in 3% Milchpulver/TBST mit den Sekundärantikörpern für 1 h behandelt (Tab. 4). Nach abschließendem Waschen mit TBST wurde das Chemilumineszenz-Signal mit dem Fusion-SL 3500.WL *imaging system* (PepLab,

Erlangen, Deutschland) aufgenommen. Hierzu wurde die Membran zuvor mit 1 ml einer ECL Lösung, bestehend aus je 500 ml ECL A und ECL B benetzt. Sofern im Anschluss weitere Proteine auf derselben Membran detektiert wurden (z.B. Protein-Signal nach Phosphor-Signal), wurde die Membran für 1h mit *Stripping*-Puffer behandelt. Nach dreimaligem Waschen (TBST) und anschließendem Blocken in 3 % BSA/TBST wurde die Membran mit den jeweiligen primären Protein-Antikörper inkubiert und wie oben beschrieben weiter behandelt. (siehe Tab. 3).

Tab. 3 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog Nr.	Spezies	Klon	WB	IF
Akt (pan)	Cell Signaling	#2920	Maus	40D4	1:1000	-
p-Akt pan pS473	Cell Signaling	#9271	Kaninchen	Polyklonal	1:500	-
Dsg 1+2	Progen	61002S	Maus	DG3.10	1:200	-
DSP 1+2	AG Hatzfeld	616	Kaninchen		1:10000	1:500
p-DSP 1+2 pS177/178	Cell Signaling	#5885	Kaninchen	Polyklonal	1:500	-
eIF4B	Cell Signaling	#3592	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	-
p-eIF4B pS422	Cell Signaling	#3591	Kaninchen	Polyklonal	1:500	-
ERK 1+2	Cell Signaling	#4696	Maus	L34F12	1:1000	-
p-ERK 1+2 pT202/pY204	Cell Signaling	#4376	Kaninchen	20G11	1:500	-
GFP	Rockland	600-401- 215	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	-
GSK3 β	Cell Signaling	#12456	Kaninchen	D5C5Z	1:1000	-
p-GSK3 β pS9	Cell Signaling	#14630	Maus	D2Y9Y	1:500	-
PG	AG Hatzfeld	618	Kaninchen		1:1000	-
MEK 1+2	Cell Signaling	#4694	Maus	L38C12	1:750	-
p-MEK 1+2 pS217/221	Cell Signaling	#9154	Kaninchen	41G9	1:500	-
p-Motiv RXXpS/pT	Cell Signaling	#9614	Kaninchen	110B7E	1:500	-

Antikörper	Hersteller	Katalog Nr.	Spezies	Klon	WB	IF
PKC α	Cell Signaling	#59754	Kaninchen	D7E6E	1:1000	-
PKC δ	Cell Signaling	#2058	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	-
PKC η	Abcam	ab179524	Kaninchen	EPR18513	1:1000	-
PKP1	AG Hatzfeld	667	Kaninchen		1:2000	1:500
PKP3	AG Hatzfeld	#2	Meer- schweinchen		1:10000	1:4000
RSK1+2+3	Cell Signaling	#9355	Kaninchen	32D7	1:1000	-
p-RSK pan pS380	Cell Signaling	#9341	Kaninchen	Polyklonal	1:500	-
S6	Cell Signaling	#2217	Kaninchen	5G10	1:1000	-
p-S6 pS235/236	Cell Signaling	#4858	Kaninchen	D57.2.2E	1:1000	-
S6K	Cell Signaling	#9202	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	-
p-S6K pT389	Cell Signaling	#9234	Kaninchen	108D2	1:500	-

Tab. 4 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog Nr.	Spezies	Konzentration
Anti-Kaninchen Cy3	Dianova	011-160-003	Esel Polyklonal	1:300 (IF)
Anti-Kaninchen HRP	Dianova	SBA-6440-05	Esel Polyklonal	1:20000 (WB)
Anti-Meerschweinchen Alexa 488	Dianova	706-545-148	Esel Polyklonal	1:750 (IF)
Anti-Meerschweinchen HRP	Dianova	706-035-148	Esel Polyklonal	1:20000 (WB)
Anti-Maus HRP	Dianova	SBA-6415-05	Esel Polyklonal	1:20000 (WB)

2.10. Präparation der Immunfluoreszenz-Färbungen

Zellen wurden auf mit Kollagen I beschichteten 2 cm² großen Deckgläschen kultiviert (40000 Zellen pro cm²) und entsprechend des jeweiligen Experimentes behandelt. Die Deckgläschen wurden daraufhin 1x mit PBS gewaschen und die Zellen daraufhin für 10 min entweder mit Methanol bei -20 °C oder mit 3,7%iger Formaldehydlösung bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Deckgläschen für 15 min mit MT-Puffer und anschließend für mindestens 30 min mit 1%iger BSA/PBS-Lösung behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern bei 4 °C über Nacht (Tab 3). Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen 3x mit PBS und 1x mit 1%iger BSA/PBS-Lösung gewaschen und für 1h mit dem jeweiligen Sekundärantikörper, plus Hoechst 33342 (1:1000) zur Visualisierung der Kerne, bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 4). Abschließend wurden die Deckgläschen 3x mit PBS, 1x mit ddH₂O und 1x mit 96%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Mowiol eingebettet. Aufnahmen erfolgten mit Hilfe einer an ein Nikon Eclipse E600 Mikroskop mit APO 60x/1.40 NA Ölobjektiv gekoppelten Kamera über die NIS-Elements AR 4.12.00 Software. Die anschließende Bildbearbeitung erfolgte mittels ImageJ Fiji. (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012).

2.11. Quantifizierungen

Zur Quantifizierung der Western-Blots (Phosphorylierung) und der Immunfluoreszenz-Färbungen (Lokalisation) wurde ImageJ Fiji verwendet. Die Signifikanz wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt und mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ angegeben (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD). Die jeweiligen Graphen und Abbildungen wurden mit Hilfe von PowerPoint (Microsoft, Redmond, USA) und OriginLab 8.5.1 (Origin Lab Corporation, Northampton, USA) erstellt.

Zur Quantifizierung des Phosphorylierungssignals im Western-Blot wurde das Integral der Signalstärke der Phosphorantikörperbande bestimmt und durch das Integral der Signalstärke der entsprechenden Proteinantikörperbande geteilt (p-Protein/Protein). Für die Quantifizierung der *Knockdowns* wurde auf das PKP3-Signal normiert (PKC/PKP3).

Zur Quantifizierung der PKP3-Lokalisation wurde eine 200 pxl lange Linie mit einer Breite von 10 pxl über den lateralen, durch den trizellulären Bereich bis ins Zytoplasma gelegt (Abb.9) und die Pixelintensität über den ROI-Manager (ImageJ Fiji) bestimmt. Ausgewertet wurden für den lateralen Bereich Pixel 130-190, für den trizellulären Pixel 96-103 und für den zytoplasmatischen Bereich die Pixel 5-65. Es wurden je nach Behandlung zwischen 50 und 200 Zellkontakte aus unabhängigen Experimenten ausgewertet.

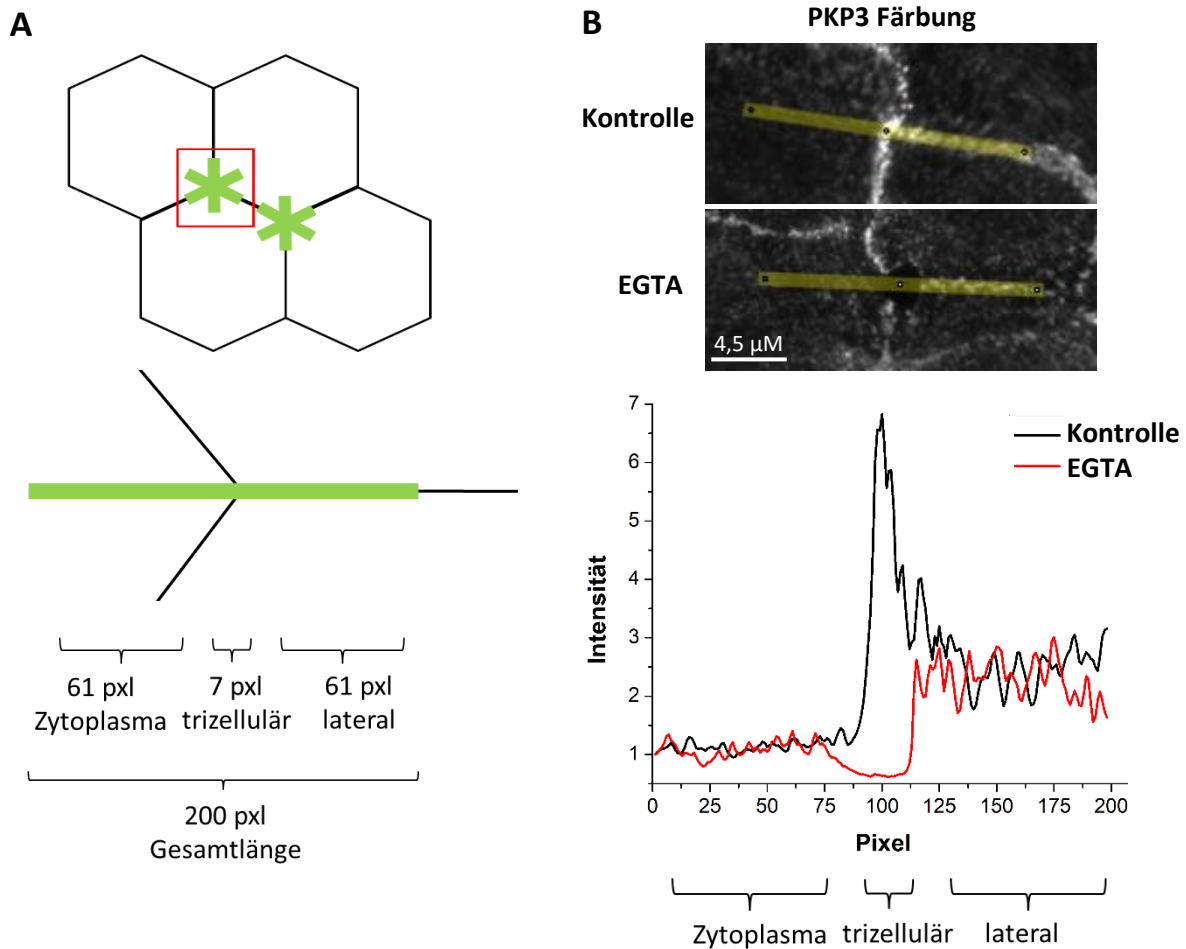


Abb. 9 Quantifizierung der PKP3 Lokalisation

Links (A) ist das Schema der Quantifizierungsmethode gezeigt. Eine 200 pxl lange Linie wurde über den lateralen Bereich, durch den trizellulären bis ins Zytoplasma gelegt. Ausgewertet wurden jeweils für den lateralen Bereich Pixel 130-190, für den trizellulären die Pixel 96-103 und für den zytoplasmatischen Bereich die Pixel 5-65. Rechts (B) ist ein Beispiel für eine Quantifizierung eines Zellkontakts unbehandelter Zellen im Vergleich zu mit EGTA Behandelten Zellen gezeigt. Übersichtshalber wurde in diesem Beispiel nur je eine Linie über den Kontakt gelegt und ausgewertet.

2.12. Expressionsanalyse

2.12.1. RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und in 1,5 ml in Trizol pro 10 cm² homogenisiert. Zelltrümmer wurden für 15 min bei 12000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Daraufhin wurde zweimal eine Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde 1/5 Volumen Chloroform zugegeben und die Probe gut durchmischt. Es wurde für 15 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Diese wurde mit 1/2 Volumen Trizol und 1/5 Volumen Chloroform vermischt und der Vorgang wiederholt. Die so erhaltene obere Phase wurde abgenommen, mit 1 Volumen Isopropanol gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde 1x mit 1 ml 75%igem Ethanol pro ml verwendetem Trizol für 5 min gewaschen und für 5 min bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen und das Pellet wurde an der Luft bei RT getrocknet. Das Pellet wurde daraufhin in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD_{260/280} bestimmt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Isolation wurden 0,25 µg RNA mit 5 µl H₂O und 5 µl 2x RNA-Loading-Dye versetzt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und für 3 min auf Eis gekühlt. Daraufhin wurden die Proben über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt. Es ergaben sich je 2 scharfe Banden (18S und 28S) (nicht gezeigt).

2.12.2. cDNA Synthese

Mittels SuperScript® II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde sie unter folgenden Reaktionsbedingungen in cDNA umgeschrieben. In einem 12 µl Ansatz wurden 250 ng *random* Primer, 1 µg RNA und 1 µl dNTPs (je 10 mM) mit RNase-freiem ddH₂O gemischt und für 5 min auf 65 °C erhitzt. Daraufhin wurden 2 µl 0,1 M DTT und 4 µl 5xSuperScript Puffer hinzugegeben und für 2 min bei 25 °C inkubiert. Es wurde 1 µl (200 Units) SuperScript® II Reverse Transcriptase hinzupipettiert und weitere 10 min bei 25 °C inkubiert. Das Gemisch wurde danach für 50 min auf 42 °C erhitzt. Die Reaktion wurde abschließend durch 15-minütiges Erhitzen auf 70 °C inaktiviert.

2.12.3. Real Time PCR

Für die Real Time PCR wurde Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und das Roche LightCycler 480 II Real Time PCR-System verwendet. Die über die SuperScript® Transcriptase erhaltende cDNA wurde 1:20 (0,25 µl) mit je 0,2 µM Primer und 50 % Mastermix (2,5 µl) pro Reaktion vermischt (Gesamtvolumen 5 µl). Es wurden folgende Einstellungen gewählt: Die Proben wurden für 15 min bei 95 °C vorinkubiert, daraufhin durchliefen sie 40 Zyklen mit je 95 °C für 15 s, 62 °C für 15 s und 72 °C für 20 s. Die Messung der gebildeten DNA erfolgte jeweils nach der Synthesephase. Die Primer-Effizienz war für alle Primer vergleichbar. Für die verwendeten PKC-Primer siehe Tab. 5. Als *Housekeeping*-Gen wurde die POL2R verwendet.

Tab. 5 PKC-Primer für die Expressionsanalyse

Name	Sequenz 5'→3'	Tm [°C]	Position in der CDS
Maus-PKCα-qPCR-FW	AACCAAACCATCCGCTCCA	60,18	854
Maus-PKCα-qPCR-REV	AAGTCATTCCGAGTCGTCCG	59,83	985
Maus-PKCβ-qPCR-FW	GGAAGCAGGGATTCCAGTGT	59,67	402
Maus-PKCβ-qPCR-REV	GTAGGACTGGAGTACGTGTGG	59,53	558
Maus-PKCγ-qPCR-FW	TACAATGTACCGGTGGCCGA	61,26	1114
Maus-PKCγ-qPCR-REV	GACACGCTTCTCTACGAGGG	59,9	1311
Maus-PKCδ-qPCR-FW	ATTCGAGAGGGACCCTGACA	59,96	1977
Maus-PKCδ-qPCR-REV	AGTTGCTGTAGTCTGAAGGGG	59,37	2128
Maus-PKCε-qPCR-FW	AGGATTTTGGCTCTGGCTCG	60,39	2180
Maus-PKCε-qPCR-REV	TTTCGGGACCGCTGAATCTG	60,39	2316
Maus-PKCζ-qPCR-FW	CCCTTCCTGGTTGGCTTACA	59,6	1137
Maus-PKCζ-qPCR-REV	TCCCCGCCATTGACATACTC	59,53	1216
Maus-PKCη-qPCR-FW	CGTCCATAAACGCTGCCATC	59,7	1091
Maus-PKCη-qPCR-REV	ATGTTGATGCCAAACCGCTG	59,76	1195
Maus-PKCθ-qPCR-FW	GTCTCCCATGCTCCACCAA	59,96	1044
Maus-PKCθ-qPCR-REV	CACTTCGGGTTTCAGGAGGAC	60,04	1180
Maus-PKCι-qPCR-FW	GATGAGGAAGGAGACCCATGT	58,88	428
Maus-PKCι-qPCR-REV	GTGCCCTCTCCGGTAAATG	60,46	602

2.13. Peptid-Chip-Kinase-Array

Der Peptid-Chip-Kinase-Array wurde nach Müller *et al.* 2020 durchgeführt. Die Kinasen wurden von Abcam (Cambridge, UK) erworben, PKC α (ab55672), PKC δ , (ab60844), PKC η (ab60849). Auf dem Chip (JPT Peptid Technologies, Berlin, Deutschland) waren Peptide der desmosomalen Proteine in Form von 15-Aminosäure-langen Peptiden fixiert, wobei je 10 Aminosäuren sequenzgleich mit dem nächsten Peptid waren. Die Peptidchips wurden über Nacht in 0,5 mg/ml PEG 20000 und 200 μ M ATP geblockt. 1 U (1 nmol/min) der entsprechenden PKC wurde für 10 Minuten in 450 μ l Reaktionspuffer plus 10 μ M ATP und 50 μ l 10x PKC Lipid Aktivator (SignalChem, Richemond, Kanada) zur Autophosphorylierung vorinkubiert. Daraufhin wurde die Lösung zusammen mit 100 μ Ci γ^{32} -P-ATP (6000 Ci/mmol, Perkin Elmer, Waltham, USA) auf den Chip gegeben und für 2 h bei 32°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Chip dreimal mit 1%iger, wässriger SDS-Lösung, einmal mit 1%iger Triton-X100 PBS-Lösung, dreimal mit ddH₂O und einmal mit Ethanol für je 10 Minuten gewaschen. Die Detektion des Phosphorsignals erfolgte über Autoradiographie. Hierzu wurde ein Fotofilm für 3 Tage auf den Chip fixiert und danach in der Dunkelkammer entwickelt (1 min Entwicklungslösung (Kodak, New York, USA), 1x Waschen H₂O, 30 s Fixierlösung (Kodak, New York, USA)). Die Strahlung der radioaktiv-phosphorylierten Peptide führte zu einer Schwärzung des Films an der entsprechenden Position. Die so erhaltenen Spots konnten direkt den jeweiligen Peptiden zugeordnet werden, indem über PhotoScape (MOOITech; Korea) ein Rasterfeld entsprechend des Aufbaus der Peptidchips auf den Film gelegt wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Modellsystem Mauskeratinozyten

Als Modellsystem wurden nicht transformierte, immortalisierte Mauskeratinozyten (MKZ) verwendet (Rietscher et al., 2016). Es handelte sich hierbei um eine Primärkultur, die sich aus Stammzellen der Mausepidermis selektiert hatte. Die Zellen wurden in Medium mit niedriger Ca^{2+} -Konzentration (50 μM , LCM) gehalten, da so nicht nur die Ausbildung von Adhärenzkontakten, sondern auch die Differenzierung verhindert wird. In diesem Medium können die Zellen weiter passagiert werden. Bei Kontakt mit Calcium (1,2 mM, HCM) beginnen die Zellen zu differenzieren und mehrschichtig zu wachsen. Nach ca. 1 h sieht man erste native Desmosomen, nach einem Tag haben nebeneinanderliegende Zellen durchgehend Desmosomen ausgebildet. Diese Desmosomen sind noch weitgehend Calcium-abhängig. Nach 3 - 6 Tagen in HCM gehen die Desmosomen in einen Calcium-unabhängigen Zustand über. Differenzierungsmarker werden im Laufe von 2 - 6 Tagen exprimiert. Es kommt in Kultur jedoch nicht zur Verhornung, das heißt die Keratinozyten differenzieren nicht bis hin zu Korneozyten.

3.2. Phosphorylierung desmosomaler Proteine

3.2.1. Stimulation von Map-Kinasen, Akt und PKCs

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und Insulin/IGF1 sind potente, natürliche Aktivatoren des MAPK- und Akt-Signalweges, während PMA ein starker Aktivator der klassischen und *novel* PKCs ist. Um herauszufinden, nach welchem Zeitintervall die Kinasekaskade durch die Wachstumsfaktoren bzw. PMA aktiviert ist, wurde die Phosphorylierung der Schlüsselkinasen mittels phospho-spezifischer Antikörper im WB detektiert und eine Zeitreihe durchgeführt. Untersucht wurde dabei der Effekt auf die MAPK ERK, MAPKK MEK, MAPKAPK RSK, Akt und das desmosomale Protein Desmoplakin (Abb.10). Da bereits nach 15 Minuten eine deutliche Signaländerung beobachtet wurde, die zum Teil nach 30 Minuten wieder abflachte, wurde für alle folgenden Experimente standardmäßig eine Stimulationsdauer von 15 Minuten gewählt. Danach galt es zu untersuchen, welche desmosomalen Proteine durch diese Stimulationen ein verändertes Phosphorylierungsmuster aufweisen. Hierzu wurden die Proteine mittels Immunpräzipitation isoliert und Phosphorylierungen mittels eines Phosphomotiv-Antikörpers,

der ein für AGC-Kinasen typisches Motiv (RXXpS/pT) erkennt, identifiziert. Theoretisch phosphorylierbare *Sites* des RXXS/T-Motivs sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

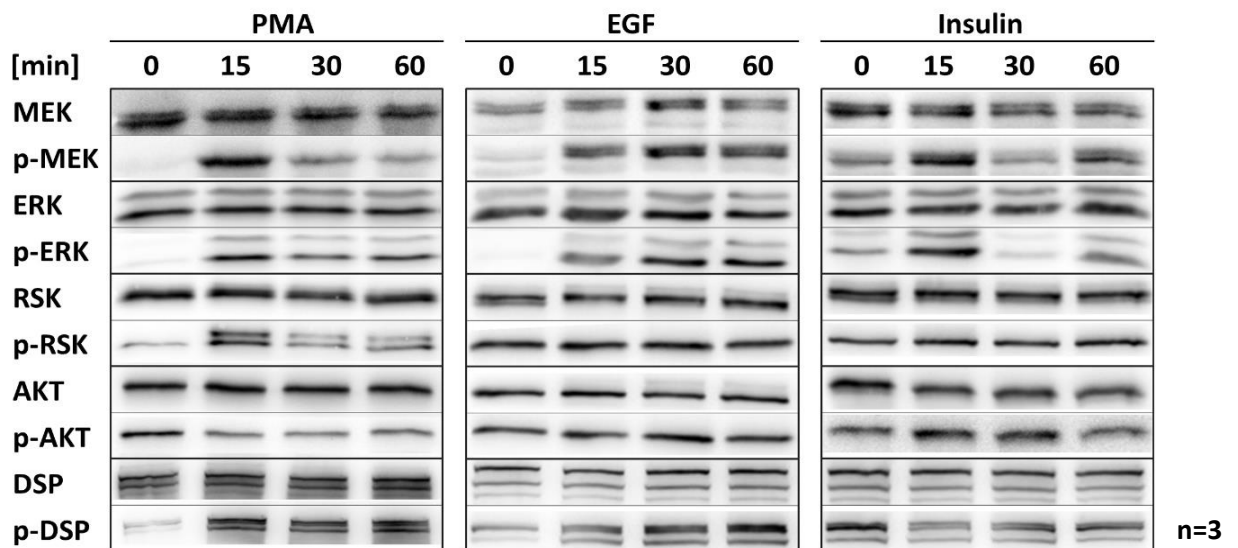


Abb. 10. Zeitreihe der Stimulation mit PMA, EGF, Insulin zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit

MKZ wurden 24h in HCM kultiviert und daraufhin 4 h unter Serumentzug gehalten. Danach wurden sie je für 0, 15, 30 bzw. 60 Minuten mit PMA, EGF oder Insulin stimuliert. Das Phosphorylierungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert: pMEK (pS217/221), pERK (pT202/pY204), pRSK (pS380), pAKT (pS473), pDSP (pS165/166) S177/178 in Maus.

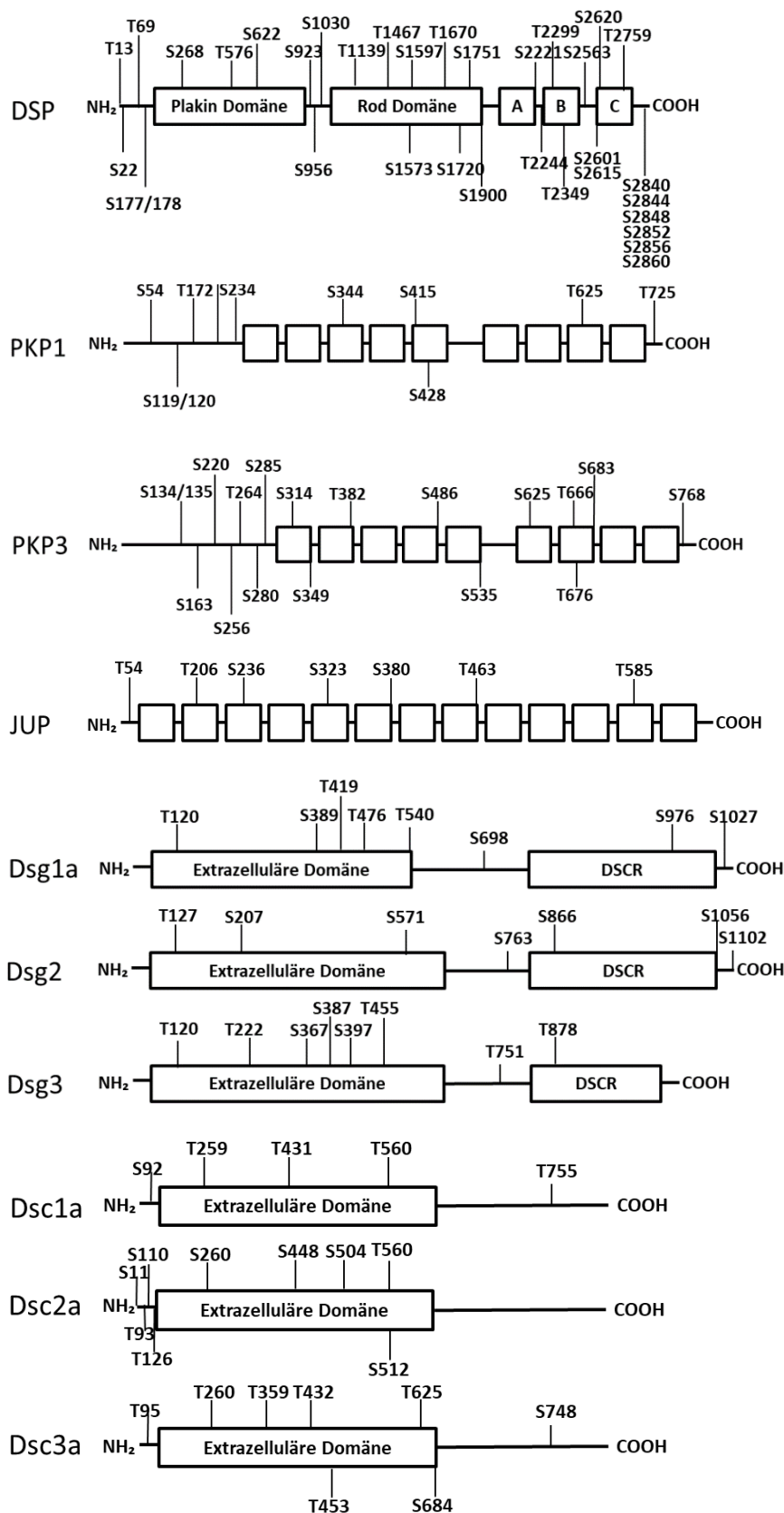


Abb. 11 RXXS/T Motive in desmosomalen Proteinen der Maus

Dargestellt sind die Serine und Threonine, die in den RXXS/T-Motiven der desmosomalen Proteine Desmoplakin (DSP), Plakophilin 1/3 (PKP1/3), Plakoglobin (JUP), Desmoglein 1a/2/3 (Dsg 1a/2/3) und Desmocollin 1a/2a/3a (Dsc 1a/2a/3a) der Maus vorkommen. DSCR steht für Desmoglein-spezifische zytoplasmatische Region.

PKP2 und Dsg4 werden in den hier untersuchten Mauskeratinozyten nicht exprimiert und wurden daher nicht untersucht. Für Dsg3 standen leider keine Antikörper zur Verfügung und es konnte daher ebenfalls nicht betrachtet werden. Für Dsc ist es nicht gelungen, eine erfolgreiche Immunpräzipitation durchzuführen, jedoch befinden sich ohnehin kaum mögliche Phosphorylierungssites in der intrazellulären Desmocollindomäne. Es ist ein generelles Problem, dass kaum Antikörper existieren, die geeignet sind, um die desmosomalen Cadherine in Mauszellen zu identifizieren.

Die Zellen wurden für 24 h in HCM kultiviert. Um mögliche Phosphorylierungen, die aufgrund der Wachstumsfaktoren im Vollmedium auftreten, zu unterdrücken, wurden die Zellen danach für 4 h einem Serumentzug ausgesetzt. Anschließend wurden sie mit PMA, EGF bzw. Insulin stimuliert. Der Erfolg der Stimulation wurde über die Phosphorylierung von MEK, ERK, RSK, Akt und S6 validiert (Abb.12). MEK, ERK und RSK wurden deutlich über PMA aktiviert, dieser Effekt war stärker als über EGF und Insulin. Akt wurde hingegen durch PMA inaktiviert und deutlich durch Insulin stimuliert. Für S6 konnte eine deutliche Phosphorylierung sowohl unter PMA-, als auch unter EGF-Stimulation beobachtet werden. PKP3 wies ebenfalls eine deutliche Phosphorylierungszunahme unter PMA-Stimulation auf. Auch unter EGF-Einfluss kam es zu einer Zunahme, jedoch war der Effekt durch PMA wesentlich stärker. Selbiges galt auch für DSP an der Position S177/178. Jedoch war dieser Effekt deutlich weniger deutlich im DSP-Eluat, das mit einem generellen Motivantikörper (RXXpS/pT) untersucht wurde. PKP1 zeigte ein deutlich erhöhtes Signal, sowohl nach Insulin, als auch nach EGF-Stimulation, aber durch PMA kam es zu einer schwach verringerten Phosphorylierung. Für JUP und Dsg 1/2 konnte keine signifikante Phosphorylierungsänderung beobachtet werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass (a) die Aktivierung der PKCs durch PMA zur Regulation der Desmosomen beiträgt und (b) DSP und PKP3 wesentlich für die Vermittlung des Effektes verantwortlich sind. Entsprechend dieser Ergebnisse wurde der Fokus auf PKP3 und DSP S177/178 gesetzt.

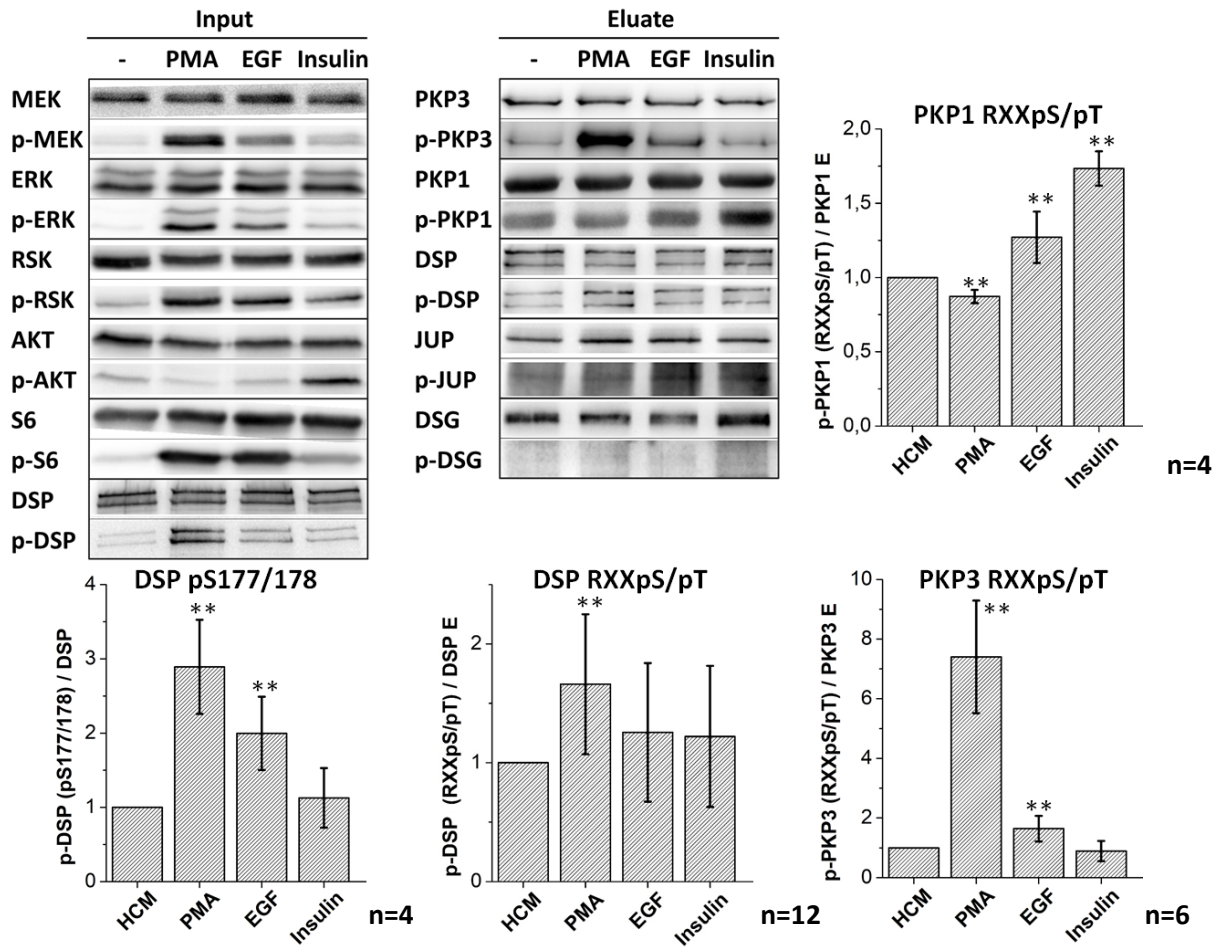


Abb. 12 Stimulierbarkeit desmosomaler Proteine mittels PMA, EGF, Insulin

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert und daraufhin 4 h unter Serumentzug gehalten. Danach wurden sie je für 15 Minuten mit PMA, EGF bzw. Insulin stimuliert. Die Phosphorylierungssignale wurde mittels Western-Blot detektiert. Als Eluat gekennzeichnete Proteine wurden zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieser Proteine wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

Als Nächstes wurde überprüft, ob die PMA-Stimulation auch im Vollmedium, also ohne Serumentzug nachweisbar ist oder ob die Zellen im Vollmedium durch EGF und Insulin bereits so stark stimuliert sind, dass eine Wirkung von PMA nicht erkennbar ist (Abb.13). Der Effekt von PMA war unabhängig vom Serumentzug und trat genauso unter Vollmedium-Bedingungen auf. Daher wurde in den folgenden Experimenten auf den Serumentzug verzichtet. Da DSP zu großen Teilen unlöslich ist, wurde zudem überprüft, ob die DSP-Phosphorylierung auch im unlöslichen Pool (Pellet) auftritt. Und auch der unlösliche Pool von DSP wurde deutlich am S177/178 nach PMA-Stimulation phosphoryliert.

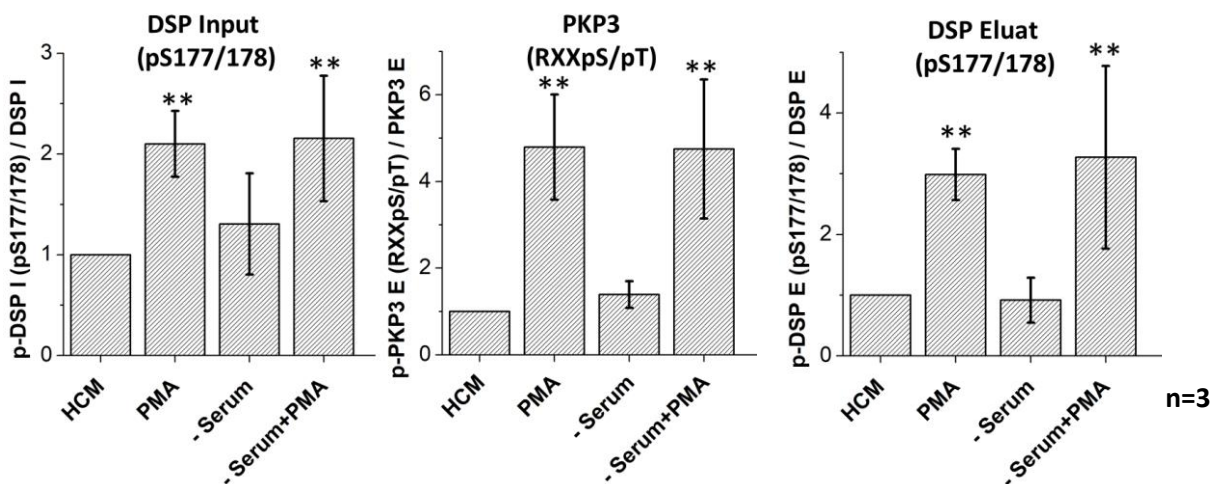
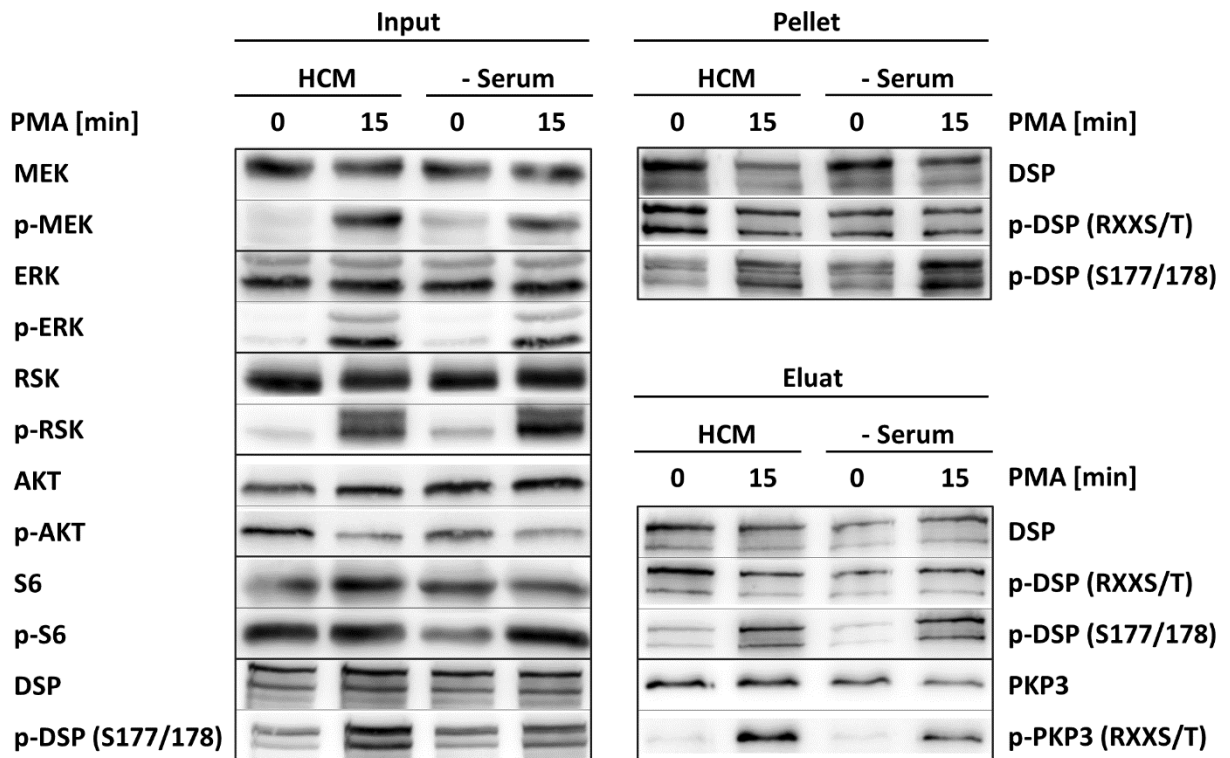


Abb. 13 Stimulierbarkeit von DSP und PKP3 in Abhängigkeit vom Serumentzug

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde daraufhin für 4 h einem Serumentzug ausgesetzt. Danach wurden alle Zellen je für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Das Phosphorylierungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Mit als „Eluat“ gekennzeichnete Proteine wurden zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieser Proteine wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Zusätzlich wurde auch der unlösliche Pool nach der Stimulation von Desmoplakin untersucht (DSP P). Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

3.2.2. Einfluss der PMA Stimulation auf die Lokalisation

Es stellt sich nun die Frage, ob diese Phosphorylierungen sichtbaren Einfluss auf die Desmosomen nehmen. Um dies zu beantworten, wurden die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP mit und ohne PMA-Stimulation betrachtet (Abb. 14). In unbehandelten Zellen lag PKP3 verstärkt an den trizellulären Kontakten vor, während PKP1 eher an den lateralen Kontakten lokalisierte und DSP relativ gleichmäßig an der Membran verteilt war. Trizelluläre Kontakte erfahren in der Regel die stärkste mechanische Belastung und müssen daher sowohl besonders stabil als auch dynamisch sein. Je nach Art der Belastung werden verschiedene biochemische Signalketten aktiviert (Mechanotransduktion), die der Zelle ermöglichen, auf den mechanischen Stress zu reagieren (Higashi und Miller, 2017). Unter dem Einfluss von PMA kam es zu einer Umverteilung. PKP3 war nun relativ einheitlich über die Zellkontakte verteilt. Generell wirkten die Kontakte nun fransiger und die Zellgrenzen begannen uneindeutiger zu werden. Es kam zu verstärktem Überwachsen der Zellen und vereinzelt auftretenden Löchern/Rissen. Die Lokalisation an trizellulären Kontakten war sichtbar reduziert.

PMA

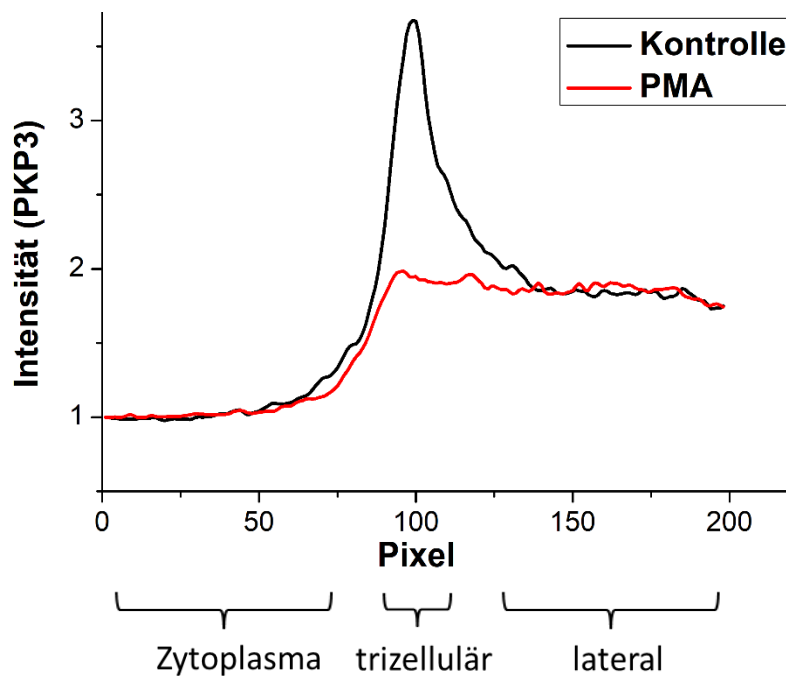
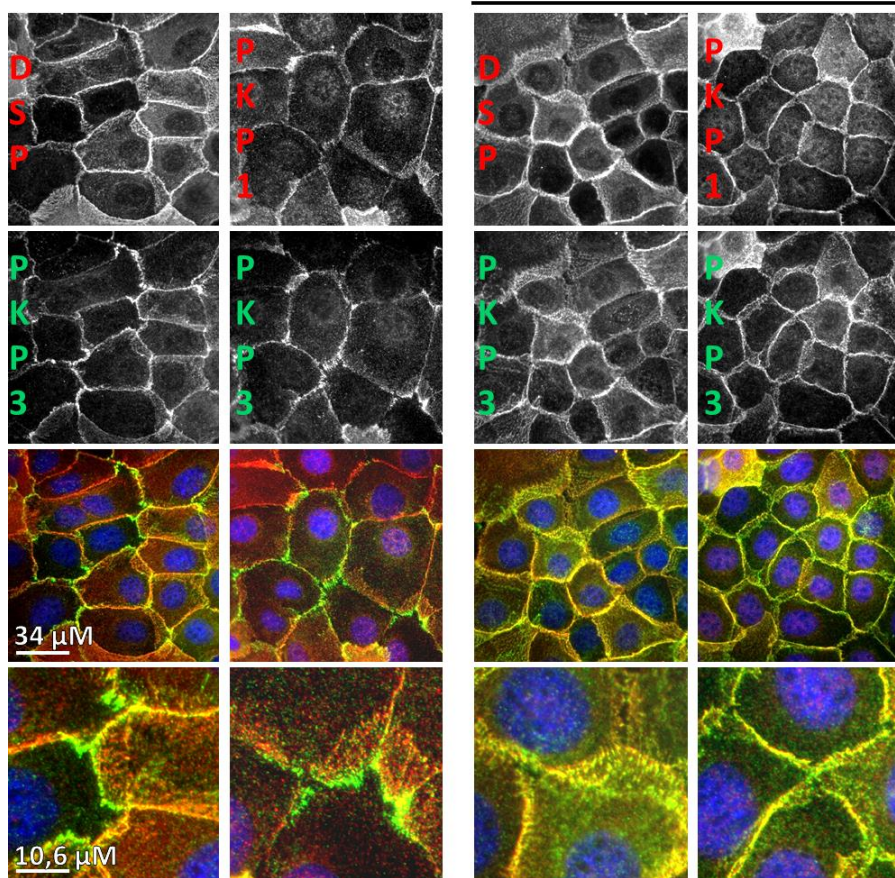


Abb. 14 Einfluss von PMA auf die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie je für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP und PKP1 je rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μm , der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μm . Die PKP3 Lokalisation ist als Mittelwert der Intensität unten grafisch für die jeweiligen Behandlungen dargestellt.

3.3. Identifikation der verantwortlichen PKC-Isoform

3.3.1. Expression der PKCs in Mauskeratinozyten

Da über PMA generell alle klassischen und *novel* PKCs aktiviert werden, ist es unklar, welche PKC-Isoform/en für die bisher gezeigten Effekte auf die Desmosomen verantwortlich sind. Um dies genauer zu untersuchen, wurde zunächst mittels qRT-PCR überprüft, welche PKCs in Mauskeratinozyten exprimiert sind und ob sich die Expression nach Beginn der Differenzierung (durch *Shift* von LCM zu HCM) ändert.

Die CT-Werte der Isoformen waren nach Zugabe von Calcium vergleichbar mit dem LCM-Level (Tab. 6). Die Isoformen α , δ , ζ , η , ι/λ waren dabei am abundantesten. Zeta und Iota/Lambda sind aber atypische Isoformen. Da nur die klassischen und die calciumunabhängigen *novel* PKCs durch PMA stimulierbar sind (Steinberg, 2008; Newton, 2010), kann ein direkter Effekt durch die atypischen Isoformen ausgeschlossen werden. Die Isoformen Beta und Theta schienen nicht exprimiert zu sein. Relevant blieben somit die klassischen Isoformen Alpha, Gamma und die *novel* PKCs Epsilon, Delta und Eta.

Tab. 6 CT-Werte der PKC Isoformen in Mauskeratinozyten (n = 3)

Gen	CT Werte		
	LCM	HCM	
Kontrolle	POLR2 (Kontrolle)	20.68	21.25
Klassisch	PKCα	23.51	23.76
	PKCβ	>40	>40
	PKCγ	27.10	27.48
Novel	PKCδ	21.94	22.92
	PKCϵ	25.90	26.67
	PKCη	23.77	23.76
	PKCθ	>40	>40
Atypisch	PKCζ	24.52	24.60
	PKCι/λ	21.15	21.47

3.3.2. Calciumentzug

Um nun zwischen dem Einfluss der klassischen und der *novel* PKCs differenzieren zu können, wurde den Zellen im folgenden Experiment Calcium mittels EGTA entzogen (Abb.15). Da die klassischen PKCs calciumabhängig, die *novel* aber calciumunabhängig sind, ist zu erwarten, dass ein Calciumentzug zu einer Verringerung der Aktivität der klassischen PKCs führt.

Durch das Entziehen von Calcium kam es jedoch nicht zu einer Verringerung des Phosphorylierungs-Signals, hingegen führte es sogar zu einer leichten Erhöhung. Dieser Effekt trat sowohl bei PKP3 (RXXS/T), als auch bei DSP (S177/178) auf. Außerdem war die Aktivierung des MAP-Kinase- und des AKT-Signalweges durch den Calciumentzug leicht verstärkt. Dies weist somit auf einen möglichen Effekt durch die *novel* PKCs (ϵ , δ , η) hin.

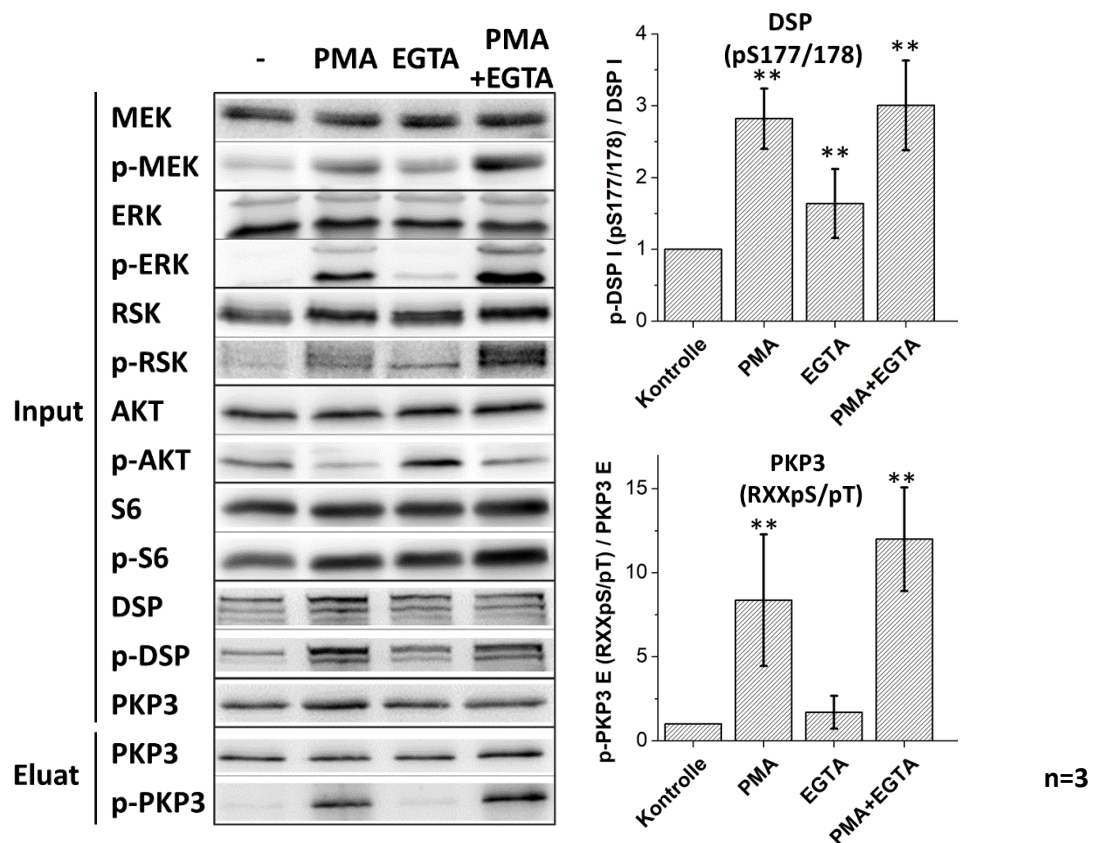


Abb. 15 Calciumabhängigkeit der PMA Stimulation

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 1 h mit EGTA behandelt und je für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach EGTA). Das Phosphorylierungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Als Eluat gekennzeichnete Proteine wurden zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieser Proteine wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

3.3.3. Inhibierung der PKCs und des MAP- sowie des Akt-Signalweges

Da PKC-Aktivität neben der Phosphorylierung der desmosomalen Proteine auch die Aktivierung der Enzyme des MAP-Kinase-Signalweges und die Deaktivierung des Akt-Signalweges zur Folge hatte, ist es möglich, dass die bisher gezeigten Phosphorylierungen nur indirekt durch PKCs ausgelöst werden. Zur Bestimmung welche Kinasen nun an der Phosphorylierung von PKP3 und DSP beteiligt sind und wie weit MAP-Kinase und Akt-Signalweg darauf Einfluss nehmen, wurden die entsprechenden Enzyme mit Hilfe von Inhibitoren gehemmt und der PMA-Effekt beobachtet (Abb.16 & 17). Untersucht wurde die Phosphorylierung der am MAP-Kinase-Signalweg beteiligten Enzyme MEK, ERK und RSK, repräsentativ für das Akt-Signaling, die ribosomale protein-S6-Kinase (S6K) und Akt selbst, sowie die *Target*-Proteine S6, der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 4B (eIF4B), die Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3 β) und die desmosomalen Proteine DSP und PKP3 (Abb. 18). Es wurden Sotrastaurin (Sotra) zur Inhibierung aller PKCs, Gö6976 zur Inhibierung von PKC α (repräsentativ für klassische PKCs), Rapamycin für mTOR, U0126 für MEK, FR180204 für ERK und BI-D1870 für RSK verwendet. Leider war zum jetzigen Zeitpunkt kein spezifischer Inhibitor nur für die *novel* PKCs beschrieben, sodass nur der Breitbandinhibitor Sotrastaurin verwendet werden konnte.

Den Erwartungen entsprechend, schwächte die Inhibierung mittels Sotrastaurin die Wirkung von PMA bei allen untersuchten Proteinen signifikant ab, inaktivierte somit die MAP-Kinasen und reaktivierte Akt. Die Inhibierung von PKC α mittels Gö6976 zeigte hingegen nur auf die PKP3-Phosphorylierung einen deutlich reduzierenden Effekt. Nach den Ergebnissen des Calciumzugexperimentes ist dies unerwartet. Des Weiteren schien die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges durch Gö6976 leicht verstärkt zu sein. Die Regulation des Akt-Signalweges war hiervon aber weitestgehend unbeeinflusst. Die Phosphorylierung von DSP wurde durch Gö6976 leicht reduziert. Inaktivierung von mTOR mittels Rapamycin zeigte mit Ausnahme der entsprechenden *Downstream-Targets* S6K und S6 keine Effekte. Die Inhibierung der MAP-Kinase MEK verhinderte die *Downstream* Aktivierung von ERK und RSK, zeigte zudem aber Effekte auf DSP und Akt. Das Blocken von ERK zeigte hingegen kaum Einfluss auf DSP und keine Wirkung auf Akt, stattdessen wurde die PKP3-Phosphorylierung aufgehoben. Da ERK aber durch die Inhibierung von MEK ebenfalls inaktiviert wurde und bei der Verwendung des U0126 Inhibitors keine Effekte auf PKP3 zu beobachten waren, ist es gut

möglich, dass die Wirkung von FR180204 auf PKP3 nicht auf die Inhibierung von ERK, sondern auf einen *Offtarget*-Effekt zurückzuführen war. Die Inaktivierung von RSK schien unter PMA Stimulation keinen Effekt auf PKP3 zu haben, hingegen ließ sich aber ein Effekt auf DSP beobachten.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieses Experimentes für eine Beteiligung der klassischen PKC-Isoform α an der Regulation von PKP3 und für eine Regulation von DSP (S177/178) über eine andere, ggf. eine *novel* PKC-Isoform mit möglicher Beteiligung des MAP-Kinase-Signalweges. Nach diesen Daten ist PKC α -Aktivität nicht für die Aktivierung der MAPKs notwendig. Für PKP3 korrelieren diese Ergebnisse nicht mit denen des Calciumzuges. Aufgrund der begrenzten Spezifität vieler Inhibitoren, ist es nicht immer eindeutig, ob es sich bei den beobachteten Effekten tatsächlich um Effekte durch die Inhibierung des *Target*-Enzyms handelt. Daher wird später mittels *Knockdown* genauer überprüft werden, welchen Einfluss die einzelnen PKC-Isoformen auf die Phosphorylierung der untersuchten Proteine haben.

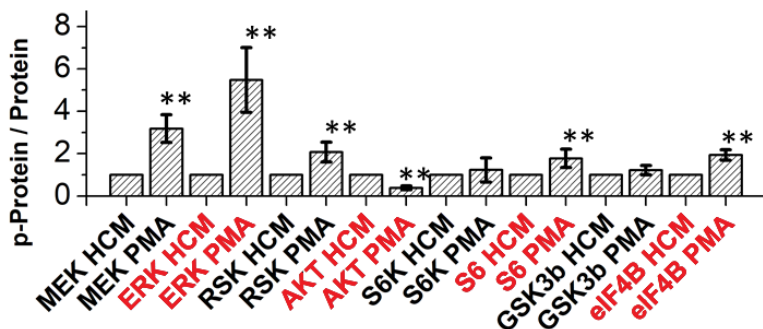
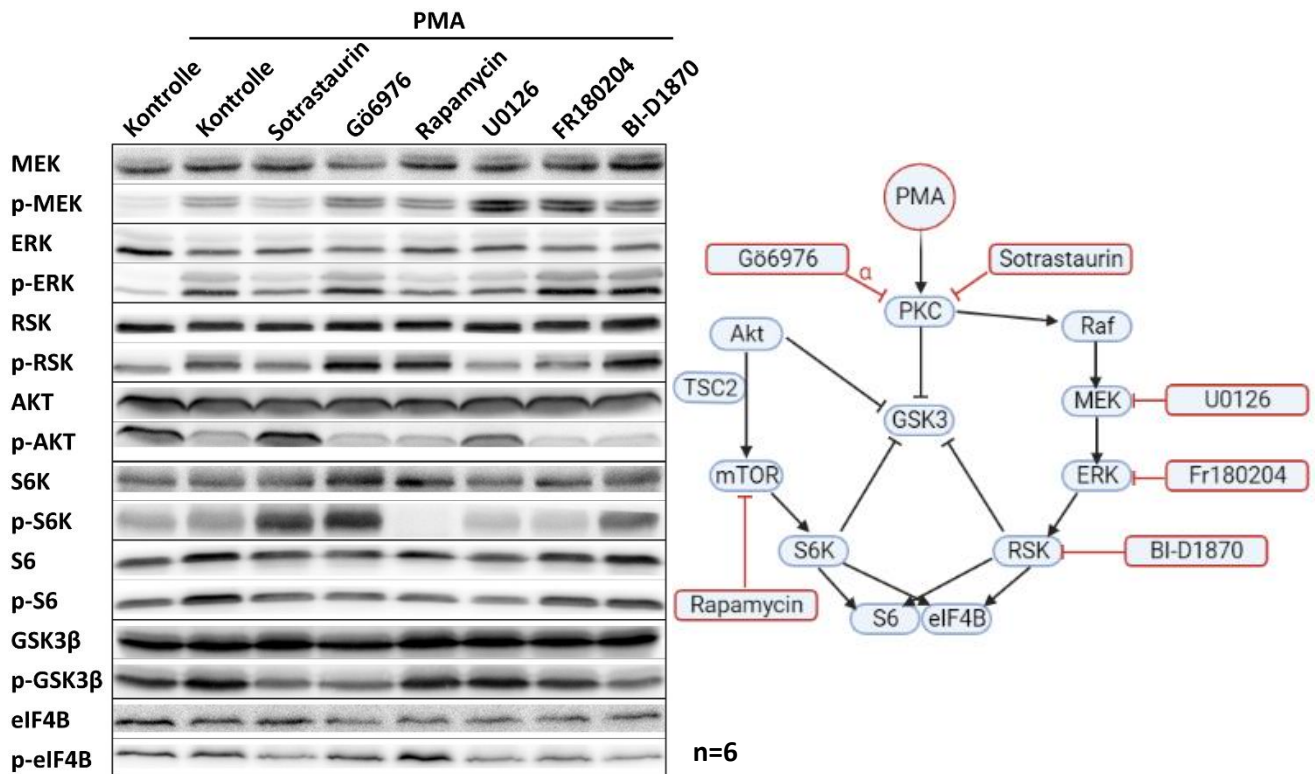


Abb. 16 Einfluss von Inhibitoren auf die PMA Signale im MAP und Akt Signalweg

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 1 h mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt und je für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach Inhibitor). Das Phosphorylierungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt. Rechts oben ist schematisch der Zusammenhang der einzelnen Proteine im Signalweg und der Effekt der Inhibitoren gezeigt. Dieses wurde über Biorender.com (2021) erstellt. Unten ist die Quantifizierung des PMA-Effektes auf die untersuchten Proteine gezeigt

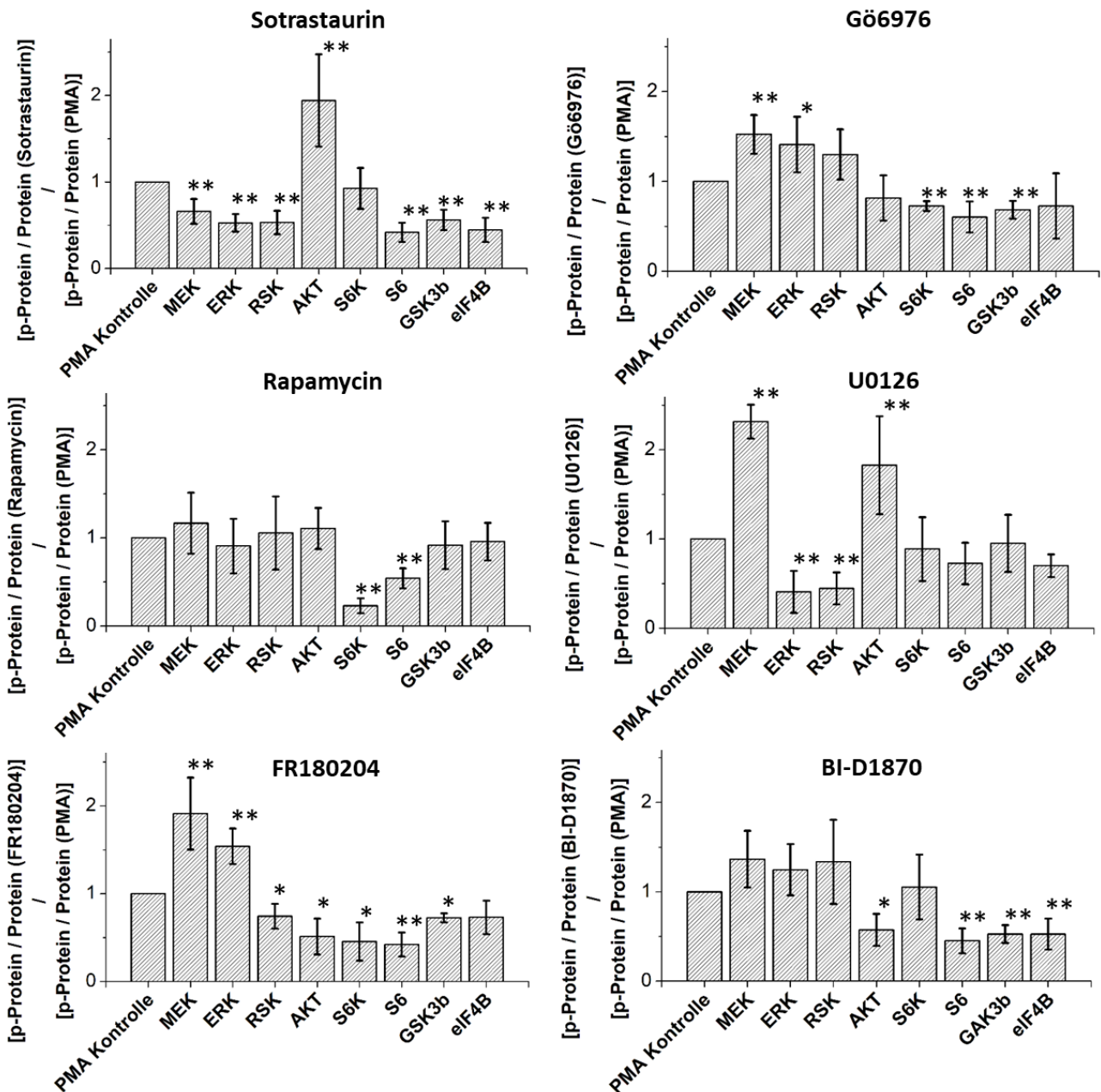


Abb 17. Quantifizierung des Einflusses von Inhibitoren auf die PMA Signale im MAP und Akt Signalweg
 MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 1 h mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt und je für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach Inhibitor). Das Phosphorylierungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur PMA Behandlung und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

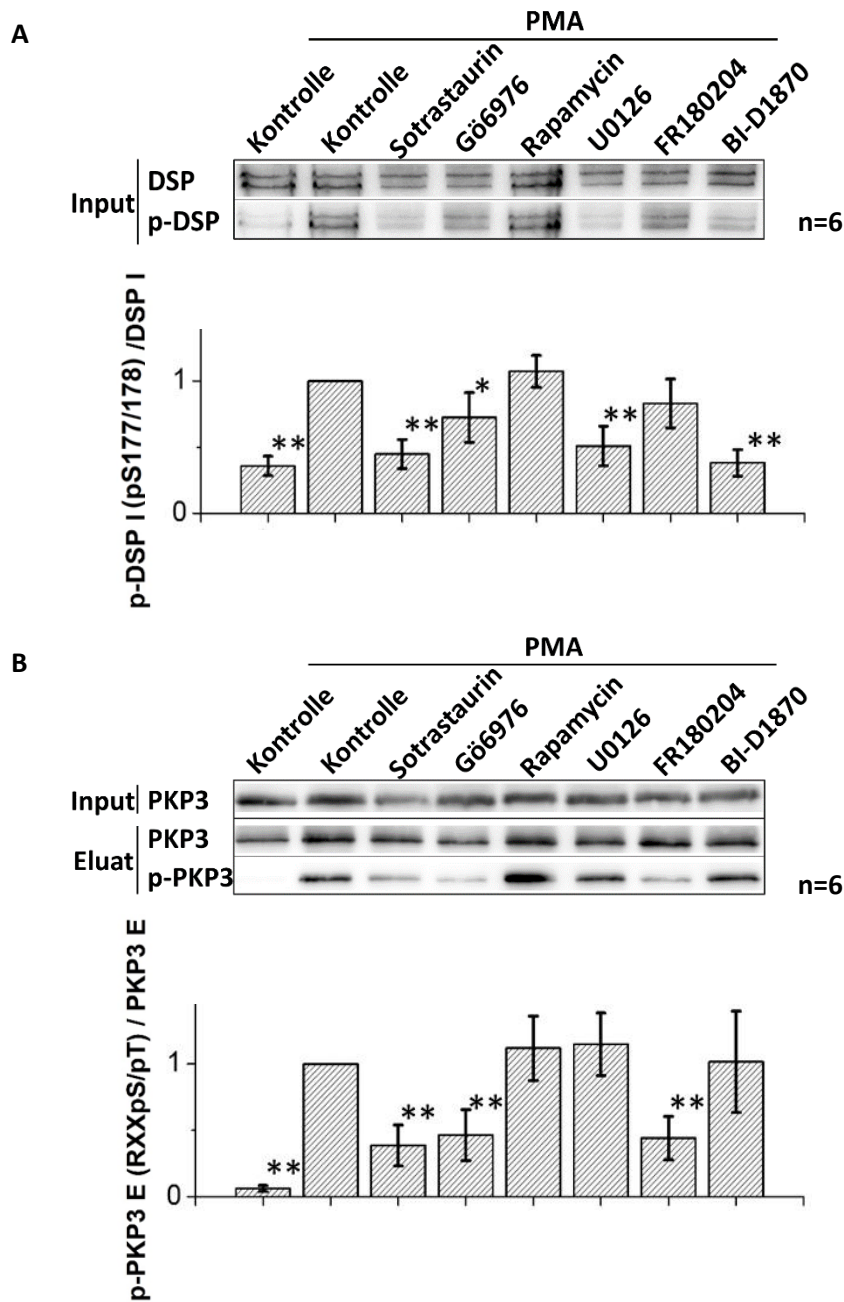


Abb 18. Einfluss von Inhibitoren auf das PMA Signal von DSP (A) und PKP3 (B)

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 1 h mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt und je für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach Inhibitor). Das Phosphorylungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Das PKP3 Eluat (B) wurde zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieses Proteins wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur PMA Behandlung und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

3.3.4. Der Einfluss von Sotrastaurin und Gö6976 auf die Lokalisation von PKP3 und DSP und den Effekt von PMA

Für PMA wurde in 3.2.2. gezeigt, dass es die Lokalisation desmosomaler Proteine beeinflussen kann. Sotrastaurin sollte diesen Effekt aufheben können, während Gö6976 nach den Ergebnissen von 3.3.3. zumindest den Effekt auf PKP3 unterbinden müsste. Über den Calciumentzug mittels EGTA ist bekannt, dass er die Zellverbindungen abschwächt, da die Cadherine calciumabhängig sind (Pitelka et al., 1983; Rothen-Rutishauser et al., 2002). Dies gilt auch für Dsg und Dsc solange keine Hyperadhäsion erreicht wurde. Um den Effekt von den Inhibitoren in diesem Zusammenhang zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt und die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP untersucht.

Durch die Behandlung mittels Sotrastaurin bzw. Gö6976 verdeutlichte sich die trizelluläre Lokalisation von PKP3. Die Zellkontakte waren gradlinig und gut erkennbar. Durch das Behandeln der Zellen mit EGTA bildeten sich Löcher an den trizellulären Bereichen (stärkste mechanische Belastung). Unter den hier verwendeten Bedingungen waren die Desmosomen nicht hyperadhäsiv, entsprechend war dieser Effekt zu erwarten. Weder Sotrastaurin noch Gö6976 haben die destabilisierende Wirkung von EGTA auf die Zellkontakte unterbunden. Jedoch war die Größe der Lücken bei Gö6976-Behandlung leicht reduziert (Abb.19).

Wie in 3.2.2. beschrieben, führte die Behandlung mit PMA zu einer veränderten PKP3 Lokalisation und zu diffuseren, fransigeren Zellgrenzen. Diese Effekte wurden bei gleichzeitiger Behandlung mit Sotrastaurin deutlich unterdrückt, PKP3 blieb weiterhin stark an den trizellulären Kontakten. Jedoch brachte die Inhibierung mittels Gö6976 keinen *Rescue* des PMA-Phänotyps. Auch die Effekte von PMA auf PKP3 blieben vorhanden und somit war PKP3 trotzdem deutlich an den trizellulären Kontakten reduziert, obwohl Gö6976 im Western-Blot PMA-induzierte Phosphorylierung auf PKP3 unterdrückt hatte (Abb. 20 & 21). In Kombination mit PMA war die Wirkung von EGTA nochmals verstärkt, sodass größere Löcher in den trizellulären und auch Lücken in den lateralen Bereichen auftraten. Diese PMA-bedingte Verstärkung schien aber deutlich durch Sotrastaurin, jedoch nur sehr leicht durch Gö6976 abgeschwächt zu werden (Abb. 22 & 23).

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass PMA die Stabilität der Zellkontakte verringert. Der Effekt von PMA kann durch den Breitbandinhibitor Sotrastaurin aufgehoben werden, vom

PKC α -spezifischen Inhibitor Gö6976 aber nur bedingt. Entsprechend weisen auch diese Daten auf eine Beteiligung einer weiteren PKC-Isoform hin. Auffällig ist, dass die Wirkung von Gö6976 auch in der Immunfluoreszenzfärbung nicht mit der im Western-Blot korreliert und dass Gö6976 bei gleichzeitiger EGTA-Behandlung einen stabilisierenderen Effekt zeigt, als der Breitbandinhibitor Sotrastaurin, welcher ebenfalls die PKC α inhibiert. Mögliche unspezifische Effekte durch Gö6976 sind entsprechend denkbar.

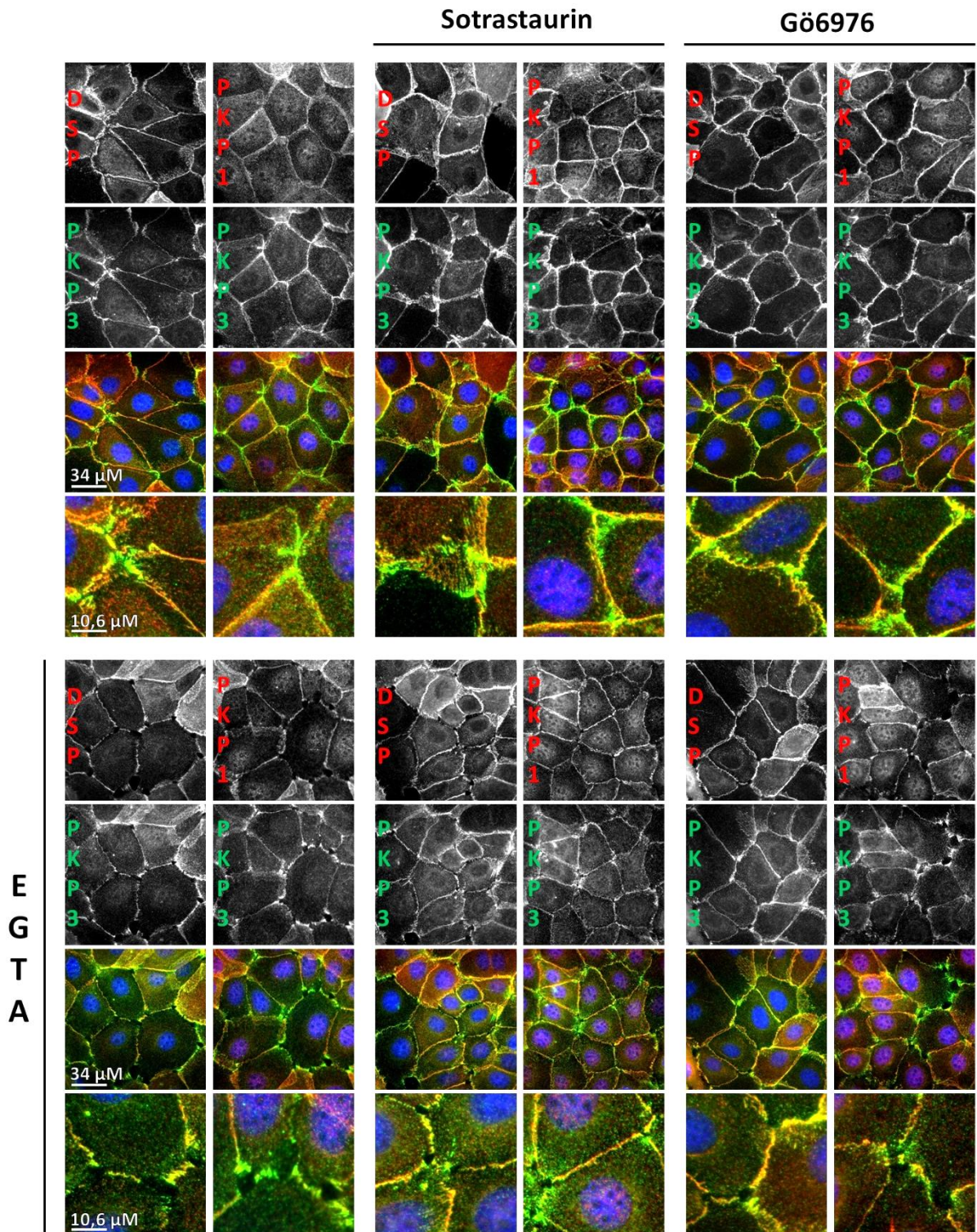


Abb. 19 Einfluss von EGTA, Sotrastaurin und Gö6976 auf die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 2 h mit dem entsprechenden Inhibitor und 1 h mit EGTA und je für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 105 min nach dem Inhibitor). Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP und PKP1 je rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 µm, der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 µm.

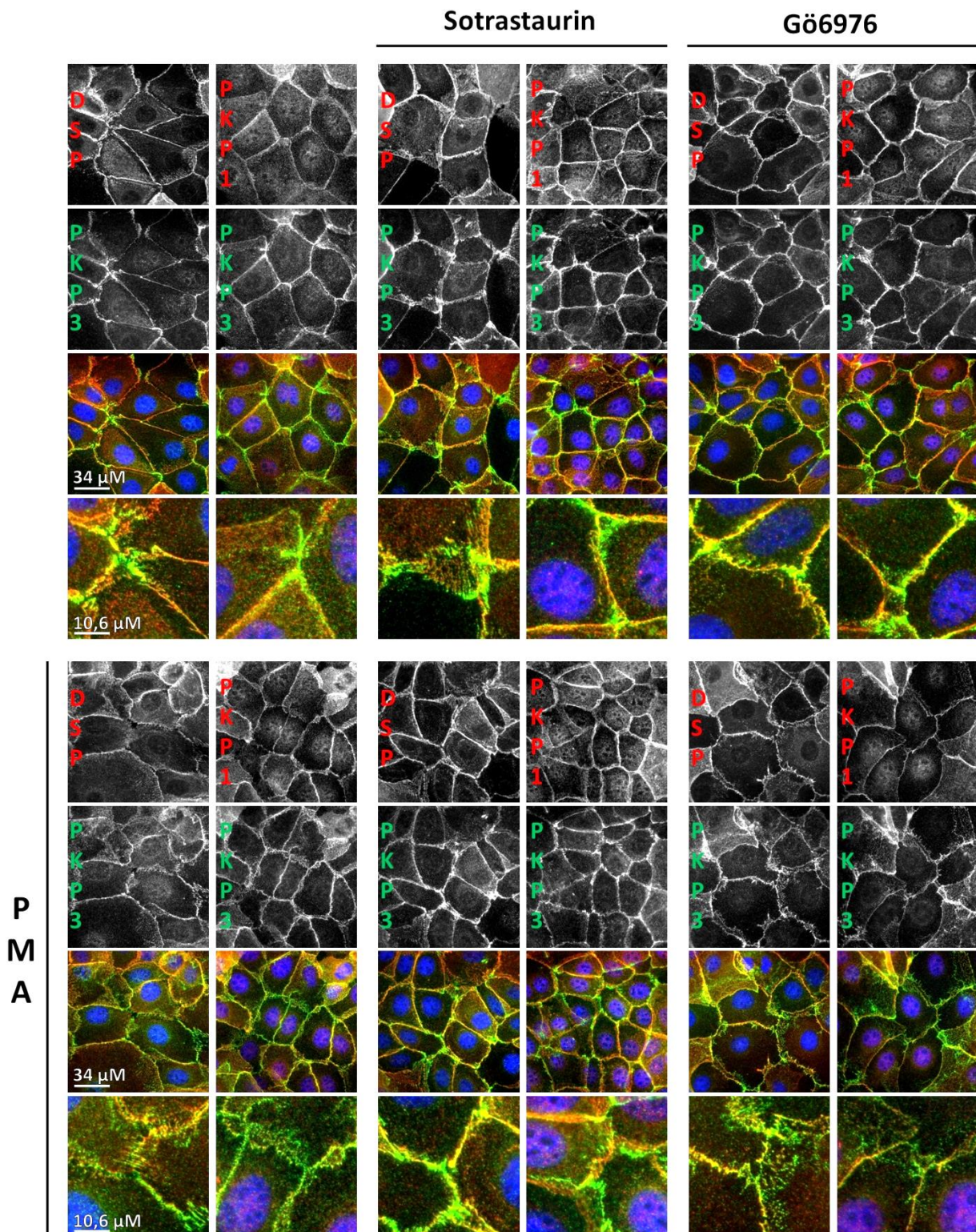


Abb. 20 Einfluss von PMA, Sotrastaurin und Gö6976 auf die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 2 h mit dem entsprechenden Inhibitor und je für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 105 min nach dem Inhibitor). Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP und PKP1 je rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 µm, der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 µm.

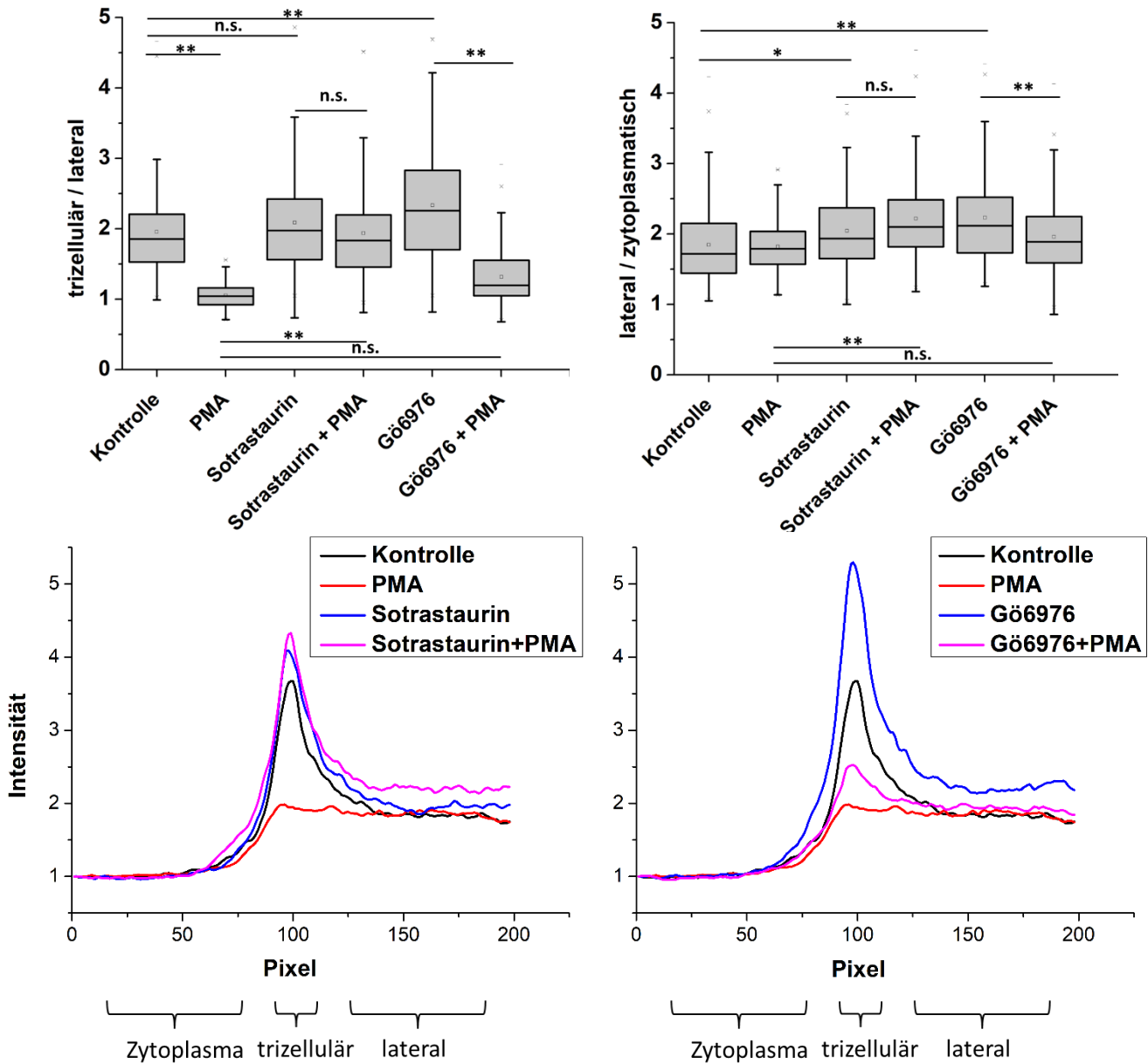


Abb. 21 Quantifizierung der PKP3 Lokalisation

Oben ist die Quantifizierung der trizellulären PKP3 Lokalisation im Vergleich zur lateralen und der lateralen im Vergleich zur zytoplasmatischen dargestellt. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. nicht signifikant und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* und anschließendem post hoc tukey HSD Test bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine 200 pxl lange Linie über den lateralen Bereich, durch den trizellulären bis ins Zytoplasma gelegt. Ausgewertet wurden für den lateralen Bereich Pixel 130-190 und für den trizellulären Pixel 96-103. Für den zytoplasmatischen Bereich wurden die Pixel 5-65 gewählt. Der Mittelwert aller Messungen ist unten grafisch für die jeweiligen Behandlungen dargestellt.

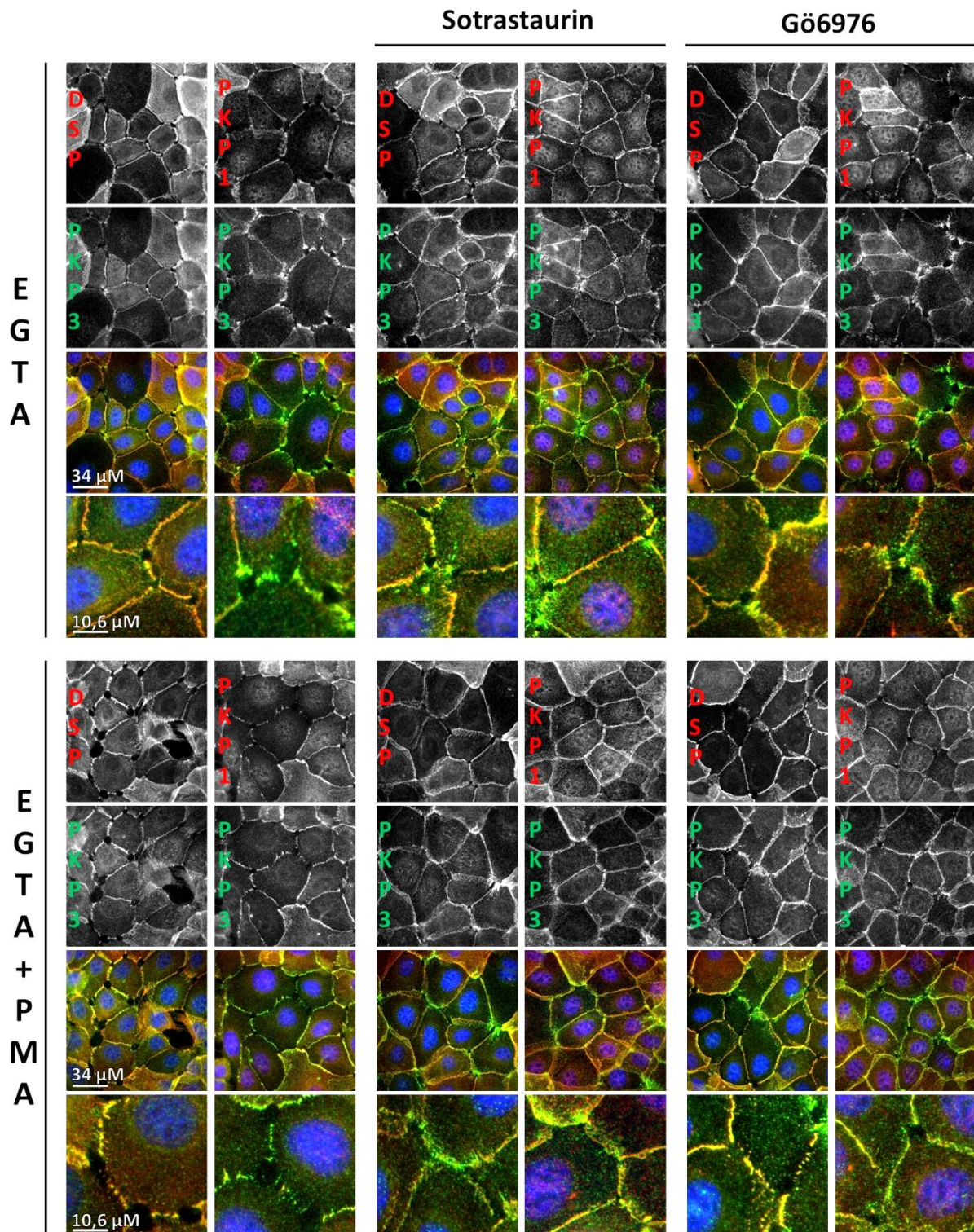


Abb. 22 Einfluss von PMA, Sotrastaurin und Gö6976 auf die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP in Abhängigkeit von EGTA

MKZ wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 2 h mit dem entsprechenden Inhibitor und 1 h mit EGTA behandelt und je für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach EGTA). Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP und PKP1 je rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μm , der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μm .

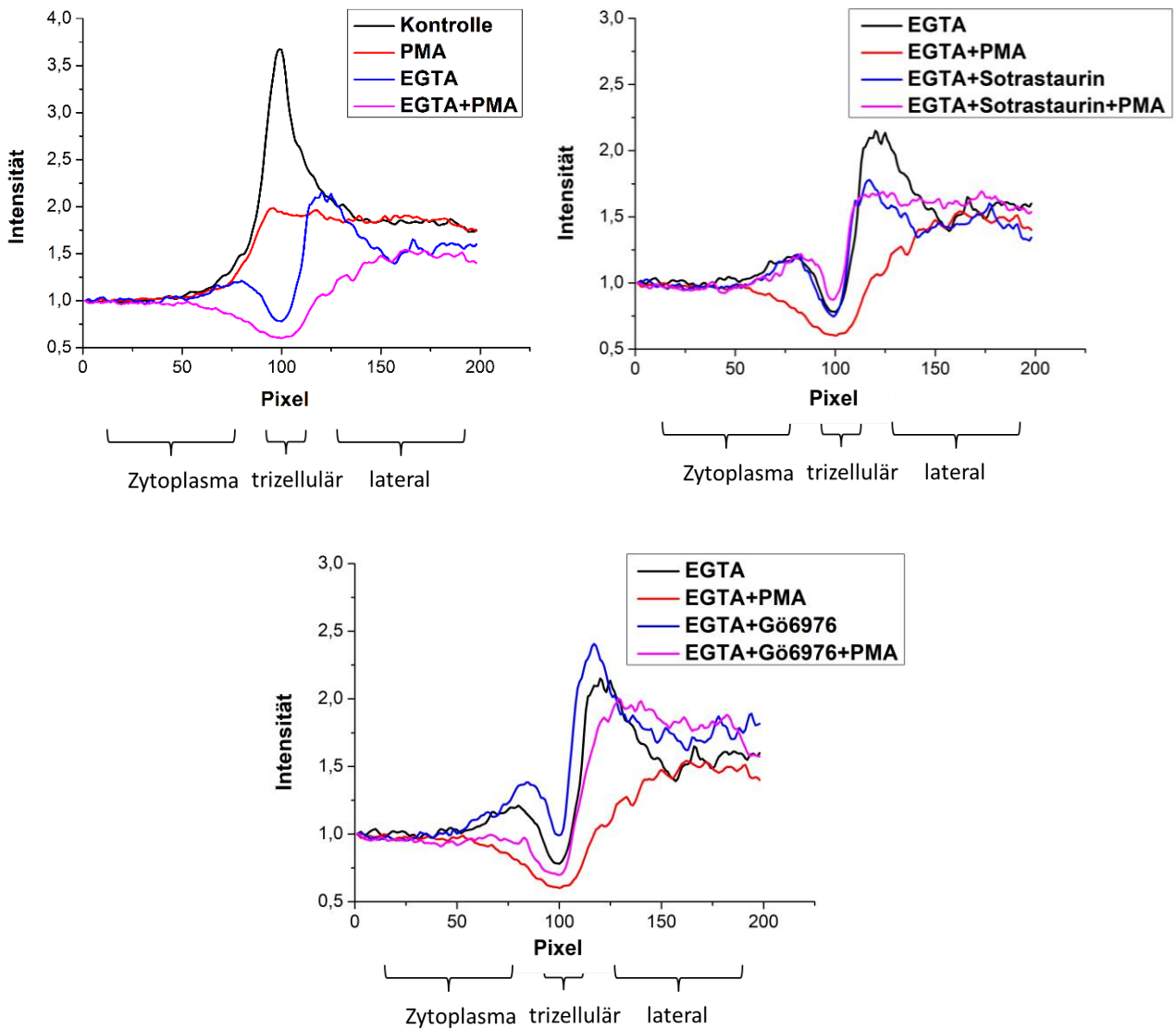


Abb. 23 Quantifizierung der PKP3 Lokalisation nach EGTA-Behandlung

Zur Quantifizierung wurde eine 200 pxl lange Linie über den lateralen Bereich, durch die trizelluläre Lücke bis ins Zytoplasma gelegt. Ausgewertet wurden für den lateralen Bereich Pixel 130-190 und für den trizellulären Pixel 96-103. Für den zytoplasmatischen Bereich wurden die Pixel 5-65 gewählt. Der Mittelwert aller Messungen ist grafisch für die jeweiligen Behandlungen dargestellt. Es wurden nur Zellkontakte ausgewertet, die eine Lücke im trizellulären Bereich aufwiesen.

3.3.5. Differenzierungsabhängigkeit des PMA-Effektes

Nach Kontakt mit Calcium beginnen Keratinozyten zunächst mit der Ausbildung von Ca^{2+} -abhängigen Zellkontakten (Desmosomen + Adhärensverbindungen). Sie erreichen letztendlich eine Ca^{2+} -unabhängige Form, die aufgrund ihrer gestärkten Adhäsionsfähigkeit, als Hyperadhäsion beschrieben wird. In Zellkultur dauert dies ca. sechs Tage. Während dieses Prozesses ändert sich auch die Lokalisation der desmosomalen Proteine. Um zu untersuchen, ob diese Entwicklung Einfluss auf die Phosphorylierbarkeit von DSP und PKP3 hat, wurde der PMA-Effekt und die Inhibierung der PKCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach Calciumzugabe untersucht (Abb. 24). Dabei stellte sich heraus, dass es zu keiner signifikanten Änderung in der Phosphorylierbarkeit innerhalb der ersten drei Tage kommt. Interessanterweise war aber der Effekt von Gö6976 in LCM nicht so dominant, wie in HCM. Generell scheint die Phosphorylierung von PKP3 und DSP (S177/178) auch in sich differenzierenden Zellen möglich zu sein.

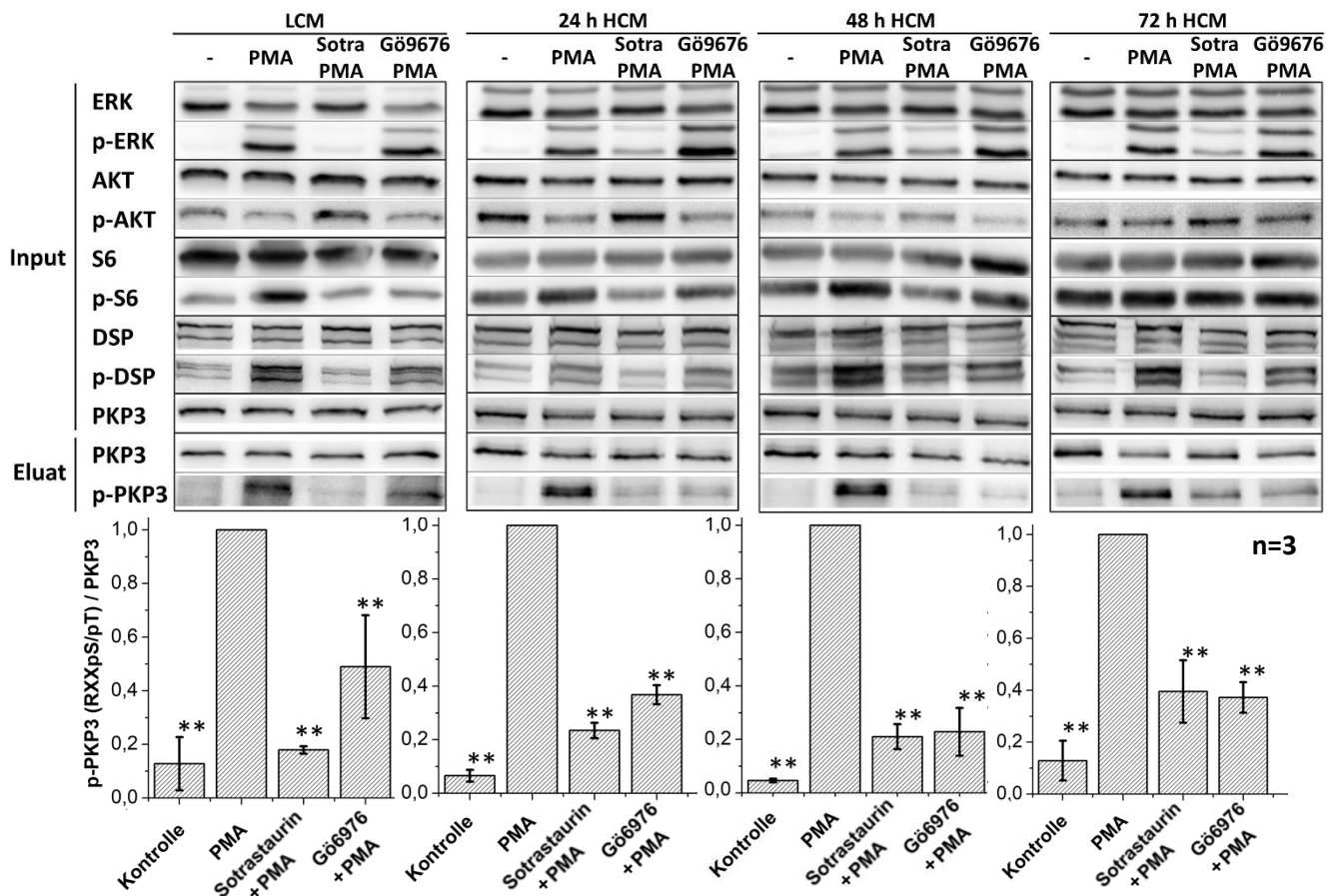


Abb. 24 Abhängigkeit der Phosphorylierung von der Differenzierung

MKZ wurden für die angegebene Zeit in HCM kultiviert. Danach wurden sie 1 h mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt und je für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach Inhibitor). Die Phosphorylierungssignale wurde mittels Western-Blot detektiert. Das Eluat (PKP3) wurde zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieses Proteins wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur PMA Behandlung und wurde über eine *One-way ANOVA* (*Analysis of Variance*) mit *post-hoc* Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test bestimmt.

3.3.6. Abhängigkeit der PKP3- und DSP-Phosphorylierung von anderen desmosomalen Proteinen

Die Zugänglichkeit der desmosomalen Proteine kann abhängig von ihrer Bindung zu anderen desmosomalen Partnern sein. Beispielsweise wird die PKC α -abhängige Phosphorylierung des DSP C-Terminus durch PKP2 vermittelt (Bass-Zubek et al., 2008). Um zu überprüfen, ob dies auch für die hier beobachteten Phosphorylierungen der Fall ist, wurde das PMA-abhängige Phosphorylierungsmuster von DSP und PKP3 in Wildtyp-, DSP KO-, PKP1 KO- (1KO) und PKP3 KO- (3KO) Linien untersucht.

Ohne PKP1 kommt es zu einer Verringerung der Adhäsion. Die Menge und Größe der Desmosomen ist geringer und Hyperadhäsion ist nicht möglich (South et al., 2003; Hatzfeld et

al., 2017; Keil et al., 2016). PKP3 kann den PKP1-Verlust nicht kompensieren (Abb. 25). Unter der Annahme, dass PKP3-Phosphorylierung destabilisierend auf das Desmosom wirkt, könnte man erwarten, dass PKP3 geringer phosphoryliert wird, um den PKP1-Verlust zu kompensieren. Jedoch war dies nicht der Fall. Weder die PKP3-, noch die Phosphorylierung der anderen Proteine zeigte eine veränderte Reaktion auf die PMA-Stimulation. Interessanterweise war G66976 im 1KO nicht in der Lage, die PMA-abhängige DSP-Phosphorylierung zu reduzieren. Ansonsten waren aber sowohl der Effekt von G66976, als auch der von Sotrastaurin identisch zu dem im Wildtyp.

3KOs zeigen generell eine stärkere Adhäsion als der Wildtyp (Keil et al., 2016; Neuber et al., 2010). Der Verlust von PKP3 kann durch PKP1 in Hinsicht auf stabile Adhäsion ausgeglichen werden (Abb.26). Da die Stärke der Desmosomen auch von der DSP-Phosphorylierung beeinflusst wird, wurde diese in den 3KOs untersucht. Vergleichbar zu den Effekten in der 1KO-Linie war die Phosphorylierung in den 3KOs nicht verändert zum Wildtyp. Jedoch zeigte auch hier G66976 keinen Effekt auf die Modifizierung von DSP (S177/178).

Der Verlust von DSP verhindert die Ausbildung von funktionellen Desmosomen, da die Verbindung zu den Intermediärfilamenten nicht mehr möglich ist. Die Adhäsion ist somit stark reduziert (Gallicano et al., 1998). Phosphorylierungen, die nur in ausgebildeten Desmosomen bzw. nur nach Bindung zu DSP erfolgen, sind entsprechend nicht mehr möglich (Abb. 27). Die Phosphorylierung von PKP3 nach PMA-Stimulation in einem RXXS/T-Motiv war aber unabhängig von DSP weiterhin genauso möglich wie im Wildtyp. Auch die Effekte der Inhibitoren führten nicht zu signifikant veränderten Signalen.

Sowohl in den PKP1-, als auch den PKP3-KO Linien zeigte G66976 keinen Effekt mehr auf die PMA-abhängige Phosphorylierung von DSP (S177/178). Somit besteht die Möglichkeit, dass diese Site PKC α -abhängig in Anwesenheit beider Plakophiline phosphoryliert wird, bzw. PKPs dies begünstigen. Jedoch weist der deutlich stärkere Effekt von Sotrastaurin und der, auch in Abwesenheit der PKPs, noch starke Effekt von PMA auf die Beteiligung weiterer PKC-Isoformen hin, welche die Phosphorylierung dieser Site ermöglichen und somit den Einfluss von PKC α kompensieren. Des Weiteren ist anhand dieser Ergebnisse davon auszugehen, dass die PMA-abhängige Phosphorylierbarkeit von DSP (S177/178) und PKP3 im RXXS/T-Motiv generell unabhängig zur Interaktion mit anderen desmosomalen Proteinen möglich ist.

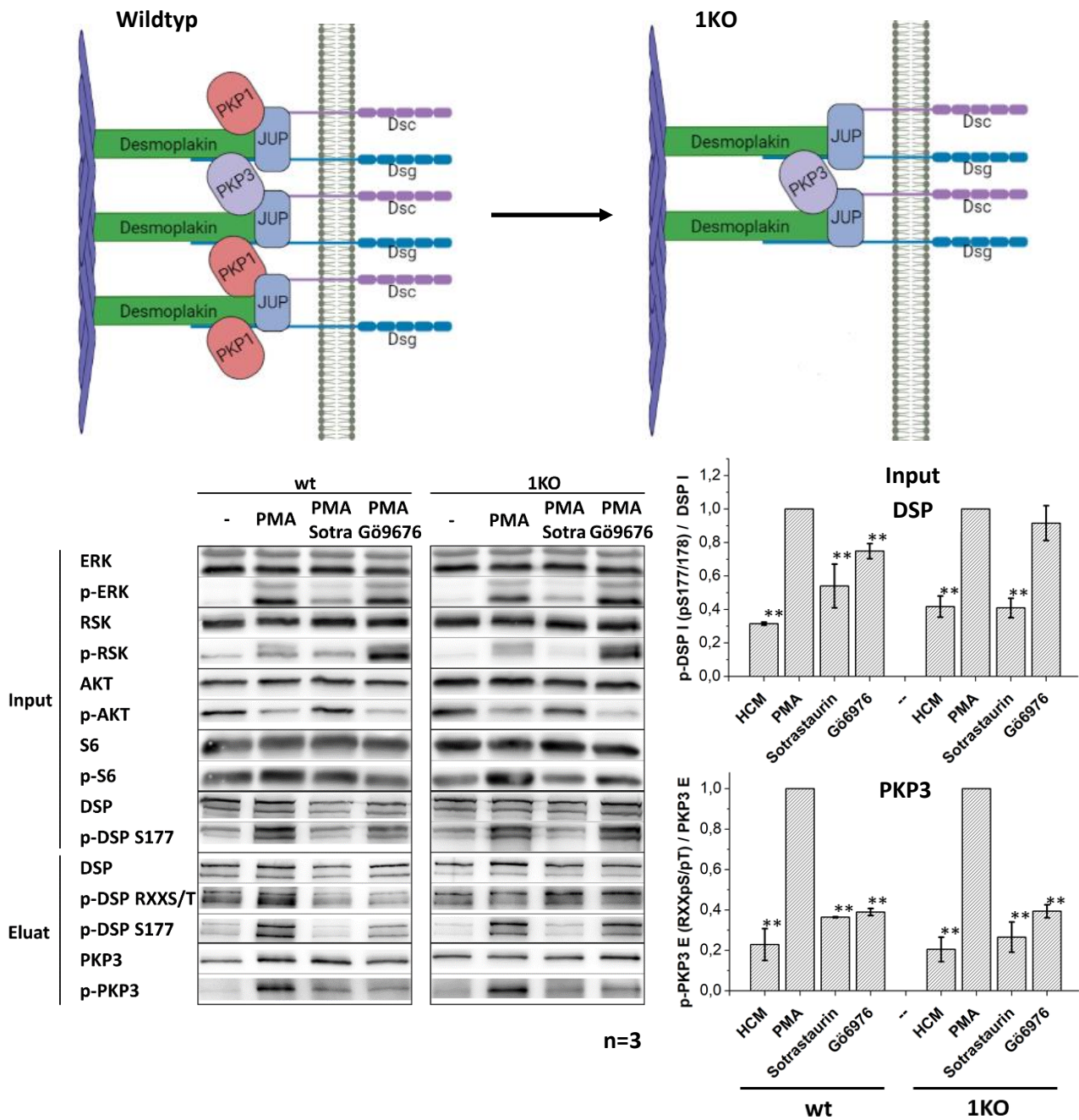


Abb. 25 Effekt von PMA, Sotrastaurin und Gö6976 in Wildtyp- und PKP1-KO-Mauskeratinozyten

Oben ist schematisch der Aufbau des Desmosoms im Wildtyp im Vergleich zum PKP1 KO gezeigt. JUP steht für Plakoglobin, Dsg für Desmoglein und Dsc für Desmocollin. Das Schema wurde mit Biorender.com (2021) erstellt. Darunter ist die Western-Blot Behandlung mit den dazugehörigen Quantifizierungen dargestellt. Sotrastaurin wurde mit Sotra abgekürzt. Die Zelllinien wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 1 h mit dem entsprechenden Inhibitor inkubiert und jeweils für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach Inhibitor). Das Phosphorylungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Als Eluat gekennzeichnete Proteine wurde zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieser Proteine wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur PMA-Behandlung und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* bestimmt.

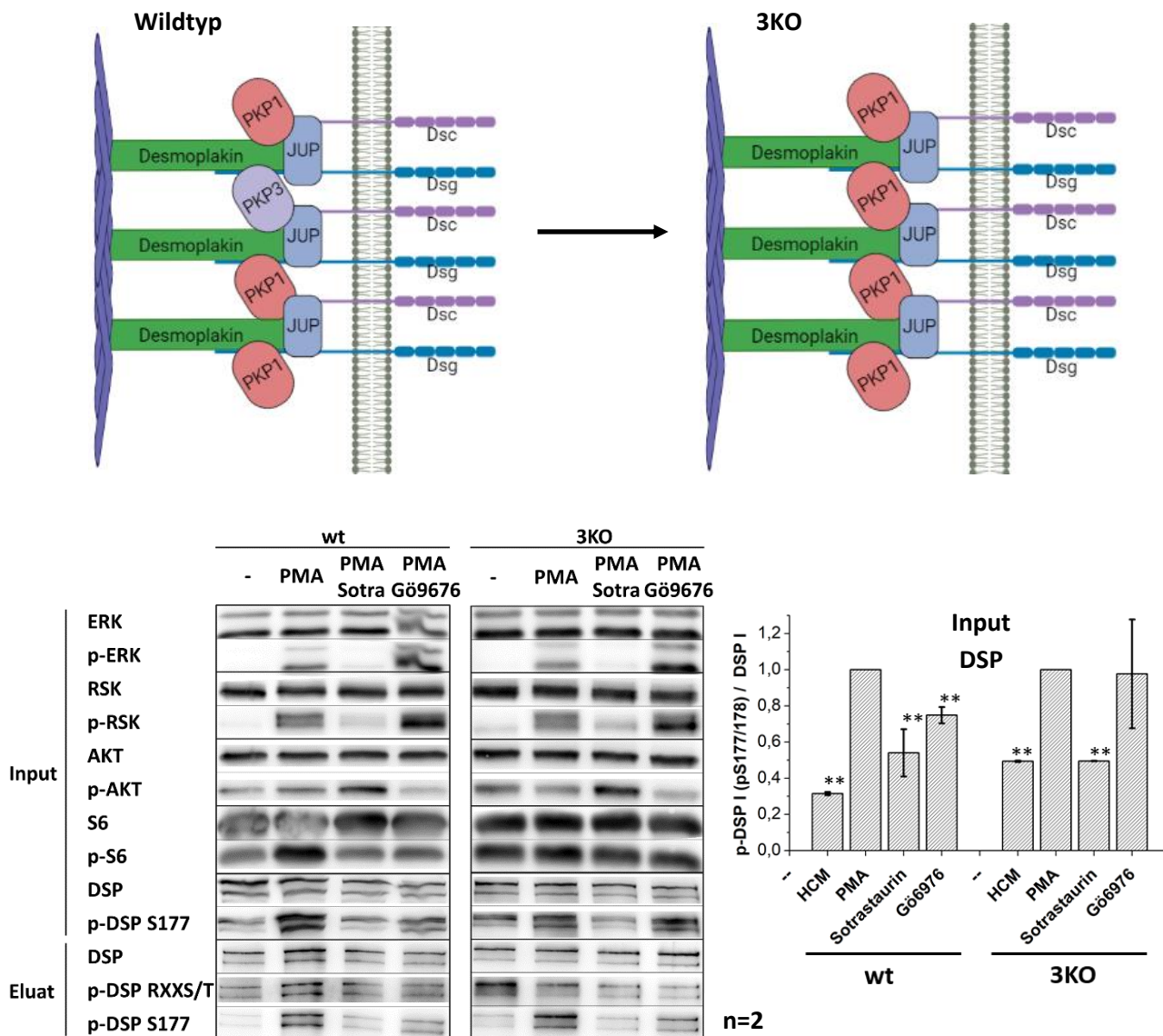


Abb. 26 Effekt von PMA, Sotrastaurin und Gö6976 in Wildtyp- und PKP3-KO-Mauskeratinozyten

Oben ist schematisch der Aufbau des Desmosoms im Wildtyp im Vergleich zum PKP3 KO gezeigt. JUP steht für Plakoglobin, Dsg für Desmoglein und Dsc für Desmocollin. Das Schema wurde mit Biorender.com (2021) erstellt. Darunter ist die Western-Blot Behandlung mit der dazugehörigen Quantifizierung dargestellt. Sotrastaurin wurde mit Sotra abgekürzt. Die Zelllinien wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 1 h mit dem entsprechenden Inhibitor inkubiert und jeweils für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach Inhibitor). Das Phosphorylungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Als Eluat gekennzeichnete Proteine wurde zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieser Proteine wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur PMA-Behandlung und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* bestimmt.

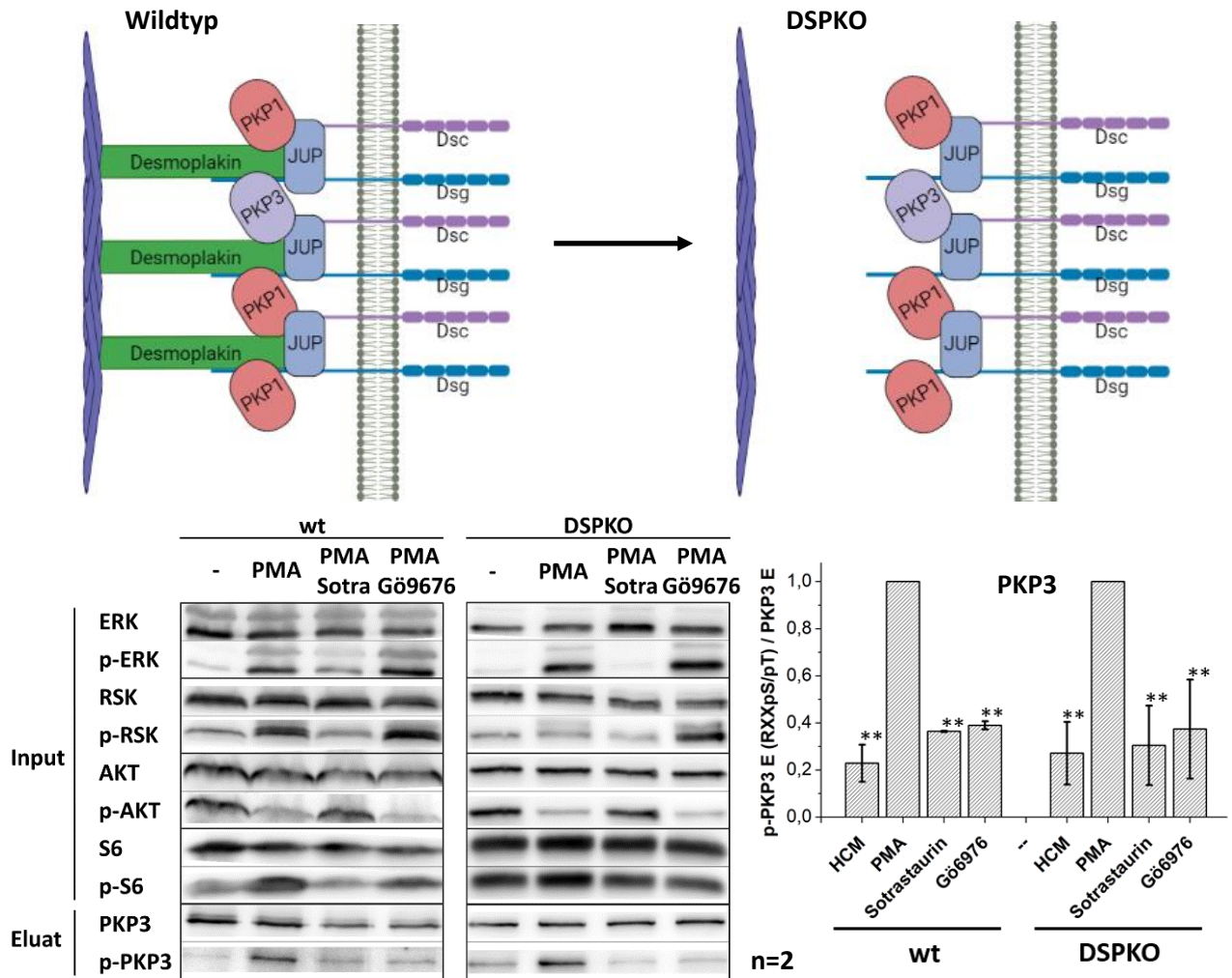


Abb. 27 Effekt von PMA, Sotrastaurin und Gö6976 in Wildtyp- und DSP-KO-Mauskeratinozyten

Oben ist schematisch der Aufbau des Desmosoms im Wildtyp im Vergleich zum DSP KO gezeigt. JUP steht für Plakoglobin, Dsg für Desmoglein und Dsc für Desmocollin. Das Schema wurde mit Biorender.com (2021) erstellt. Darunter ist die Western-Blot Behandlung mit der dazugehörigen Quantifizierung dargestellt. Sotrastaurin wurde mit Sotra abgekürzt. Die Zelllinien wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie 1 h mit dem entsprechenden Inhibitor inkubiert und jeweils für 15 Minuten mit PMA stimuliert (Zugabe 45 min nach Inhibitor). Das Phosphorylierungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Als Eluat gekennzeichnete Proteine wurde zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieser Proteine wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur PMA-Behandlung und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* bestimmt.

3.3.7. *Knockdown* der PKC-Isoformen Alpha, Delta und Eta

Die in Abschnitt 3.3.3. und 3.3.4. gezeigten Experimente mit Inhibitoren gaben Hinweise darauf, dass auch die *novel* PKCs bedeutend für desmosomale Phosphorylierung sein können. Für die klassische PKC α waren die Ergebnisse aber nicht eindeutig und da ATP-kompetitive Inhibitoren, wie Gö6976 und Sotrasaturin auch andere ATP-abhängige Enzyme inhibieren können, ist es notwendig, diese Ergebnisse mit anderen Methoden zu überprüfen. Um den Effekt der einzelnen PKC-Isoformen auf PKP3 und DSP genauer bestimmen zu können, wurden nun die drei abundanten Isoformen Alpha, Delta und Eta einem *Knockdown* unterzogen und die entsprechenden Zellen 48 bzw. 72 Stunden später mit PMA behandelt. Hierbei wurde zusätzlich wieder der Effekt auf die Proteine MEK, ERK; RSK, Akt, S6 und GSK3 β beobachtet. Der *Knockdown* der PKC-Isoformen führte nach 48 h zu einer Reduktion des jeweiligen Proteinlevels um 53 % für PKC α ; 96 % für PKC δ und 93 % für PKC η , sowie zu einer Reduktion nach 72 h um 70 % für PKC α , 95 % für PKC δ und 91 % für PKC η . Jedoch führte der *Knockdown* der PKC α nach 72 h ebenfalls zu einer leichten Reduktion von PKC δ und der *Knockdown* von PKC δ zu einer deutlichen Reduktion von PKC η (Abb. 28). Der *Knockdown* von PKC α hatte kaum Effekte auf die Phosphorylierungen der untersuchten Proteine. Nach 72 h ließ sich zwar ein leichter Rückgang der PKP3 Phosphorylierung beobachten, jedoch war zu diesem Zeitpunkt auch die Menge an PKC δ verringert. Dies steht deutlich im Widerspruch zu dem Effekt durch den PKC α -Inhibitor Gö6976 und spricht für eine PKC α -unabhängige PKP3-Phosphorylierung. Jedoch war trotz *Knockdown* noch eine gewisse Menge an PKC α vorhanden, sodass Restaktivität nicht ausgeschlossen werden kann. Die Abwesenheit von PKC δ hingegen hatte signifikanten Einfluss auf den PMA-Effekt. So kam es unter diesen Bedingungen nicht mehr zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges, außerdem wurde auch die Phosphorylierung von PKP3 deutlich reduziert. Der Effekt im Western-Blot ähnelte deutlich der Wirkung von Sotrastaurin. Jedoch kam es trotz der Wirkung auf den MAPK-Weg zu keiner Reaktivierung von Akt. Der *Knockdown* von PKC η zeigte vergleichbar zu PKC α kaum Effekte, wobei auch hier nach 72 h eine leichte Reduktion der phosphorylierten PKP3-Menge beobachtet werden konnte. Die Phosphorylierung von DSP (S177/178) wurde durch keinen der hier untersuchten *Knockdowns* reduziert (Abb.29 & 30). Es besteht die Möglichkeit der Beteiligung einer weiteren PKC-Isoform oder, wie in 3.3.6. beschrieben, dass diese *Site* abhängig von mehreren PKCs phosphorylierbar ist und somit der Verlust einer einzelnen Isoform kompensiert wird.

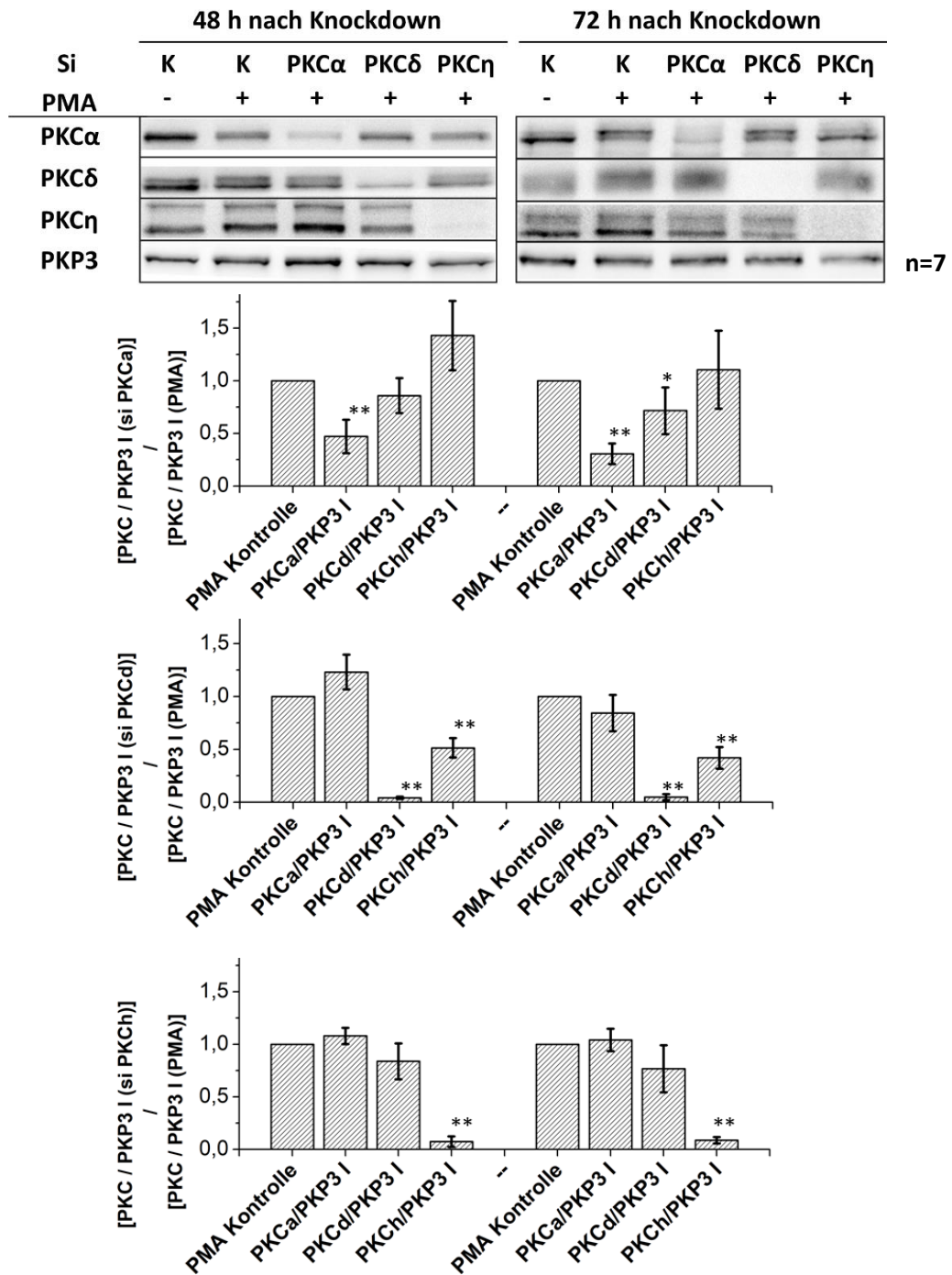


Abb. 28 Knockdown-Kontrollen der PKC Isoformen Alpha, Delta und Eta

MKZ wurden 48 bzw. 72 h nach dem siRNA-medierten *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie je für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Die Effizienz des *Knockdowns* wurde bestimmt als die Differenz des jeweiligen PKC-Signals und des PKP3 Input-Signals, bezogen auf die PMA-Kontrolle. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

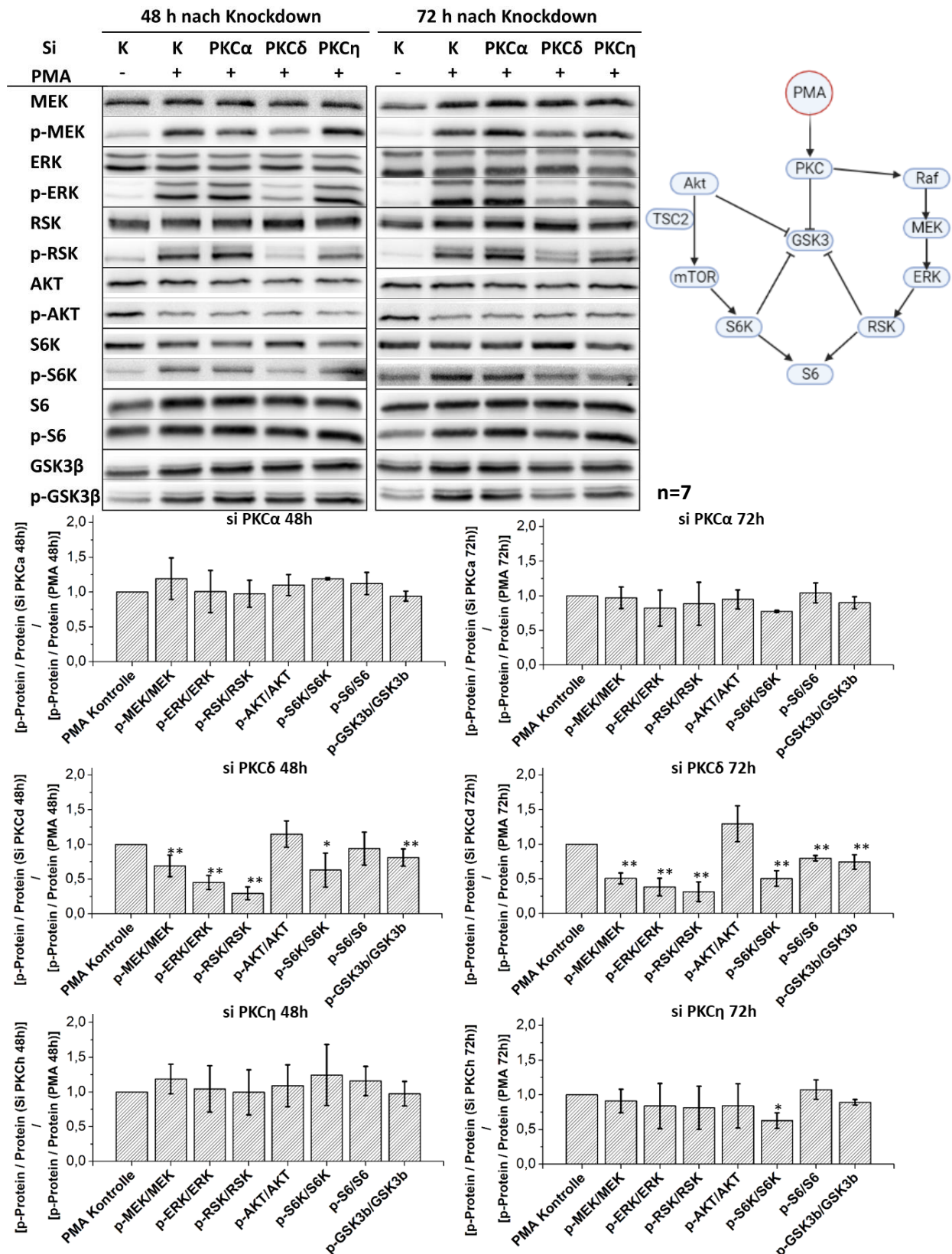


Abb. 29 Knockdown der PKC Isoformen Alpha, Delta und Eta

MKZ wurden 48 bzw. 72 h nach dem siRNA-medierten *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie je für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Das Phosphorylierungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur jeweiligen PMA Kontrolle und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-HSD-Test* bestimmt.

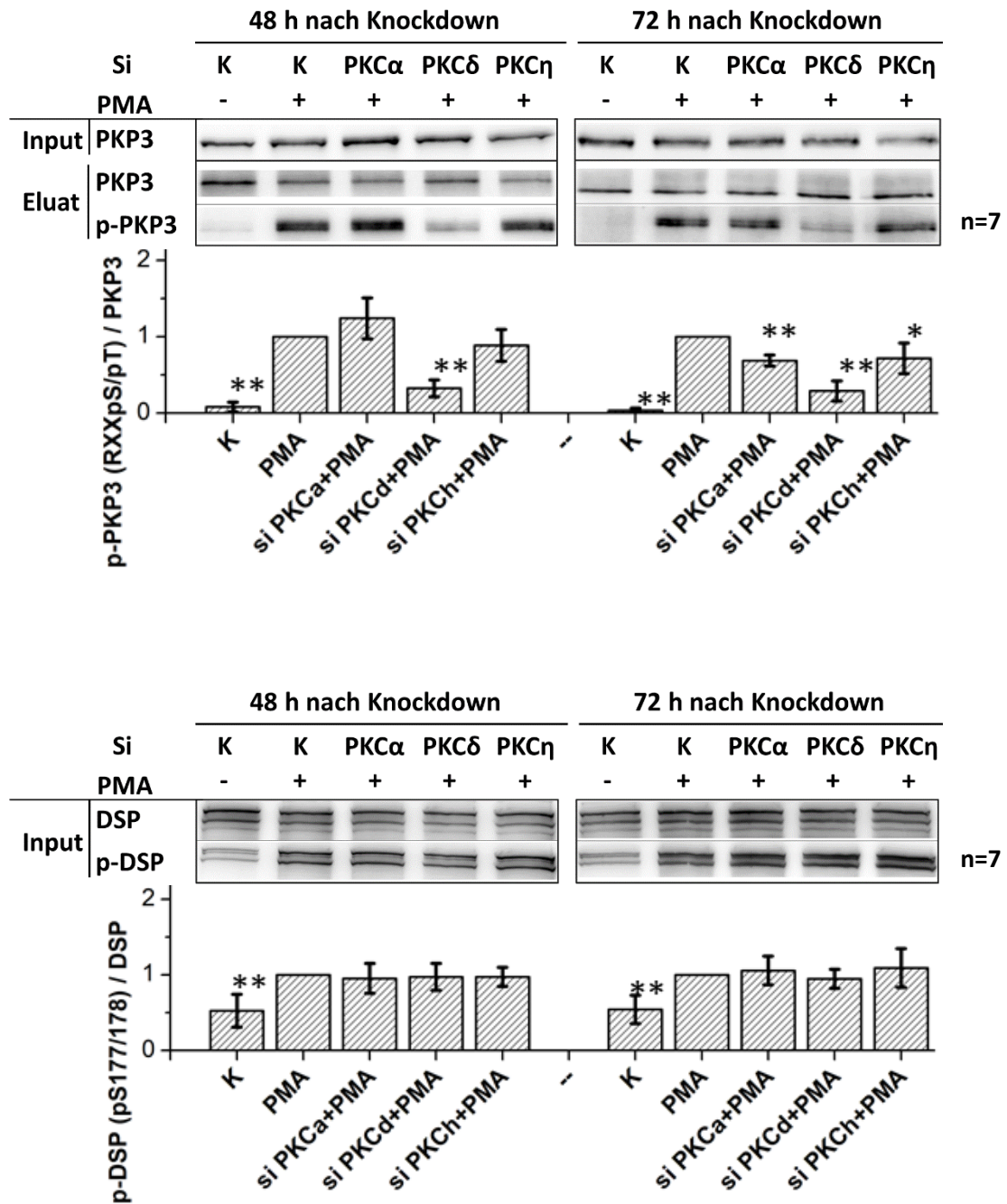


Abb. 30 PKP3 (RXXS/T) und DSP (S177/178) Phosphorylierung nach *Knockdown* der PKC Isoformen Alpha, Delta und Eta

MKZ wurden 48 bzw. 72 h nach dem siRNA-medierten *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie je für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Das Phosphorylungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Das PKP3-Eluat wurde zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieses Proteins wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur jeweiligen PMA Kontrolle und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

Makroskopisch kam es durch den *Knockdown* der PKC δ -Isoform zu einem veränderten Phänotyp. Der Zellrasen wies diverse, mit bloßem Auge sichtbare zellfreie Bereiche auf, ohne dass die Proteinmenge im Western-Blot reduziert war (Anhang Abb. A2). Bei den anderen Isoformen, sowie der Kontrolle, trat dieser Effekt nicht auf.

In den Immunfluoreszenzbildern ließ sich erkennen, dass die PKP3- und DSP-Lokalisation durch den *Knockdown* der PKC-Isoformen α , δ und η nicht wesentlich verändert wirkte (Abb.31, für größere Darstellung siehe Anhang Abb. A3-A5). Aktivierung der jeweils verbliebenen PKC-Isoformen durch PMA zeigte auch nach Depletion der Isoformen Alpha und Eta vergleichbare Effekte, wie in der Kontrolle ohne *Knockdown*. Bei dem *Knockdown* der Delta-Isoform kam es jedoch zu einer deutlichen Reduktion der PMA-Wirkung (Abb.32). So blieben die Zellgrenzen klarer definiert und die Zellen wuchsen weniger übereinander. Jedoch handelte es sich nicht um einen kompletten *Rescue*. So kam es dennoch zu einer leichten Reduktion von PKP3 an den trizellulären Bereichen und zu fransigeren, nicht gradlinigen Zellgrenzen. Entsprechend erzielte der *Knockdown* der Delta-Isoform alleine nicht dieselbe Wirkung, wie die Inhibierung mittels Sotrastaurin, erweckte aber dennoch den Eindruck, stabilisierend auf das Desmosom zu wirken.

Diese Experimente zeigen deutlich, dass PKC δ eine Rolle bei der Regulation der Desmosomen spielt und dass PKP3 ein wichtiges *Target* dieser Kinase ist.

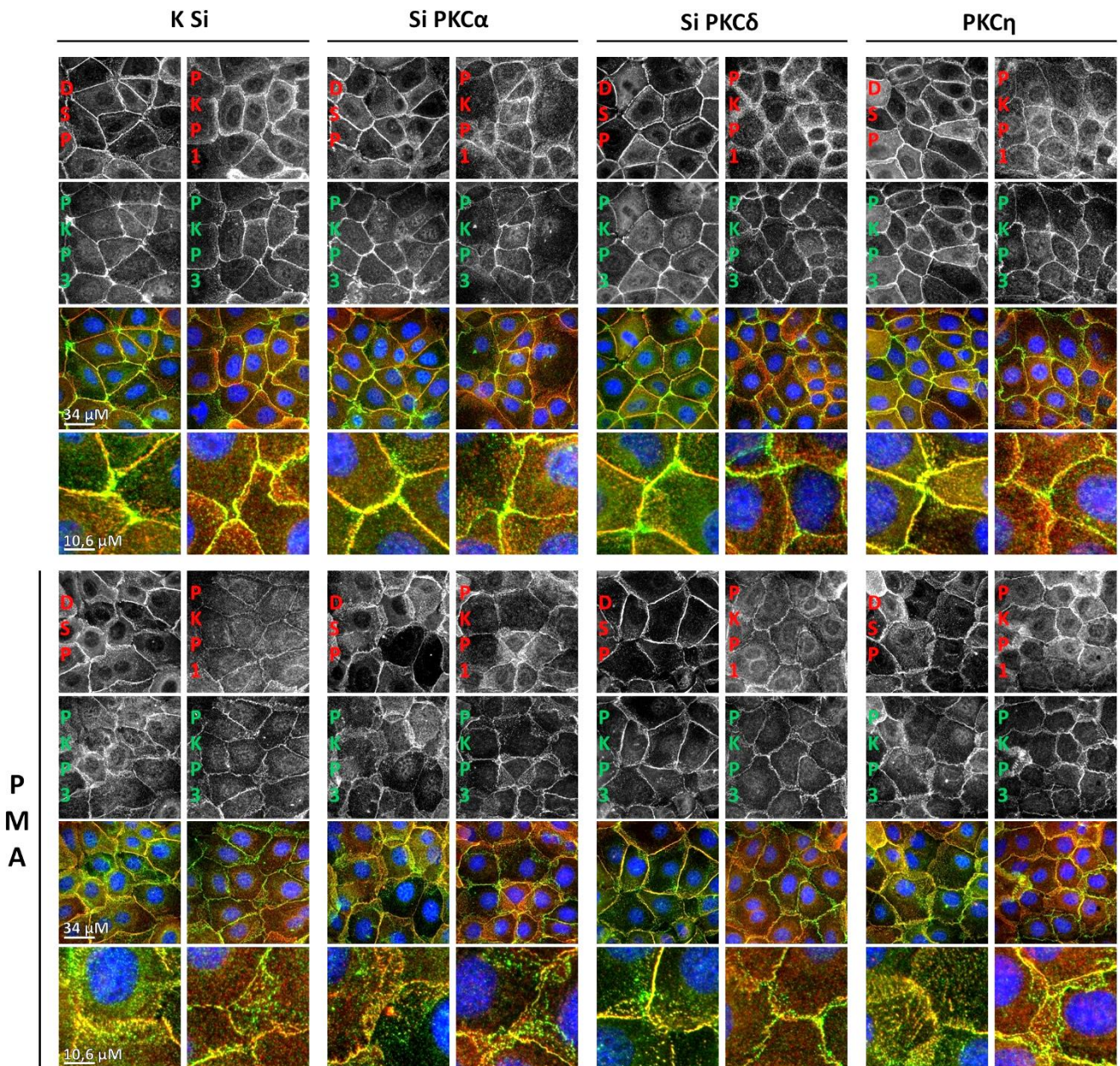


Abb. 31 Einfluss des *Knockdowns* der PKCs auf die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP

MKZ wurden 48 h nach dem siRNA-medierte*n* *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24 h in HCM kultiviert und für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP und PKP1 je rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μm , der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μm

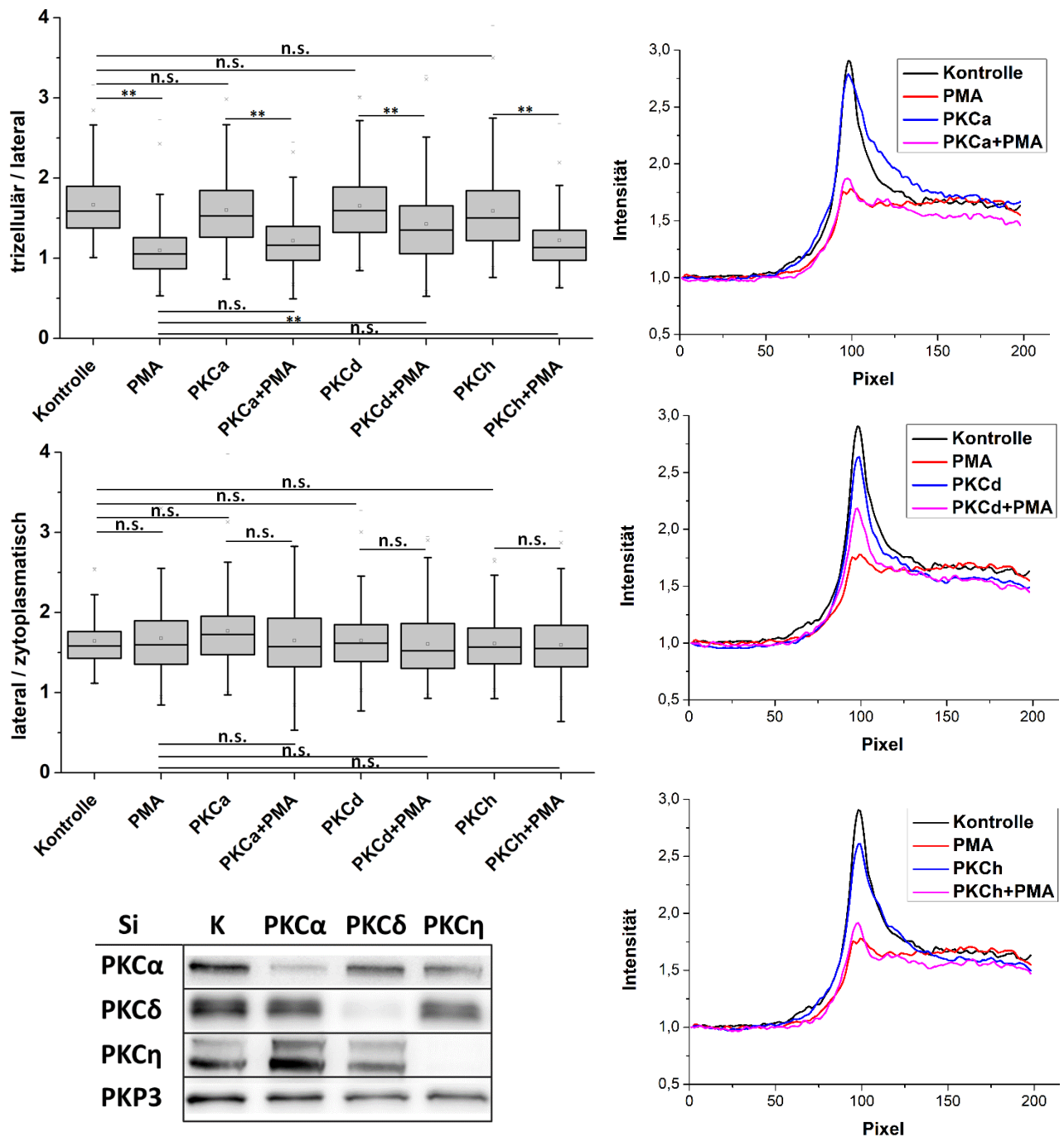


Abb. 32 Quantifizierung und *Knockdown*-Kontrolle der Immunfluoreszenz

Links oben ist die Quantifizierung der trizellulären PKP3-Lokalisation im Vergleich zur lateralen und der lateralen im Vergleich zur zytoplasmatischen dargestellt. Die Signifikanz wird angegeben mit ** $p < 0,01$; n.s. nicht signifikant und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* und anschließendem post hoc tukey HSD Test bestimmt. Links unten ist die Western-Blot Kontrolle für die PKC-*Knockdowns* der Immunfluoreszenz gezeigt. MKZ wurden 48 h nach dem siRNA mediierten *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24h in HCM kultiviert. Zur Quantifizierung wurde eine 200 pxl lange Linie über den lateralen Bereich, durch den trizellulären bis ins Zytoplasma gelegt. Ausgewertet wurden für den lateralen Bereich Pixel 130-190 und für den trizellulären Pixel 96-103. Für den zytoplasmatischen Bereich wurden die Pixel 5-65 gewählt. Der Mittelwert aller Messungen ist rechts grafisch für die jeweiligen Behandlungen dargestellt.

Als Nächstes wurde überprüft, ob der *Knockdown* der PKCs Einfluss auf den EGTA-medierten Verlust der Zellkontakte durch Calciumentzug hat (Abb.33). Aber, wie auch nach Inhibierung mittels Sotrastaurin beobachtet (3.3.4.), schützte der *Knockdown* der PKC-Isoformen nicht vor dem Effekt von EGTA. Auch hier kam es durch den *Knockdown* der PKC α nicht zu demselben Effekt, wie durch die Inhibierung durch Gö6976.

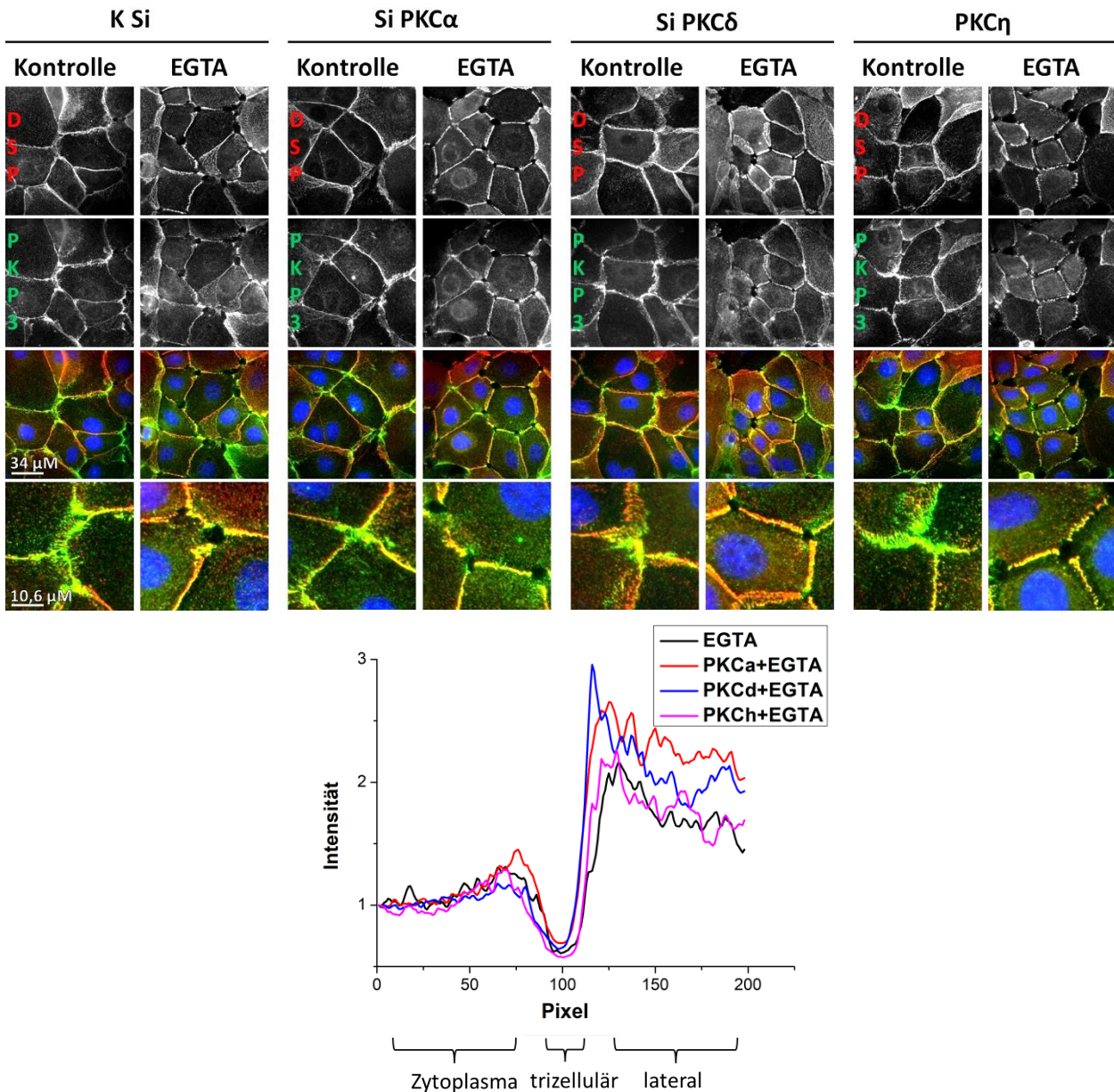


Abb. 33 Einfluss des PKC-Knockdowns auf die Wirkung von EGTA

MKZ wurden 48 h nach dem siRNA-medierten *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24 h in HCM kultiviert und für 120 min mit EGTA behandelt. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μm , der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μm . Zur Quantifizierung wurde eine 200 pxl lange Linie über den lateralen Bereich, durch den trizellulären „Lochbereich“ bis ins Zytoplasma gelegt. Der Mittelwert aller Messungen ist unten grafisch für die jeweiligen Behandlungen dargestellt.

3.3.7.1. *Doppelknockdown PKC α und PKC δ*

Der *Knockdown* von PKC δ verhinderte zwar die PKP3-Phosphorylierung, aber dennoch gab es einige Unterschiede zur Inhibierung mit Sotrastaurin. Da zudem der PKC α -*Knockdown* zumindest leichte Effekte auf die PKP3-Phosphorylierung zeigte, wurde ein *Doppelknockdown* von PKC α und PKC δ durchgeführt (Abb.34).

Auf Western-Blot-Ebene zeigte der *Doppelknockdown* von PKC α und PKC δ dieselben Auswirkungen auf MEK-, ERK- und RSK-Phosphorylierung, wie der alleinige *Knockdown* von PKC δ . Auch die Phosphorylierung von PKP3 an RXXS/T-Motiven war gleichermaßen reduziert. Effekte auf DSP (S177/178) bleiben aus.

In der Immunfluoreszenzfärbung schwächt der *Doppelknockdown* ebenfalls, wie im Falle von PKC δ , den PMA-Effekt ab. Jedoch waren die Zellkontakte diffuser. Nichtsdestotrotz lokalisiert PKP3 auch in Anwesenheit von PMA deutlich an den trizellulären Kontakten. Diese Resistenz gegen die PMA-induzierte Umverteilung von PKP3 war im *Doppelknockdown* stärker, als im einfachen PKC δ -*Knockdown* und erreichte in etwa das Niveau des unbehandelten Wildtyps. Dies spricht dafür, dass, obwohl PKC δ den stärkeren Effekt auf PKP3 zu haben scheint, auch PKC α eine Bedeutung für dessen Regulation hat. Eine PKC α -abhängige Phosphorylierung in einem Motiv, welches nicht dem RXXS/T-Motiv entspricht, wäre anhand dieser Daten denkbar.

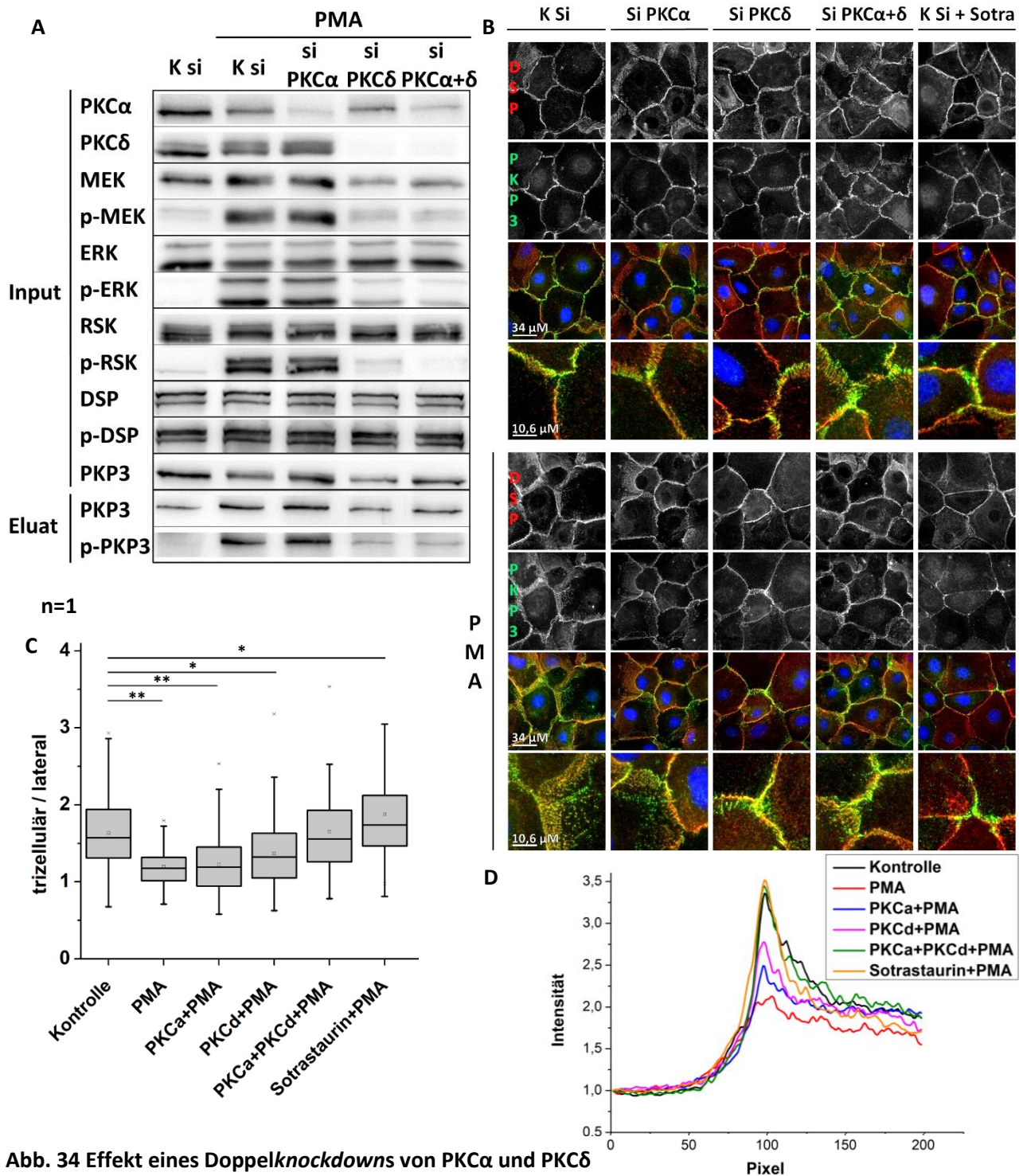


Abb. 34 Effekt eines Doppelknockdowns von PKC α und PKC δ

MKZ wurden 48 h nach dem siRNA-medierten *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24 h in HCM kultiviert und für 15 Minuten mit PMA stimuliert. In A ist das Phosphorylierungssignal in Abhängigkeit des *Knockdowns* dargestellt. (B) Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μ m, der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μ m. Unten, links (C) ist die Quantifizierung der trizellulären PKP3 Lokalisation im Vergleich zur lateralen gezeigt. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$. Sie wurde über eine *One-way ANOVA* und anschließendem *post hoc tukey HSD-Test* bestimmt. (D) Zur Quantifizierung der PKP3-Intensität wurde eine 200 pxl lange Linie über den lateralen Bereich, durch den trizellulären bis ins Zytoplasma gelegt. Ausgewertet wurden lateralen Pixel 130-190 (lateral), Pixel 96-103 (trizellulär) und Pixel 5-65 (Zytoplasma). Der Mittelwert aller Messungen ist grafisch dargestellt.

3.3.7.2. Knockdown RSK im Vergleich zu PKCδ

Da es durch den *Knockdown* von PKCδ zu einer Inaktivierung des MEK/ERK/RSK-Signalweges kam, besteht die Möglichkeit, dass die PMA-abhängige Regulation von PKP3 direkt abhängig vom MAP-Kinase-Signalweg ist. Wie von Müller *et al.* 2020 beschrieben, besteht die Möglichkeit, dass RSK1/2 dabei eine bedeutende Rolle spielen. Um dies zu überprüfen, wurde der *Knockdown* von PKCδ mit dem *Knockdown* von RSK 1/2 verglichen (Abb.35). Hierbei war auffällig, dass die Abwesenheit von PKCδ das p-RSK Signal noch stärker reduzierte, als der *Knockdown* der RSKs selbst. Des Weiteren hatte die Reduktion von RSK aber keinen Effekt auf die Phosphorylierung von PKP3 unter PMA-Stimulation. Trotz des Effektes des RSK-Inhibitors BI-D1870 auf DSP, zeigte sich durch *Knockdown* hier keine Veränderung. Entsprechend liegt es nahe, dass die Regulation von DSP und PKP3 unter PMA-Stimulation nicht über RSK kontrolliert wird.

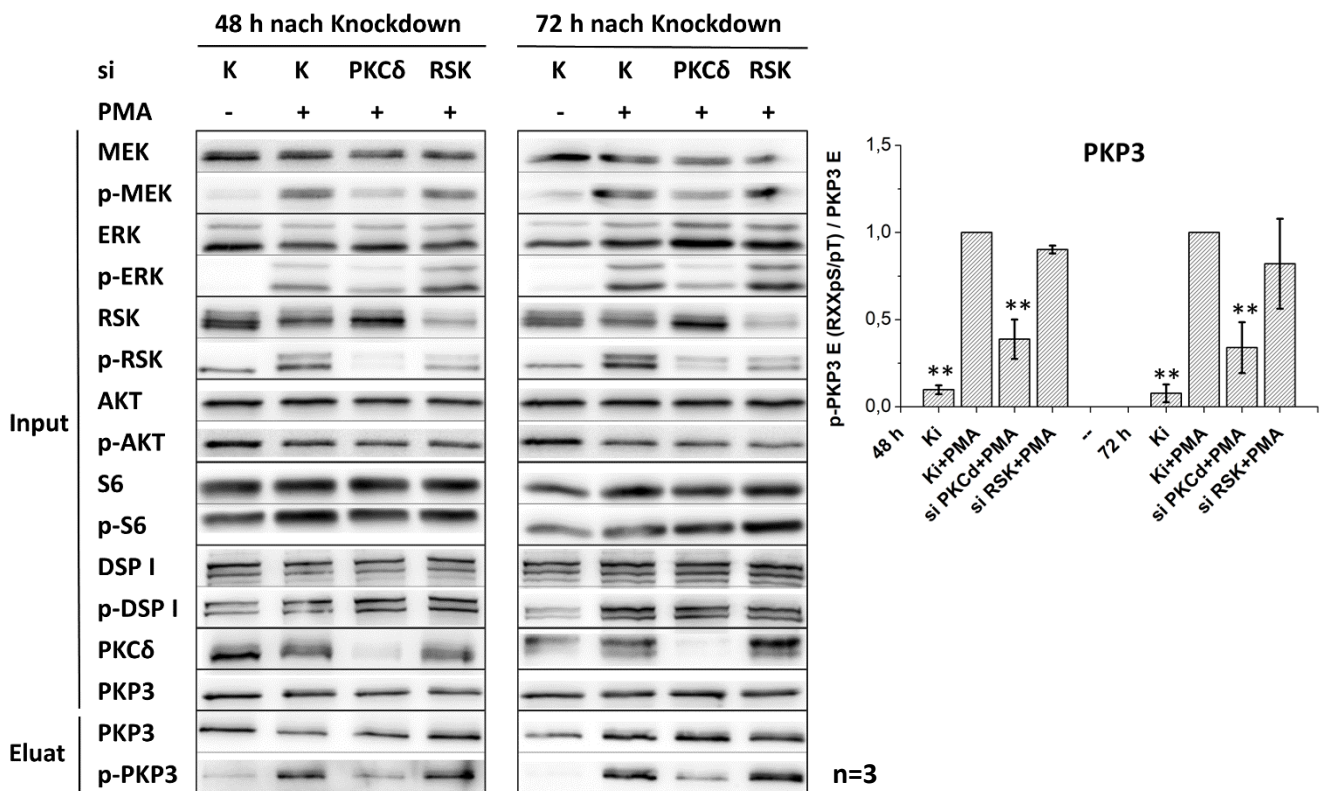


Abb. 35 Knockdown PKCδ im Vergleich zu RSK1/2

MKZ wurden 48 bzw. 72 h nach dem siRNA-medierten *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie je für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Das Phosphorylungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. PKP3 Eluat wurde zuvor mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieses Proteins wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur PMA Behandlung und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

3.4. Identifizierung möglicher PKP3-Phosphorylierungsstellen

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass die PMA-abhängige Phosphorylierung von PKP3 hauptsächlich über PKC δ reguliert wird, jedoch ist es unklar, an welcher/welchen Position/en die Modifizierung/en stattfinden. Es existieren 18 (RXXS/T) Motive in Maus-PKP3, die theoretisch phosphoryliert und von dem hier verwendeten Substrat-Antikörper erkannt werden könnten. 16 dieser Motive sind auch in humanem PKP3 konserviert (Anhang Abb. A6). Zur Identifizierung der tatsächlich relevanten *Sites* wurden Peptid *Arrays* durchgeführt, PKP3-Alanin-Punktmutanten generiert und die Phosphorylierung nach PMA-Stimulation mit Hilfe von Massenspektrometrie untersucht.

3.4.1. In-Vitro-Phosphorylierung-Peptid-Kinase-Array

Mittels eines Peptid-Kinase-Arrays wurden mehrere potentiell durch PKCs phosphorylierbare Sites *in-vitro* identifiziert. Hierzu wurde ein Chip, auf dem PKP3-Peptide *gespottet* wurden, mit aktiver Kinase und radioaktivem ATP behandelt, sodass phosphorylierte Peptide über Autoradiographie nachgewiesen werden konnten. Jedes Peptid hatte dabei eine Länge von 15 Aminosäuren, wobei je 10 Aminosäuren sequenzgleich mit dem nächsten Peptid waren. Viele der so identifizierten *Sites* wurden auch von dem *Kinase Predictor Tool* von Kinexus PhosphoNet mit einem Score von über 300 für die Phosphorylierbarkeit durch PKC δ bewertet. Mittels phosphosite.org wurde zusammengestellt, wie häufig diese Serine bzw. Threonine bereits in Massenstudien phosphoryliert gefunden wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die dem RXXS/T Motiv entsprechenden, von PKC δ phosphorylierten Aminosäuren sind S134, S135, S220, S256, S280, S314, T676 und S683. Diese sind im PKP3-Schema rot markiert. Interessanterweise kam es auch zu Phosphorylierung von Peptiden der C-terminalen *Repeats*. Für diese wurde laut Phosphosite bisher noch keine Phosphorylierung beschrieben. Die Phosphorylierung anderer desmosomaler Proteine ist im Anhang Tab. A2 zusammengefasst.

Tab. 7 Potentielle Phosphorylierungsstellen von humanem PKP3 nach dem Peptid-Kinase-Array

Protein	Peptid Start	Sequenz	PKC α	PKC δ	PKC η	S/T	RXXS/T	Konserviert Maus	Voraussage Kinexus PhosphoNet Score >300	Hits auf Phosphosite.org
PKP3	81	RGQYHTLQAGFSSRS	+	+	+	T86 S92 S93 S95	- - - -	T86 S92 S93 S95	- S92 - -	T86: 132 S92: 3 S93: 0 S95: 20
PKP3	121	SRSAVDLSCSRRLLS	+	+	+	S121 S123 S128 S130 S134 S135	- - - - S134 S135	S121 S123 T128 S130 S134 S135	- - - S130 S134 -	S121: 1 S123: 12 S128: 0 S130: 1 S134: 8 S135: 0
PKP3	181	LRSLRLGPGGLDDRY	+	+	-	S183	-	S183	S183	S183: 16
PKP3	201	QLEPAATSTYRAFAY	-	+	-	T207 S208 T209	- - -	- S208 T209	- - -	T207: 3 S208: 2 T209: 13
PKP3	206	ATSTYRAFAYERQAS	+	+	-	T207 S208 T209 S220	- - - S220	- S208 T209 S220	- - - -	T207: 3 S208: 2 T209: 13 S220: 1
PKP3	241	RTIRAPAVRTLQRFQ	+	+	-	T242 T250	- -	T242 T250	- -	T242: 0 T250: 3
PKP3	246	PAVRTLQRFQSSHRS	+	+	+	T250 S256 S257 S260	- S256 - -	T250 S256 S257 S260	- S256 S257 -	T250: 3 S256: 0 S257: 0 S260: 3
PKP3	271	VLEPVARAPSVRSL	-	+	+	S280 S283 S285	S280 - S285	S280 S283 S285	S280 - -	S280: 20 S283: 4 S285: 8
PKP3	301	NSYGSVRTLQRLSSG	+	+	-	S302 S305 T308 S313 S314	- - - - S314	S302 - T308 S313 S314	- S305 - S313 S314	S302: 4 S305: 4 T308: 7 S313: 118 S314: 123
PKP3	566	VVGCFTPQSRRLREL	+	+	+	T571 S574	- -	T571 S574	- S574	T571: 4 S574: 6
PKP3	671	QLRSLTGLIRNLSRN	-	+	+	S674 T676 S683	- T676 S683	S674 T676 S683	- - S683	S674: 0 T676: 0 S683: 0
PKP3	676	TGLIRNLSRNARNKD	+	+	+	T676 S683	- S683	T676 S683	- S683	T676: 0 S683: 0
PKP3-Maus RXXS/T										

Unter den artifiziellen Bedingungen des *in-vitro*-Kinase-Arrays ist es möglich, dass auch Serine/Threonine phosphoryliert werden, die *in-vivo* von den jeweiligen Kinasen nicht modifiziert werden. Um nun Hinweise auf Phosphorylierung innerhalb der Zelle zu erhalten, wurde PKP3 aus Mauskeratinozyten, die zuvor mit PMA stimuliert bzw. Sotrastaurin inhibiert wurden, mittels Immunpräzipitation isoliert und von der Core Facility Massenspektrometrie Halle (Saale) nach Phosphorylierungen untersucht. Hierbei wurden Phosphorylierungen an den Positionen S283, S313 und S314 gefunden. Während die letzteren beiden auch in den inhibierten Proben auftraten, konnte die Phosphorylierung von S283 nur in der durch PMA stimulierten Probe nachgewiesen werden. Jedoch ist eine quantitative Aussage zu den Phosphorylierungen anhand dieser Daten nicht möglich, entsprechend ist es denkbar, dass das Motiv S313/314 in den beiden Proben unterschiedlich stark phosphoryliert vorliegt. Leider lag die Sequenzabdeckung nur zwischen 49 und 55 %. Die potentiell relevanten RXXS/T-Sites S220, S256, S280 und S683, sowie die mit einem Kinexus PhosphoNet Score von über 300 bewerteten Sites S92, S130, S183, S256, S257, S280, T574 und S683 wurden nicht mit abgedeckt (Anhang Abb. A7). Nichtsdestotrotz wurden Anhand dieser Ergebnisse die Motive S283 und S313/314 als potentiell bedeutend für die PKC induzierte Phosphorylierung angesehen und über Punktmutationen genauer untersucht. Bei der S283-Site handelt es sich jedoch nicht um ein RXXS-Motiv. Bei den benachbarten Sites S280 und S285 hingegen schon. Weshalb das Motiv auf S280/283/285 erweitert wurde.

3.4.2. Untersuchung von PKP3-Mutanten

Anhand der Ergebnisse des *in-vitro*-Kinase-Assays, der Massenspektrometrie und den Informationen aus der Literatur wurden vier potentielle PKP3-Motive ausgewählt, zu Alanin mutiert und die Phosphorylierung der jeweiligen Mutante nach Stimulierung durch PMA untersucht (Abb.36). Aufgrund der Alanin-Mutation können die entsprechenden Sites nicht mehr phosphoryliert werden. Sollte eines dieser Motive im Wildtyp nach PMA-Behandlung phosphoryliert werden, würde das Phospho-Signal der jeweiligen Mutante geringer ausfallen. Die Mutanten wurden wie folgt benannt (in Klammern sind die jeweiligen Aminosäureaustausche gekennzeichnet):

- 1) 95A (S92/93/95A)
- 2) 134A (S134/135A)
- 3) 280A (S280/283/285A)
- 4) 314A (S313/314A)

Alle PKP3-Konstrukte trugen einen C-terminalen GFP-Tag. Phosphorylierung von GFP in einem RXXS/T-Motiv konnte in einem Kontrollexperiment ausgeschlossen werden (Anhang Abb. A8).

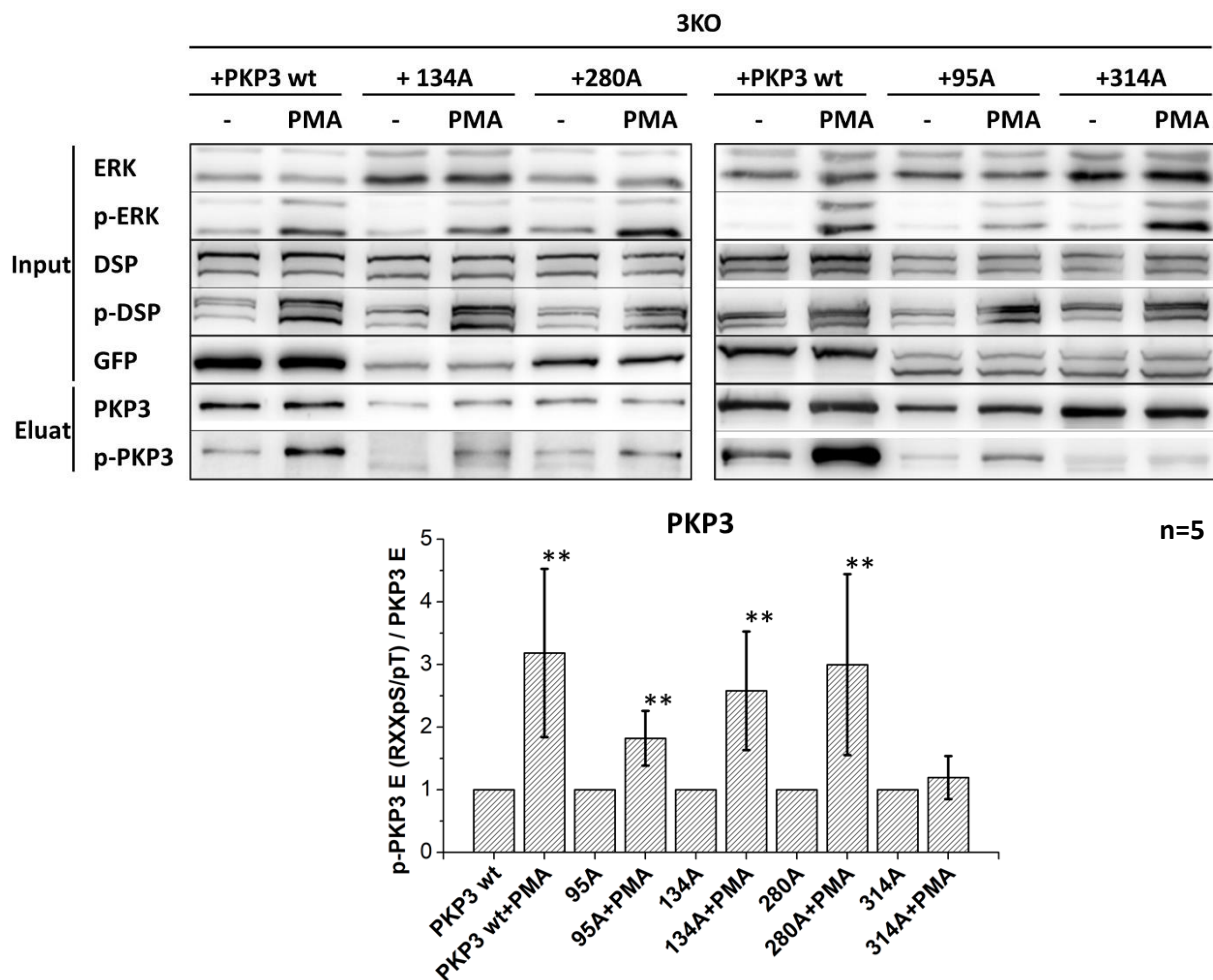


Abb. 36 PMA Stimulation der PKP3 Alanin Mutanten

Die Bezeichnung der Linien steht für folgende PKP3-Konstrukte: 95A (PKP3-S92/93/95A-GFP); 134A (PKP3-S134/135A-GFP); 280A (PKP3-S280/283/285A-GFP); 314A (PKP3-S313/314A-GFP). Die PKP3-Mutantenlinien wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie je für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Das Phosphorylierungssignal wurde mittels Western-Blot detektiert. Das PKP3 Eluat wurde mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Phosphorylierung dieses Proteins wurde mit einem Motivantikörper (RXXpS/pT) nachgewiesen.

Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bezogen auf die Differenz zur jeweiligen unbehandelten Probe und wurde über eine *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* mit *post-hoc Tukey-Honesty-Significant-Difference-Test* bestimmt.

Obwohl Motiv 95A nicht dem RXXS/T-Motiv entsprach, führte die Mutation dieser Aminosäuren zu einer verringerten PKP3-Phosphorylierung. Die Mutation der Motive 134A und 280A zeigte keine signifikante Änderung der PKP3-Phosphorylierung im Vergleich zu der Kontrolllinie. Jedoch ging das PMA-abhängige Phosphorylierungssignal durch die Mutation des 314A Motives verloren. Dies spricht stark dafür, dass das 314A-Motiv in Wildtyp- PKP3 unter PMA-Stimulation verstärkt phosphoryliert wird. DSP (S177/178)-Phosphorylierung, wurde durch die PKP3-Mutanten nicht beeinflusst.

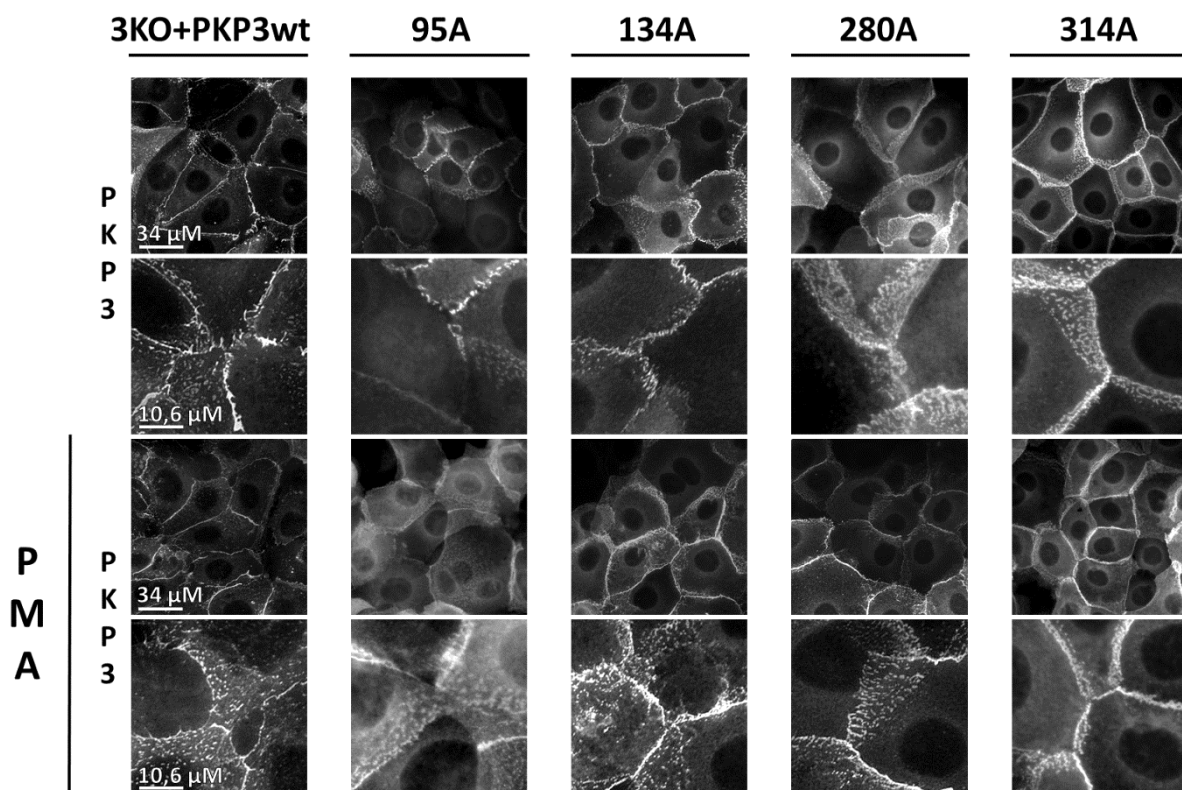


Abb. 37 Einfluss von PMA auf die Lokalisation von PKP3-Alanin-Motivmutanten

Die Bezeichnung der Linien steht für folgende PKP3-Konstrukte: 95A (PKP3-S92/93/95A-GFP); 134A (PKP3-S134/135A-GFP); 280A (PKP3-S280/283/285A-GFP); 314A (PKP3-S313/314A-GFP). Die PKP3-Mutantenlinien wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie je für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μm, der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μm.

Zusätzlich zum Western-Blot wurden die Mutanten auch nach ihrer PKP3-Lokalisation in Abhängigkeit zum PMA-Effekt untersucht (Abb.37). Die Mutanten zeigten dabei allgemein einen Phänotyp mit fransigen Zellkontakten. Es kam zu keiner verstärkten Lokalisation von PKP3 an den trizellulären Bereichen, zudem wuchsen die Zellen leicht übereinander. Die 95A Mutante zeigt eine relativ schwache Membranlokalisation. Nach Zugabe von PMA wurde

dieser Effekt nochmals verstärkt. Die Kontakte der 134A- und 280A-Mutanten wirkten dann ungeordneter ähnlich wie es in der 3KO+PKP3wt-Linie der Fall war. Die 314A-Mutante hingegen wirkte auch in der Immunfluoreszenz-Färbung von PMA größtenteils unbeeinflusst, es entstanden aber dennoch kleine Lücken an den trizellulären Kontakten.

Aufgrund der bisherigen Hinweise auf eine Relevanz des S313/314-Motivs, wurde eine Phosphomimikmutante 314E (S313/314E) generiert und mittels Immunfluoreszenz nach PMA- und EGTA-Behandlung untersucht. Hierzu wurde PMA vorgelegt, um sicherzugehen, dass die Proteine phosphoryliert waren, sobald EGTA wirkte (Abb.38).

Durch die 135-minütige PMA-Behandlung kam es nun auch bei der 314A-Mutante zu deutlich fransigeren Zellkontakten, jedoch blieb PKP3 weiterhin stark an der Membran. Es bildeten sich aber Lücken an den trizellulären Kontakten. Die Zellen wuchsen kaum übereinander. Die Lochbildung durch EGTA war gering und wurde auch durch PMA nicht verstärkt. Die 314E-Motivmutante zeigte eine signifikant schwächere Lokalisation von PKP3 an der Membran und die Zellen überwuchsen sich auch ohne PMA deutlich. Durch Zugabe von PMA rundeten sie sich ab. In Kombination mit EGTA kam es zu deutlichen Kontaktverlusten, zum Teil auch an lateralen Bereichen. Insgesamt spricht dies dafür, dass sich eine Phosphorylierung von PKP3 am Motiv S313/314 negativ auf die Membranlokalisation und somit auch negativ auf Desmosomenstabilität auswirkt.

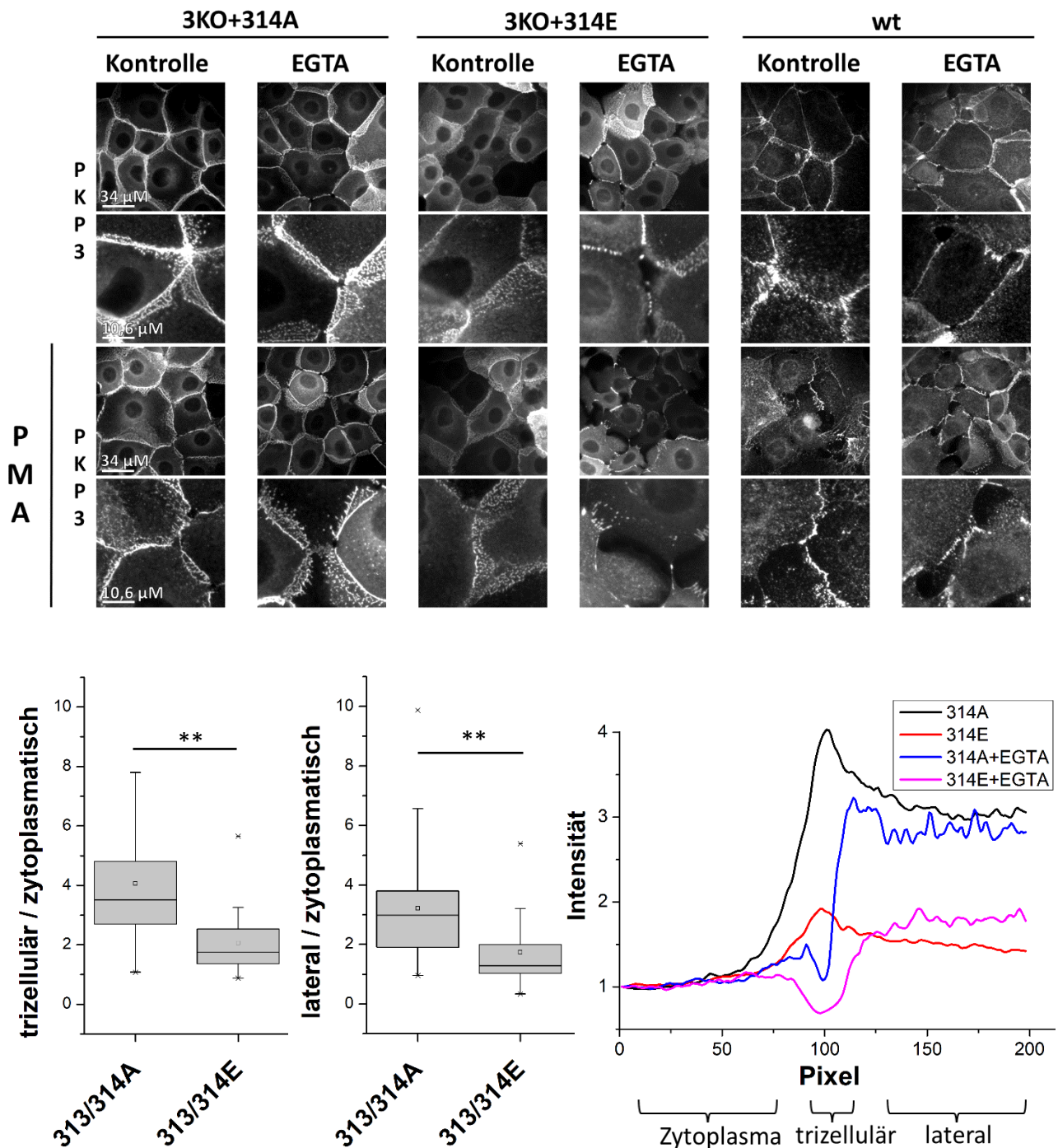


Abb. 38 Unterschied der Lokalisation von PKP3 314A und 314E in Abhängigkeit von PMA und EGTA

Die Bezeichnung der Linien steht für folgende PKP3-Konstrukte: 314A (PKP3-S313/314A-GFP) und 314E (PKP3-S313/314E-GFP). Die Linien wurden 24 h in HCM kultiviert. Danach wurden sie je für 135 min mit PMA stimuliert und 120 min mit EGTA (Zugabe 15 min nach PMA) behandelt. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μm, der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μm. Unten ist die Quantifizierung der trizellulären PKP3 Lokalisation der 314A und 314E Motive im Vergleich zur zytoplasmatischen, sowie der lateralen im Vergleich zur zytoplasmatischen gezeigt. Die Signifikanz wird angegeben mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$. Zur Quantifizierung wurde eine 200 pxl lange Linie über den lateralen Bereich, durch den trizellulären bis ins Zytoplasma gelegt. Ausgewertet wurden für den lateralen Bereich Pixel 130-190 und für den trizellulären Pixel 96-103. Für den zytoplasmatischen Bereich wurden die Pixel 5-65 gewählt. Der Mittelwert aller Messungen ist unten rechts grafisch für die jeweiligen Behandlungen dargestellt.

3.5. Zusammenfassung

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden. In den hier verwendeten Mauskeratinozyten sind die PKC-Isoformen Alpha, Gamma, Delta, Epsilon, Zeta, Eta und Iota exprimiert. Durch die Stimulation mittels PMA kam es zur direkten Aktivierung der PKCs (mit Ausnahme der atypischen Isoformen Zeta und Iota). Nach bereits 15 Minuten ließen sich dadurch Aktivierung des MAP-Kinase-Weges (MEK/ERK/RSK) und eine Inaktivierung des AKT-Signalweges beobachten. Es kam zusätzlich zu einer Phosphorylierung von DSP an der Position S177/178 und von PKP3 an mindestens einem RXXS/T-Motiv. PKP1, JUP und Dsg 1/2 wurden durch PMA nicht an einem RXXS/T-Motiv modifiziert. Über Dsc konnte keine Aussage getroffen werden. Die Phosphorylierung von PKP3 und DSP war unabhängig von der calciumabhängigen Differenzierung, von Calciumentzug und von der Anwesenheit von DSP, PKP3 und PKP1 (DSP Phosphorylierung in PKP1- und PKP3-KO und PKP3 Phosphorylierung in DSP-KO und PKP3-KO) möglich. Die PMA-Stimulation führte zu fransigen Zellkontakten und zu einer Reduktion von PKP3 an den trizellulären Kontakten. Durch Inhibierung aller PKCs mittels Sotrastaurin wurde diese Effekte größtenteils aufgehoben. Zudem wurden MAP-Kinasen wieder deaktiviert und AKT reaktiviert. Die Inhibierung von PKC α mittels Gö6976 reduzierte zwar die PKP3-Phosphorylierung (Western-Blot), hebt aber den PMA-Effekt auf die Lokalisation (Immunfluoreszenz) nicht auf. Des Weiteren wurde weder das MAP-Kinase-, noch das AKT-Signaling von Gö6976 beeinflusst. Im Gegensatz zu der Inhibitorbehandlung führte der spezifische *Knockdown* von PKC α nicht zu einer Reduktion der PKP3-Phosphorylierung in einem RXXS/T-Motiv unter PMA-Stimulation und deutete somit darauf hin, dass es sich bei der Wirkung des Gö6976-Inhibitors nicht um einen PKC α -abhängigen Effekt handelte. Auch die PKC η -Isoform schien für die hier betrachteten Zusammenhänge nicht relevant zu sein. Der *Knockdown* von PKC δ hingegen zeigte einen signifikanten Effekt auf die PKP3-Phosphorylierung und auf die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges. Auch in der Immunfluoreszenzfärbung konnte eine gestärkte Resistenz gegen die durch PMA-induzierten Effekte beobachtet werden. Durch einen *Doppelknockdown* von PKC δ und α wurde diese Resistenz leicht verstärkt. Durch *Knockdown* von RSK konnte gezeigt werden, dass die PKP3-Phosphorylierung unabhängig vom MAP-Kinase-Signaling war. Mit Hilfe von Massenspektrometrie und *in-vitro*-Kinase-Assays wurden potentiell durch PKC phosphorylierbare PKP3-Sites identifiziert. Eine Mutation von Serin 313/314 zu Alanin zeigte eine deutliche Resistenz von PKP3 gegenüber PMA-abhängiger Phosphorylierung. Während

die S313/314A-Mutante zu einer gestärkten Lokalisation von PKP3 an der Membran führte, führte die Mutation dieses Motives zu Glutamat (Phosphormimetikum) zu einer geschwächten Membranlokalisation. Entsprechend dieser Daten ist anzunehmen, dass über PKC δ PKP3 an dem S313/314-Motiv phosphoryliert und dadurch an der Membran reduziert wird. Dies wiederum beeinflusst Zusammensetzung und Funktion der Desmosomen.

4. Diskussion

Die Phosphorylierung desmosomaler Proteine hat maßgeblich Einfluss auf Bildung, Stabilität und Hyperadhäsion der Desmosomen. Sie wird oft über Wachstumsfaktoren, wie EGF oder Insulin induziert. Besonders MAPK-, Akt- und PKC-Aktivität spielen dabei eine wichtige Rolle. PKCs phosphorylieren generell Serine und Threonine in Gegenwart von Arginin und/oder Lysin. Jedoch ist die Identifizierung der jeweiligen Serine/Threonine oft nicht trivial. Eine gängige Methode ist der Nachweis über Phosphoantikörper, welche phosphorylierte Serine/Threonine in Gegenwart bestimmter Aminosäuren erkennen. Leider ist das Angebot und die Spezifität solcher Antikörper bisher noch begrenzt, sodass noch nicht jede Site, bzw. jedes Motiv untersucht werden kann. Häufig auftretende PKC-abhängig phosphorylierte Motive sind beispielsweise R/KXXS/T und R/KXS/T (Kang et al., 2012), weshalb hier die Phosphorylierung mittels eines RXXS/T-Motiv-Antikörpers untersucht wurde. Jedoch handelt es sich hierbei um ein Motiv, dass generell gut von Mitgliedern der AGC-Kinase-Familie erkannt wird (Bradley und Beltrao, 2019). Entsprechend muss eine so nachgewiesene Phosphorylierung nicht zwangsläufig direkt durch PKC vermittelt sein. Mit Hilfe von Aktivierung, Inhibierung und *Knockdown* der entsprechenden Kinasen lässt sich aber dennoch eine wahrscheinliche Aussage zur Beteiligung der PKCs treffen. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass über diese Methode zwar Phosphorylierungen angezeigt werden, die genaue Position dieser Modifikation aber unbekannt bleibt. Daher ist es notwendig, sich zusätzlich weiterer Methoden zu bedienen, wie beispielsweise die Untersuchung mittels Massenspektrometrie oder mittels Peptidkinase-Arrays. So gefundene, potentielle *Sites* können dann beispielsweise über Punktmutation verifiziert werden.

Die Ergebnisse aus 3.2.1. zeigten, dass die einzelnen desmosomalen Proteine unterschiedlich auf die Stimulation der Signalwege reagieren. Aktivierung von Akt2 über Insulin hatte, wie von Wolf et al., 2013 beschrieben, einen deutlichen Effekt auf PKP1. Obwohl die PKCs eine hohe Homologie zu den Akt-Kinasen aufweisen und vergleichbare Motive erkennen (Akt Motiv: RXRXXS/T (Alessi et al., 1996b)), kam es durch PMA-Stimulation nicht zur Phosphorylierung von PKP1 in einem RXXS/T-Motiv. Stattdessen kam es zusammen mit der Inaktivierung von Akt, sogar zu einer geringfügigen Signalabnahme. Da schon häufiger eine inhibierende Wirkung der PKCs auf Akt-Aktivität beschrieben wurde, entsprach dies den Erwartungen (Motley et al., 2001; Motley et al., 2003; Wen et al., 2003; Khamaisi et al., 2016; Hsu et al.,

2018). Aktivierung der MAPKs über EGF führte entsprechend der Ergebnisse von Müller et al., 2020 zu einer Phosphorylierung von PKP3. Durch Aktivierung der PKCs (PMA) wurde aber ein deutlich stärkeres PKP3-Phosphorylierungssignal beobachtet. DSP zeigte dann ebenfalls eine leichte Erhöhung des Phospho-RXXS/T-Motivs, darunter möglicherweise PKC α -abhängig am S2860 (S2849 im Menschen) (Stappenbeck et al., 1994; Hobbs und Green, 2012). Da DSP aber sehr groß ist (>250 kDa) und 34 RXXS/T-Motive in der Maus aufweist, ist es möglich, dass die einzelnen Motive unterschiedlich auf die Stimulationen reagieren und so ist die Untersuchung mit einem Motiv-Antikörper hier oftmals uneindeutig. Zudem ist unklar, ob der RXXpS/pT-Antikörper unabhängig von den umgebenden Aminosäuren alle Motive, die dieser Konsensussequenz entsprechen, erkennt. Mit einem spezifischen Phosphoantikörper für das DSP-Motiv pS177/178 (pS165/166 im Menschen) konnte eine DSP-*Site* identifiziert werden, die durch PMA-Stimulation verstärkt phosphoryliert wird. Jedoch ist die Funktion dieser *Site* *in-vivo* bisher noch unverstanden. In diversen Krebslinien konnte sie verstärkt phosphoryliert gefunden werden, weshalb sie an Aufmerksamkeit gewonnen hat (phosphosite.org). Ein Zusammenhang mit den PKCs wurde bisher aber nicht publiziert. Generell wurde für die PMA-abhängige Phosphorylierung von DSP ein adhäsionsverringender Effekt beschrieben (Stappenbeck et al., 1994; Hobbs und Green, 2012). Hierbei wird die Beteiligung von PKP2 als bedeutend angesehen (Bass-Zubek et al., 2008). Jedoch zeigen die Ergebnisse in 3.2.1., dass PMA-abhängige DSP-Phosphorylierung in Mauskeratinozyten auch ohne PKP2 möglich ist (PKP2 wird nicht exprimiert). Zudem ließ sich anhand von 3.3.6. erkennen, dass zumindest die Phosphorylierung von DSP S177/178 auch in Abwesenheit von je PKP3 oder PKP1 stattfindet. Inwieweit die *Site* Einfluss auf Adhäsion nimmt, ist aber weiterhin unklar.

Dsg 1/2 und PG hatten auf keine der Stimulationen mit einer messbaren Signaländerung reagiert. Das heißt jedoch nicht, dass sie nicht dennoch darüber beeinflusst und reguliert werden könnten. Es gibt diverse Phosphorylierungsstellen, die nicht dem RXXS/T-Motiv entsprechen und somit von dem hier verwendeten Antikörper nicht erkannt werden. PG wird beispielsweise EGF-abhängig an Tyrosinresten phosphoryliert und darüber reguliert (Gaudry et al., 2001; Lorch et al., 2004). Aber auch eine Phosphorylierung über PKCs in einem anderen Motiv, wie dem RXS/T-Motiv, oder eine Phosphorylierung durch PKC-abhängig aktivierte Kinasen ist nicht auszuschließen. Für PKP3 wurde zusätzlich mit entsprechenden Motivantikörpern die Phosphorylierung in RRXS/T-, R/KXSXR/K- und PXSP- (MAPK-Motiv

(Sheridan et al., 2008)) Motiven untersucht (Daten nicht gezeigt), jedoch konnte kein deutlicher Effekt festgestellt werden.

Eine Behandlung mit PMA führte *in-vivo* zu einer deutlich veränderten Morphologie der desmosomalen Zellkontakte (3.2.2.). PKP3 lokalisiert in unbehandelten Zellen unter HCM Bedingungen verstärkt an den trizellulären Kontakten (Keil et al., 2016). Aber bereits nach 15-minütiger PMA-Stimulation war es dort signifikant reduziert. Die Zellkontakte begannen diffuser zu werden und vereinzelt entstanden kleine Löcher. Dieser Effekt verstärkte sich deutlich bei längerer PMA-Exposition (Daten nicht gezeigt). Wobei berücksichtigt werden sollte, dass eine Langzeit-PMA-Behandlung zur Inaktivierung und dem Abbau der klassischen und *novel* PKCs führt. Entsprechend ist die Interpretation von längeren Behandlungen schwierig (Lu et al., 1998; Leontieva und Black, 2004). Nichtsdestotrotz wirken die Zellkontakte PMA-behandelter Desmosomen instabiler. Bei gleichzeitiger EGTA-Behandlung entstanden größere Lücken zwischen den Zellen, als es ohne PMA der Fall gewesen war. Dies passt auch zu den Beobachtungen von Wallis et al. 2000, dass Hyperadhäsion durch PMA aufgehoben wird. Es ist denkbar, dass die Phosphorylierung und die damit einhergehende Lokalisationsänderung von PKP3 daran beteiligt ist. Dies wurde auch von Keil et al. 2016 vorgeschlagen, nachdem er einen PKC-abhängigen Adhäsionsverlust in Mauskeratinozyten nach PKP3-Überexpression beobachtet hatte. Inhibierung der PKCs erhöhte dabei die Zelladhäsion deutlich. Durch Sotrastaurin-Behandlung (Breitband PKC Inhibitor) kam es zu einer gestärkten PKP3-Membranlokalisierung, vor allem an den trizellulären Kontakten (3.3.4.). Dies liefert einen weiteren deutlichen Hinweis darauf, dass über PKC-abhängige PKP3-Phosphorylierung die desmosomale Zell-Zell-Adhäsion verringert und so Hyperadhäsion aufgehoben werden kann (Abb.39).

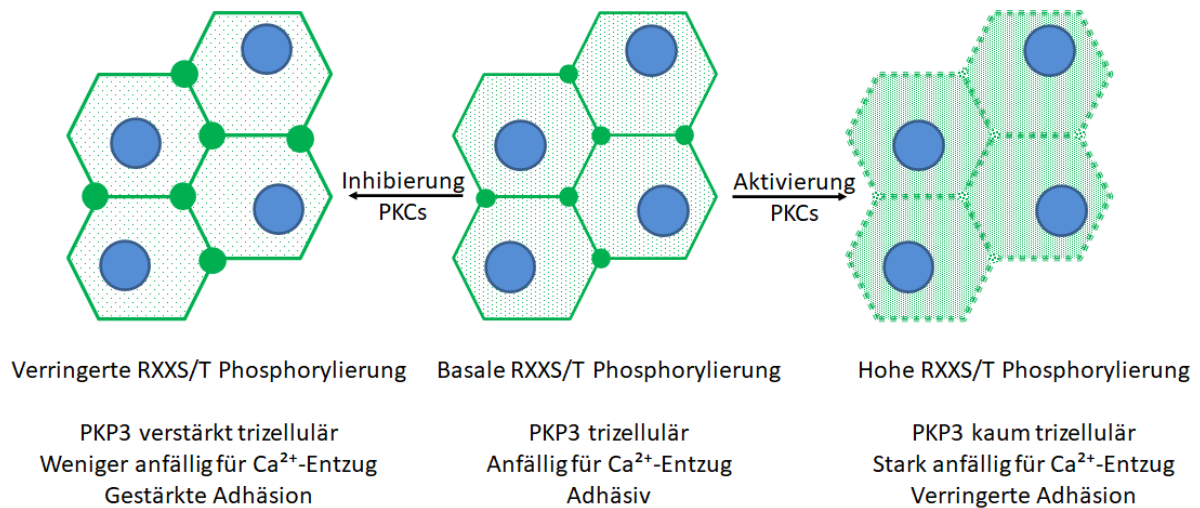


Abb. 39 Schematische Darstellung des Einflusses der PKCs auf PKP3

Hier ist schematisch der Effekt auf die PKP3-Lokalisation und die damit einhergehenden Folgen für die Zelladhäsion gezeigt. PKP3 ist grün dargestellt, in blau sind die Zellkerne angedeutet.

Bisher wurden direkte Effekte der PKC-Familie auf die Desmosomen nur für die klassische, calciumabhängige Isoform PKC α beschrieben. Dabei wurde meist Desmosomenstabilität und/oder Effekte auf DSP betrachtet (Kröger et al., 2013; Wallis et al., 2000). Effekte durch andere PKC-Isoformen wurden bisher eher vernachlässigt, obwohl sie zum Teil ebenfalls deutlich exprimiert (3.3.1.) und oftmals zusammen mit PKC α aktiviert werden. In vielen Fällen wurde die Wirkung von PKC α über die Inhibierung mittels Gö6976 (als spezifisch für PKC α beschrieben (Martiny-Baron et al., 1993)), GF109203X (leicht spezifisch für klassische PKCs (Toullec et al., 1991; Gekeler et al., 1996)) oder Breitbandinhibitoren gezeigt. In 3.3.3. lässt sich auch hier deutlich ein Effekt auf die PMA-abhängige Phosphorylierung von PKP3 und DSP (S177/178) durch die Inhibierung mittels Gö6976 erkennen. Jedoch blieb diese Wirkung in der Immunfluoreszenz-Färbung aus, denn die reduzierte PKP3-Phosphorylierung nach Gö6976-Behandlung konnte den PMA-abhängigen PKP3-Verlust an den trizellulären Kontakten nicht verhindern. Und auch der Entzug von Calcium (3.3.2.) verstärkte den Effekt von PMA, anstatt ihn zu verringern, obwohl PKC α als Ca-abhängige Isoform unter Calciumentzug eine verringerte Aktivität aufweisen müsste. Es ist zwar möglich, dass trotz EGTA-Behandlung noch genügend Calcium für eine Aktivierung der PKC α vorhanden war, zumal es nach Aktivierung zu einem Abspalten der regulatorischen Domäne kommen kann (konstitutiv aktiv). Aber dennoch war anhand der beschriebenen Effekte von Gö6976 an dieser Stelle eine Verringerung der Phosphorylierung zu erwarten gewesen. Da aber auch der *Knockdown* der

PKC α -Isoform nicht zu einer deutlichen Reduktion der PKP3-Phosphorylierung führte, spricht viel dafür, dass ein *Offtarget* existiert, welches von Gö6976 inhibiert wurde und dadurch die im Western-Blot gezeigte Wirkung von PMA verringerte. Generell ist es ein Problem, dass viele der gängigen PKC-Inhibitoren eine Reihe weiterer Kinasen inhibieren und zum Teil, obwohl sie als spezifisch beschrieben sind, auch deutliche Effekte auf die jeweils anderen Isoformen haben (siehe Anhang Tab. A1). Im Falle für Gö6976 sind beispielsweise auch die RSKs, MSKs, GSK3 β , PAKs (p21-aktivierte Kinase), Aurora, CDKs und einige weitere deutlich betroffen (Wu-Zhang und Newton, 2013). Neben Gö6976 führte auch die Inhibierung von ERK mittels FR180204 zu einer verminderten PKP3-Phosphorylierung. Aber wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, kam es durch die Inhibierung von MEK (MAPKK *Upstream* von ERK) ebenfalls zur Inaktivierung von ERK und dabei blieb der PMA-Effekt auf PKP3 bestehen. Somit spricht auch hier viel für einen *Offtarget*-Effekt. Interessanterweise ist eines der *Offtargets*, die deutlich potent von FR180204 inhibiert werden können, die PKC-Isoform δ (Anastassiadis et al., 2011). Passend dazu zeigte der *Knockdown* der PKC δ -Isoform eine deutliche Resistenz von PKP3 gegenüber der PMA-Behandlung (3.3.7.). Die Wirkung des *Knockdowns* auf die PKP3-Phosphorylierung entsprach in etwa der Behandlung mit dem PKC-Breitbandinhibitor Sotrastaurin, was dafür spricht, dass PKC δ essentiell für die Regulation von PKP3 in einem RXXS/T-Motiv ist und andere Isoformen dies nicht kompensieren können. PKC δ -Aktivität wurde bereits mit der Regulation von *Gap Junctions* (Cone et al., 2014; Niger et al., 2010), sowie von *Tight Junctions* in Verbindung gebracht (Eckert et al., 2004; Koizumi et al., 2008; Wu et al., 2017). Und auch für Adhärenzverbindungen ist über Interaktion mit E-Cadherin ein Einfluss auf Zell-Zell-Adhäsion beschrieben worden, wobei PKC δ dort einen destabilisierenden Effekt brachte (Singh et al., 2009; Chen und Chen, 2009). Jedoch ist dies das erste Mal, dass die Beteiligung der PKC δ an der Regulation eines desmosomalen Proteins gezeigt werden konnte.

Auch in der Immunfluoreszenzfärbung (3.3.7. & Abb. A4) zeigte der *Knockdown* von PKC δ eine deutliche Resistenz von PKP3 gegenüber der PMA-Behandlung, jedoch wurde der Effekt nicht so stark reduziert, dass wieder der Wildtyp-Phänotyp erreicht werden konnte. Obwohl der *Knockdown* zu einer deutlichen Reduktion von PKC δ führte, kam es dadurch nicht um einem PKC δ -Null-Phänotyp. Entsprechend war immer noch etwas PKC δ vorhanden, welche für den PMA-Effekt in der Immunfluoreszenzfärbung verantwortlich gewesen sein könnte. Da aber die PKP3-Phosphorylierung im Western-Blot sehr deutlich reduziert war, ist es fraglich, inwieweit

die restliche Menge PKC δ noch derartige Effekte auslösen konnte. Entsprechend ist es eher plausibel, dass zusätzlich auch andere PKC-Isoformen an der Regulation von PKP3 beteiligt sein könnten. Dies könnte beispielsweise auch über die Modifizierung anderer desmosomaler Proteine oder die Modifizierung von PKP3 an einem anderen Motiv (z.B. RXS/T) erfolgen. Da trotz *Knockdown* noch über 40 % der PKC α vorhanden war und schwache Effekte auf die PKP3 Phosphorylierung im Western-Blot erkennbar waren, kann zudem ein Effekt von PKC α nicht ausgeschlossen werden. Der *Doppelknockdown* der Isoformen α und δ bestätigte diese Vermutung (3.3.7.1.). Hierdurch erreichte die trizelluläre PKP3-Lokalisation trotz PMA-Behandlung wieder Wildtyp-Niveau, was im jeweiligen Einzel*knockdown* nicht der Fall war. Daher sollte, auch wenn PKC δ in diesem Zusammenhang einen deutlich dominanteren Einfluss zu haben scheint, PKC α nicht ignoriert werden. Zudem besteht außerdem die Möglichkeit, dass die PKC-Isoform ϵ Einfluss auf desmosomale Phosphorylierung nimmt. Da sie sowohl bei Differenzierung, als auch Proliferation und Wundheilung der Haut beteiligt ist, sollte sie zukünftig mit berücksichtigt werden (Denning et al., 1995; Hessabi, 2005; Sharma et al., 2007). Voruntersuchungen mit dieser Isoform wurden bereits durchgeführt, brachten aber bisher keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Neben PKP3 waren auch die Proteine des MAPK-Signalweges (ERK) signifikant von dem PKC δ -*Knockdown* betroffen. Generell gelten PKCs als Aktivatoren der MAPKs, jedoch werden die MAPK-Signalwege je nach Gewebe und Kinase unterschiedlich von den PKC-Isoformen beeinflusst. PKC δ gilt dabei als Aktivator des ERK und des P38 MAPK-Wegs (Denning, 2010; Ueda et al., 1996), was hier im Falle des ERK-Signalweges deutlich bestätigt wurde. Sowohl PKC α , als auch PKC η scheinen für die Aktivierung dieses Signalweges in Mauskeratinozyten nicht essentiell zu sein. Müller et al. 2020 haben beschrieben, dass PKP3 RSK1-abhängig nach MAPK-Aktivierung über EGF an dem RXXS-Motiv S134 phosphoryliert wird. Da dieser MAPK-Weg auch unter PMA-Stimulation PKC δ -abhängig aktiviert wurde, bestand die Möglichkeit, dass der PMA-Effekt auf PKP3 über RSK vermittelt wird. Der Vergleich des RSK1/2-*Knockdowns* mit dem PKC δ -*Knockdown* zeigte aber klar, dass die PMA-abhängige PKP3-Phosphorylierung nicht abhängig von RSK war (3.3.7.2.). Das passt zu den Erkenntnissen von Xu et al., 2002, dass PMA und EGF zwar beide ERK-Phosphorylierung induzieren, diese zwei Mechanismen aber unabhängig voneinander wirken. Da PKCs auch über andere Stimulationen aktiviert werden können, bzw. für PKC δ sogar inaktivierende Effekte durch EGFR-abhängige Phosphorylierung

beschrieben wurden (Denning et al., 1996), sprechen diese Daten dafür, dass über PKC δ eine EGF-unabhängige Regulation der Desmosomen möglich ist.

Die PMA-abhängige Phosphorylierung von DSP (S177/178) wurde weder vom *Knockdown* der PKC-Isoformen α oder δ noch von der Isoform η aufgehoben. Die Tatsache, dass Gö6976 hier einen geringeren Effekt als Sotrastaurin zeigte, spricht an sich dafür, dass diese *Site* von mehr als nur einer PKC phosphoryliert werden kann. Zusammen mit den Ergebnissen des *Knockdowns* ist es denkbar, dass in diesem Fall der Verlust einer Isoform durch eine andere Isoform kompensiert werden kann. Die Daten des Peptid-Kinase-Assay zeigen, dass eine Phosphorylierung dieser DSP-*Site* auch durch die AMP aktivierbare Kinase α (AMPK α) möglich ist (Daten nicht gezeigt). Da diese wiederum PKC ϵ -abhängig aktivierbar ist, besteht zudem die Möglichkeit, dass PKC ϵ an der Phosphorylierung von DSP S177/178 beteiligt ist (Vanezis et al., 2014). An dieser Stelle ist es notwendig, noch weitere Untersuchungen durchzuführen, um die tatsächlich beteiligten Kinasen zu identifizieren und die biologische Bedeutung dieser *Site* zu verstehen.

Über *in-vitro*-Peptid-Chip-Kinase-Arrays ließen sich diverse PKP3-*Sites* identifizieren, die potentiell durch PKC α , δ oder η phosphoryliert werden können (3.4.1.). Den Erwartungen entsprechend lag der Großteil dieser Serine/Threonine in der N-terminalen, ungeordneten Domäne, welche für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich ist (Bonné et al., 2003). Elf dieser Aminosäuren wurden auch von Kinexus PhosphoNet mit einem Score von über 300 für die Phosphorylierung durch PKC δ bewertet. Auffällig war, dass von diesen nur vier dem RXXS/T-Motiv entsprachen (S134, S256, S280, S683) und für zwei dieser Sites (S256, S683) noch nie eine Phosphorylierung *in-vivo* beschrieben wurde. Ein Problem bei den *in-vitro*-Kinase-Arrays ist, dass oftmals auch Peptide phosphoryliert werden, die *in-vivo* nicht modifiziert werden können. Das kann beispielsweise an den Reaktionsbedingungen *in-vitro*, aber auch der Zugänglichkeit der Proteine *in-vivo* liegen. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass oftmals mehr als ein Serin/Threonin pro Peptid vorhanden ist und somit die Zuordnung der Phosphorylierung nicht genau möglich ist. In diesem Fall wurde beispielsweise ein Peptid mit den Aminosäuren T242 und T250, sowie das darauffolgende Peptid mit den Aminosäuren T250, S256, S257 und S260 phosphoryliert. Eine Phosphorylierung von T250 würde dann ein positives Signal für beide Peptide erklären, lässt aber keine Rückschlüsse auf die Phosphorylierung der üblichen Reste zu. Mit Hilfe der Core Facility Massenspektrometrie Halle

wurden drei Serine identifiziert, die phosphoryliert unter PMA Behandlung vorlagen: S283, S313 und S314. Inwieweit diese Phosphorylierungen PMA-induziert bzw. -verstärkt sind, lässt sich bisher nicht sagen, da die Bestimmungen nicht quantitativ waren. Leider war der Sequenzbereich unter anderem für S256 und S683 nicht abgedeckt (Abb. A7). S313/314 sind bisher überdurchschnittlich oft in Proteomanalysen phosphoryliert gefunden worden, jedoch ist zur biologischen Funktion dieser *Site* nichts beschrieben (Phosphosite.org). Interessant ist außerdem, dass diese *Site* dem Anschein nach nicht in der N-terminal ungeordneten Domäne liegt, die für die gängigen PKP3-Proteininteraktionen verantwortlich ist, sondern im ersten Armadillo Repeat.

Generell ist über die Auswirkungen von Phosphorylierung an den verschiedenen PKP3-Serin/Threonin-Sites bisher sehr wenig bekannt. S134/135 ist, wie weiter oben bereits erwähnt, eine *Site*, die RSK-abhängig nach EGF-Stimulation phosphoryliert wird. Dies führt zu verstärkter Membranassoziation von PKP3 (Müller et al., 2020), dies entspräche nicht dem Phänotyp einer PMA-Behandlung. Über S285 ist beschrieben, dass ihre Phosphorylierung eine Interaktion mit dem 14-3-3 σ -Protein ermöglicht, wodurch PKP3 an den trizellulären Kontakten akkumuliert, ebenfalls das Gegenteil des PMA-Phänotyps (Rietscher et al., 2018). Passend hierzu wurde PKP3 weiterhin PMA-abhängig phosphoryliert, auch wenn S134/135 oder S280/283/285 zu Alanin mutiert wurden (3.4.2.) und auch in der Immunfluoreszenzfärbung konnte keine verstärkte PKP3-Membranassoziation beobachtet werden. Selbiges galt auch für die S92/93/95A-Mutante. Lediglich die Mutation von S313/314 zu Alanin war in der Lage, die im Western-Blot gezeigte Phosphorylierung mittels PMA komplett zu unterdrücken. Entsprechend ist es sehr wahrscheinlich, dass diese *Site* PKC δ -abhängig phosphoryliert wird oder eine Phosphorylierung dieses Motifs notwendig ist, damit andere PKC δ -abhängige RXXS/T-Motive phosphoryliert werden können. Dazu passend zeigte die S313/314A-Mutante in der Immunfluoreszenzfärbung eine vergleichsweise starke PKP3-Membranassoziation (stärker als wt; Anhang Abb. A9) und reagierte auch hier nur sehr milde auf eine PMA-Behandlung. Interessanterweise zeigte auch die Behandlung mit EGTA nur einen schwachen Effekt und wurde ebenfalls in Kombination mit PMA nicht deutlich verstärkt. Entsprechend besteht die Möglichkeit, dass diese *Site* in ihrer unphosphorylierten Form Hyperadhäsion begünstigt. In der Phosphomimik-Mutanten-Linie (S313/314 Mutation zu Glutamat) war PKP3 hingegen deutlich schwächer an der Membran assoziiert und kaum an trizellulären Kontakten verstärkt. Selbst ohne PMA zeigte die Mutante Ähnlichkeiten zu PMA-behandelten Wildtyp-

Zellen (Anhang Abb. A9). Die Zugabe von PMA verstärkte diesen Effekt nicht mehr deutlich. Die Behandlung mit EGTA führte zudem zu deutlich größeren Lücken zwischen den Zellen, als bei der Alanin-Mutante. Überraschenderweise zeigte die S313/314E Mutante bei Kombination von EGTA mit PMA aber ein klar verstärktes Vereinzeln der Zellen, was dafürspricht, dass noch weitere PMA-abhängige *Sites* existieren oder zumindest die Phosphorylierung von anderen desmosomalen Proteinen in Kombination mit der Phosphorylierung von S313/314 Einfluss auf den Zusammenhalt der Zellen nimmt. Es sollte aber berücksichtigt werden, dass der Glutamat-Rest nicht exakt einen Phosphatidylserin/-threonin-Rest imitiert, da beispielsweise, allein schon durch die unterschiedliche Größe, Bindungen zu Interaktionspartnern gestört sein können (Dephoure et al., 2013) und somit dadurch artifiziell die PKP3-Membranassoziation und die Zelladhäsion beeinträchtigt werden könnte. Nichtsdestotrotz liefert die Glutamat-Mutante zusammen mit der Alanin-Mutante starke Hinweise auf die essentielle Bedeutung der S313/314-*Site* für die Membranassoziation von PKP3 und damit einhergehend für die PKC δ -abhängige Regulation des Desmosoms und der Zell-Zell-Adhäsion. Zusammengenommen ist dies ein weiteres, starkes Indiz dafür, dass die Phosphorylierung von S313/314 die PKP3-Membranlokalisierung verringert und in Kombination mit weiteren PKC-abhängigen Motiven (ggf. auch in anderen desmosomalen Proteinen) die Adhäsion und womöglich auch die Hyperadhäsion deutlich abschwächt.

Zusammenfassend ergibt sich folgende Hypothese:

Neben der klassischen PKC α ist auch die *novel* PKC δ bedeutend für die Regulation der Desmosomen. Über die Aktivierung der PKC δ wird PKP3 am Motiv S313/314 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu geschwächter PKP3-Membranlokalisierung, vor allem an den trizellulären Zellkontakten. Die Zellkontakte sind dann anfälliger für den Entzug von Calcium (EGTA) und damit einhergehend weniger adhäsiv. Entsprechend ist es denkbar, dass PKC δ hierüber an der Aufhebung von Hyperadhäsion beteiligt ist, so wie auch PKC α über DSP-Phosphorylierung (Stappenbeck et al., 1994; Hobbs und Green, 2012). PKC δ könnte daher ebenfalls eine Rolle bei Mechanismen wie beispielsweise der Wundheilung spielen. Da S313/314 oft auch ohne Stimulation phosphoryliert gefunden wurde, könnte diese *Site* ein Grund für die dynamischen, eher Zell-Zell-Kontakt-Stabilität-verringernenden Eigenschaften (Keil et al., 2016) von PKP3 sein. Unterdrückung dieser Phosphorylierung bzw. der PKC δ -Aktivität generell müsste entsprechend Hyperadhäsion begünstigen.

5. Literaturverzeichnis

- Adhikary, G., Y. C. Chew, E. A. Reece, R. L. Eckert (2010): PKC-delta and -eta, MEKK-1, MEK-6, MEK-3, and p38-delta are essential mediators of the response of normal human epidermal keratinocytes to differentiating agents. *The Journal of investigative dermatology* 130, 8/2010, S. 2017–2030.
- Aktary, Z., M. Alaei, M. Pasdar (2017): Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget* 8, 19/2017, S. 32270–32291.
- Aktary, Z., S. Kulak, J. Mackey, N. Jahroudi, M. Pasdar (2013): Plakoglobin interacts with the transcription factor p53 and regulates the expression of 14-3-3 σ . *Journal of cell science* 126, Pt 14/2013, S. 3031–3042.
- Albrecht, L. V., L. Zhang, J. Shabanowitz, E. Purevjav, J. A. Towbin, D. F. Hunt, K. J. Green (2015): GSK3- and PRMT-1-dependent modifications of desmoplakin control desmoplakin-cytoskeleton dynamics. *The Journal of cell biology* 208, 5/2015, S. 597–612.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, B. A. Hemmings (1996a): Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15, 23/1996, S. 6541–6551.
- Alessi, D. R., F. Barry Caudwell, M. Andjelkovic, B. A. Hemmings, P. Cohen (1996b): Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Letters* 399, 3/1996, S. 333–338.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, P. Cohen (1997): Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current Biology* 7, 4/1997, S. 261–269.
- Alexander, D. B., G. S. Goldberg (2003): Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Current medicinal chemistry* 10, 19/2003, S. 2045–2058.
- Alt, A., M. Ohba, L. Li, M. Gartsbein, A. Belanger, M. F. Denning, T. Kuroki, S. H. Yuspa, T. Tennenbaum (2001): Protein kinase C δ -mediated phosphorylation of α 6 β 4 is associated with reduced integrin localization to the hemidesmosome and decreased keratinocyte attachment. *Cancer research* 61, 11/2001, S. 4591–4598.
- Amar, L. S., -H. Shabana, M. Oboeuf, N. Martin, N. Forest (1998): Desmosomes are regulated by protein kinase C in primary rat epithelial cells. *Cell adhesion and communication* 5, 1/1998, S. 1–12.
- Anastassiadis, T., S. W. Deacon, K. Devarajan, H. Ma, J. R. Peterson (2011): Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology* 29, 11/2011, S. 1039–1045.
- Antoniades, L., A. Tsatsopoulou, A. Anastasakis, P. Syrris, A. Asimaki, D. Panagiotakos, C. Zambartas, C. Stefanadis, W. J. McKenna, N. Protonotarios (2006): Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by deletions in plakophilin-2 and plakoglobin (Naxos disease) in families from Greece and Cyprus: genotype-phenotype relations, diagnostic features and prognosis. *European heart journal* 27, 18/2006, S. 2208–2216.
- Anton-Lamprecht, I. (1984): Keratinisierung und Lipide. In: Hornstein, O. P., U. W. Schnyder, J. Schönfeld (Hrsg.): *Neue Entwicklungen in der Dermatologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 43–52.

- Armstrong, D. K., K. E. McKenna, P. E. Purkis, K. J. Green, R. A. Eady, I. M. Leigh, A. E. Hughes (1999): Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. *Human molecular genetics* 8, 1/1999, S. 143–148.
- Balda, M. S., K. Matter (2008): Tight junctions at a glance. *Journal of cell science* 121, Pt 22/2008, S. 3677–3682.
- Bass-Zubek, A. E., R. P. Hobbs, E. V. Amargo, N. J. Garcia, S. N. Hsieh, X. Chen, J. K. Wahl, M. F. Denning, K. J. Green (2008): Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *The Journal of cell biology* 181, 4/2008, S. 605–613.
- Basu, A. (2019): The Enigmatic Protein Kinase C-eta. *Cancers* 11, 2/2019.
- Beeson, M., M. P. Sajan, M. Dizon, D. Grebenev, J. Gomez-Daspert, A. Miura, Y. Kanoh, J. Powe, G. Bandyopadhyay, M. L. Standaert, R. V. Farese (2003): Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)3 is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes* 52, 8/2003, S. 1926–1934.
- Bellacosa, A., T. F. Franke, M. E. Gonzalez-Portal, K. Datta, T. Taguchi, J. Gardner, J. Q. Cheng, J. R. Testa, P. N. Tsichlis (1993): Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* 8, 3/1993, S. 745–754.
- Berrier, A. L., A. M. Mastrangelo, J. Downward, M. Ginsberg, S. E. LaFlamme (2000): Activated R-ras, Rac1, PI 3-kinase and PKCepsilon can each restore cell spreading inhibited by isolated integrin beta1 cytoplasmic domains. *The Journal of cell biology* 151, 7/2000, S. 1549–1560.
- Berry, N., Y. Nishizuka (1990): Protein kinase C and T cell activation. *European journal of biochemistry* 189, 2/1990, S. 205–214.
- Bessa, C., J. Soares, L. Raimundo, J. B. Loureiro, C. Gomes, F. Reis, M. L. Soares, D. Santos, C. Dureja, S. R. Chaudhuri, C. Lopez-Haber, M. G. Kazanietz, J. Gonçalves, M. F. Simões, P. Rijo, L. Saraiva (2018): Discovery of a small-molecule protein kinase Cδ-selective activator with promising application in colon cancer therapy. *Cell death & disease* 9, 2/2018, S. 23.
- Bierkamp, C., K. J. McLaughlin, H. Schwarz, O. Huber, R. Kemler (1996): Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Developmental biology* 180, 2/1996, S. 780–785.
- Black, A. R., J. D. Black (2013): Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Frontiers in Immunology* 3, 2013.
- Bonné, S., B. Gilbert, M. Hatzfeld, X. Chen, K. J. Green, F. van Roy (2003): Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *The Journal of cell biology* 161, 2/2003, S. 403–416.
- Bornslaeger, E. A., L. M. Godsel, C. M. Corcoran, J. K. Park, M. Hatzfeld, A. P. Kowalczyk, K. J. Green (2001): Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *Journal of cell science* 114, Pt 4/2001, S. 727–738.
- Bradley, D., P. Beltrao (2019): Evolution of protein kinase substrate recognition at the active site. *PLoS biology* 17, 6/2019, e3000341.
- Bradley, R. S., P. Cowin, A. M. Brown (1993): Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. *The Journal of cell biology* 123, 6 Pt 2/1993, S. 1857–1865.
- Brandner, J. M., M. Haftek, C. M. Niessen (2010): Adherens Junctions, Desmosomes and Tight Junctions in Epidermal Barrier Function. *The Open Dermatology Journal* 4, 1/2010, S. 14–20.
- Breuninger, S., S. Reidenbach, C. G. Sauer, P. Ströbel, J. Pfitzenmaier, L. Trojan, I. Hofmann (2010): Desmosomal plakophilins in the prostate and prostatic adenocarcinomas: implications for diagnosis and tumor progression. *The American journal of pathology* 176, 5/2010, S. 2509–2519.

- Brown, L., A. Waseem, I. N. Cruz, J. Szary, E. Gunic, T. Mannan, M. Unadkat, M. Yang, F. Valderrama, E. A. O'Toole, H. Wan (2014): Desmoglein 3 promotes cancer cell migration and invasion by regulating activator protein 1 and protein kinase C-dependent-Ezrin activation. *Oncogene* 33, 18/2014, S. 2363–2374.
- Brown, T. M., K. Krishnamurthy (2021): StatPearls. Histology, Dermis, Treasure Island (FL).
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmund, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis, M. E. Greenberg (1999): Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* 96, 6/1999, S. 857–868.
- Cabodi, S., E. Calautti, C. Talora, T. Kuroki, P. L. Stein, G. Dotto (2000): A PKC- η /Fyn-Dependent Pathway Leading to Keratinocyte Growth Arrest and Differentiation. *Molecular Cell* 6, 5/2000, S. 1121–1129.
- Callender, J. A., A. C. Newton (2017): Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later. *Neuronal Signaling* 1, 2/2017.
- Cardell, M., A. Landsend, J. Eidet, T. Wieloch, T. Blackstad, O. Ottersen (1997): High resolution immunogold analysis reveals distinct subcellular compartmentation of protein kinase C γ and δ in rat Purkinje cells. *Neuroscience* 82, 3/1997, S. 709–725.
- Carpenter, G., S. Cohen (1990): Epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 265, 14/1990, S. 7709–7712.
- Carpenter, G., L. Goodman, L. Shaver (1986): The Physiology of Epidermal Growth Factor. In: Kahn, P., T. Graf (Hrsg.): *Oncogenes and Growth Control*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 65–69.
- Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, Y. Nishizuka (1982): Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry* 257, 13/1982, S. 7847–7851.
- Chalfant, C. E., S. Ohno, Y. Konno, A. A. Fisher, L. D. Bisnauth, J. E. Watson, D. R. Cooper (1996): A carboxy-terminal deletion mutant of protein kinase C beta II inhibits insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 10, 10/1996, S. 1273–1281.
- Chen, C.-L., H.-C. Chen (2009): Functional suppression of E-cadherin by protein kinase Cdelta. *Journal of cell science* 122, Pt 4/2009, S. 513–523.
- Chen, X., S. Bonne, M. Hatzfeld, F. van Roy, K. J. Green (2002): Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry* 277, 12/2002, S. 10512–10522.
- Chida, K., H. Sagara, Y. Suzuki, A. Murakami, S. Osada, S. Ohno, K. Hirose, T. Kuroki (1994): The eta isoform of protein kinase C is localized on rough endoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biology* 14, 6/1994, S. 3782–3790.
- Chidgey, M., C. Brakebusch, E. Gustafsson, A. Cruchley, C. Hail, S. Kirk, A. Merritt, A. North, C. Tselepis, J. Hewitt, C. Byrne, R. Fassler, D. Garrod (2001): Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *The Journal of cell biology* 155, 5/2001, S. 821–832.
- Chidgey, M., D. Garrod (2016): Desmosomal Cadherins. In: Suzuki, S. T., S. Hirano (Hrsg.): *The Cadherin Superfamily*. Springer Japan, Tokyo, S. 159–193.
- Choi, H. J., W. I. Weis (2005a): Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1.
- Choi, H.-J., J. C. Gross, S. Pokutta, W. I. Weis (2009): Interactions of plakoglobin and beta-catenin with desmosomal cadherins: basis of selective exclusion of alpha- and beta-catenin from desmosomes. *The Journal of biological chemistry* 284, 46/2009, S. 31776–31788.

- Choi, H.-J., S. Park-Snyder, L. T. Pascoe, K. J. Green, W. I. Weis (2002): Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure. *Nature structural biology* 9, 8/2002, S. 612–620.
- Choi, H.-J., W. I. Weis (2016): Purification and Structural Analysis of Desmoplakin. *Methods in enzymology* 569, 2016, S. 197–213.
- Choi, H.-J., W. I. Weis (2005b): Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *Journal of molecular biology* 346, 1/2005, S. 367–376.
- Churko, J. M., D. W. Laird (2013): Gap junction remodeling in skin repair following wounding and disease. *Physiology (Bethesda, Md.)* 28, 3/2013, S. 190–198.
- Cohen, S., D. Lee, B. Zhai, S. P. Gygi, A. L. Goldberg (2014): Trim32 reduces PI3K-Akt-FoxO signaling in muscle atrophy by promoting plakoglobin-PI3K dissociation. *The Journal of cell biology* 204, 5/2014, S. 747–758.
- Cone, A. C., G. Cavin, C. Ambrosi, H. Hakozaki, A. X. Wu-Zhang, M. T. Kunkel, A. C. Newton, G. E. Sosinsky (2014): Protein kinase C δ -mediated phosphorylation of Connexin43 gap junction channels causes movement within gap junctions followed by vesicle internalization and protein degradation. *The Journal of biological chemistry* 289, 13/2014, S. 8781–8798.
- Corbit, K. C., N. Trakul, E. M. Eves, B. Diaz, M. Marshall, M. R. Rosner (2003): Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *Journal of Biological Chemistry* 278, 15/2003, S. 13061–13068.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B. A. Hemmings (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 6559/1995, S. 785–789.
- Delva, E., D. K. Tucker, A. P. Kowalczyk (2009): The desmosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, 2/2009, a002543.
- Demirag, G. G., Y. Sullu, D. Gurgenyatagi, N. O. Okumus, I. Yucel (2011): Expression of plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in gastric cancers. *Diagnostic pathology* 6, 2011, S. 1.
- Demirag, G. G., Y. Sullu, I. Yucel (2012): Expression of Plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in breast cancers. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 29, 3/2012, S. 1518–1522.
- Den, Z., X. Cheng, M. Merched-Sauvage, P. J. Koch (2006): Desmocollin 3 is required for pre-implantation development of the mouse embryo. *Journal of cell science* 119, Pt 3/2006, S. 482–489.
- Denning, M. F. (2010): Protein kinase C/mitogen-activated protein kinase signaling in keratinocyte differentiation control. *The Journal of investigative dermatology* 130, 8/2010, S. 1968–1970.
- Denning, M. F., A. A. Dlugosz, M. K. Howett, S. H. Yuspa (1993): Expression of an oncogenic rasHa gene in murine keratinocytes induces tyrosine phosphorylation and reduced activity of protein kinase C delta. *Journal of Biological Chemistry* 268, 35/1993, S. 26079–26081.
- Denning, M. F., A. A. Dlugosz, D. W. Threadgill, T. Magnuson, S. H. Yuspa (1996): Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *Journal of Biological Chemistry* 271, 10/1996, S. 5325–5331.
- Denning, M. F., A. A. Dlugosz, E. K. Williams, Z. Szallasi, P. M. Blumberg, S. H. Yuspa (1995): Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 6, 2/1995, S. 149–157.
- Denning, M. F., S. G. Guy, S. M. Ellerbroek, S. M. Norvell, A. P. Kowalczyk, K. J. Green (1998): The expression of desmoglein isoforms in cultured human keratinocytes is regulated by calcium, serum, and protein kinase C. *Experimental cell research* 239, 1/1998, S. 50–59.

- Denning, M. F., Y. Wang, S. Tibudan, S. Alkan, B. J. Nickoloff, J.-Z. Qin (2002): Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell death and differentiation* 9, 1/2002, S. 40–52.
- Dephoure, N., K. L. Gould, S. P. Gygi, D. R. Kellogg (2013): Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. *Molecular biology of the cell* 24, 5/2013, S. 535–542.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath, W. Kolch (2007): MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 22/2007, S. 3279–3290.
- Diegel, K. L., D. M. Danilenko, Z. W. Wojcinski (2018): The Integumentary System. In: *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. Elsevier, S. 791–822.
- Dietrich, C., N. Gumpert, I. Heit, M. Borchert-Stuhlträger, F. Oesch, R. Wieser (2001): Rottlerin induces a transformed phenotype in human keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 282, 2/2001, S. 575–579.
- Dubash, A. D., K. J. Green (2011): Desmosomes. *Current biology* : CB 21, 14/2011, R529-31.
- Eckert, J. J., A. McCallum, A. Mears, M. G. Rumsby, I. T. Cameron, T. P. Fleming (2004): PKC signalling regulates tight junction membrane assembly in the pre-implantation mouse embryo. *Reproduction (Cambridge, England)* 127, 6/2004, S. 653–667.
- Eckert, R. L., T. Efimova, S. R. Dashti, S. Balasubramanian, A. Deucher, J. F. Crish, M. Sturniolo, F. Bone (2002): Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings* 7, 1/2002, S. 36–40.
- Eckert, R. L., E. A. Rorke (1989): Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environmental health perspectives* 80, 1989, S. 109–116.
- Edmondson, S. R., S. P. Thumiger, G. A. Werther, C. J. Wraight (2003): Epidermal homeostasis: the role of the growth hormone and insulin-like growth factor systems. *Endocrine reviews* 24, 6/2003, S. 737–764.
- Eshkind, L., Q. Tian, A. Schmidt, W. W. Franke, R. Windoffer, R. E. Leube (2002): Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *European journal of cell biology* 81, 11/2002, S. 592–598.
- Evenou, J.-P., J. Wagner, G. Zenke, V. Brinkmann, K. Wagner, J. Kovarik, K. A. Welzenbach, G. Weitz-Schmidt, C. Guntermann, H. Towbin, S. Cottens, S. Kaminski, T. Letschka, C. Lutz-Nicoladoni, T. Gruber, N. Hermann-Kleiter, N. Thuille, G. Baier (2009): The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 330, 3/2009, S. 792–801.
- Fallen, C.F. 1823. *Diptera sveciae*. *Geomyzides*
- Franke, T. F. (2008): PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, 50/2008, S. 6473–6488.
- Franke, W. W., H. Mueller, S. Mittnacht, H. P. Kapprell, J. L. Jorcano (1983): Significance of two desmosome plaque-associated polypeptides of molecular weights 75 000 and 83 000. *The EMBO journal* 2, 12/1983, S. 2211–2215.
- Franzen, C. A., V. Todorović, B. V. Desai, S. Mirzoeva, X. J. Yang, K. J. Green, J. C. Pelling (2012): The desmosomal armadillo protein plakoglobin regulates prostate cancer cell adhesion and motility through vitronectin-dependent Src signaling. *PLoS one* 7, 7/2012, e42132.
- Freeley, M., D. Kelleher, A. Long (2011): Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cellular signalling* 23, 5/2011, S. 753–762.

- Freeley, M., A. Long (2012): Regulating the Regulator: Phosphorylation of PKC θ in T Cells. *Frontiers in Immunology* 3, 2012, S. 227.
- Fresno Vara, J. A., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta, M. González-Barón (2004): PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews* 30, 2/2004, S. 193–204.
- Fu, H., R. R. Subramanian, S. C. Masters (2000): 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40, 2000, S. 617–647.
- Fuchs, E., S. Raghavan (2002): Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature reviews. Genetics* 3, 3/2002, S. 199–209.
- Fuchs, M., M. Foresti, M. Y. Radeva, D. Kugelmann, R. Keil, M. Hatzfeld, V. Spindler, J. Waschke, F. Vielmuth (2019): Plakophilin 1 but not plakophilin 3 regulates desmoglein clustering. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76, 17/2019, S. 3465–3476.
- Fukunaga, M., M. Oka, M. Ichihashi, T. Yamamoto, H. Matsuzaki, U. Kikkawa (2001): UV-induced tyrosine phosphorylation of PKC delta and promotion of apoptosis in the HaCaT cell line. *Biochemical and biophysical research communications* 289, 2/2001, S. 573–579.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, S. Tsukita (2002): Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of cell biology* 156, 6/2002, S. 1099–1111.
- Furuse, M., S. Tsukita (2006): Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in cell biology* 16, 4/2006, S. 181–188.
- Gallicano, G. I., C. Bauer, E. Fuchs (2001): Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature. *Development (Cambridge, England)* 128, 6/2001, S. 929–941.
- Gallicano, G. I., P. Kouklis, C. Bauer, M. Yin, V. Vasioukhin, L. Degenstein, E. Fuchs (1998): Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *The Journal of cell biology* 143, 7/1998, S. 2009–2022.
- Gandjbakhch, E., P. Charron, V. Fressart, G. La Lorin de Grandmaison, F. Simon, F. Gary, A. Vite, B. Hainque, F. Hidden-Lucet, M. Komajda, E. Villard (2011): Plakophilin 2A is the dominant isoform in human heart tissue: consequences for the genetic screening of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart (British Cardiac Society)* 97, 10/2011, S. 844–849.
- Garg, R., L. G. Benedetti, M. B. Abera, H. Wang, M. Abba, M. G. Kazanietz (2014): Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene* 33, 45/2014, S. 5225–5237.
- Garrod, D., L. Taberner (2014): Hyper-adhesion: a unique property of desmosomes. *Cell communication & adhesion* 21, 5/2014, S. 249–256.
- Garrod, D. R., M. Y. Berika, W. F. Bardsley, D. Holmes, L. Taberner (2005): Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *Journal of cell science* 118, Pt 24/2005, S. 5743–5754.
- Gaudry, C. A., H. L. Palka, R. L. Dusek, A. C. Huen, M. J. Khandekar, L. G. Hudson, K. J. Green (2001): Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 27/2001, S. 24871–24880.
- Gekeler, V., R. Boer, F. Uberall, W. Ise, C. Schubert, I. Utz, J. Hofmann, K. H. Sanders, C. Schächtele, K. Klemm, H. Grunicke (1996): Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *British journal of cancer* 74, 6/1996, S. 897–905.
- Geraldes, P., G. L. King (2010): Activation of Protein Kinase C Isoforms & Its Impact on Diabetic Complications. *Circulation research* 106, 8/2010, S. 1319–1331.

- Getsios, S., C. L. Simpson, S. Kojima, R. Harmon, L. J. Sheu, R. L. Dusek, M. Cornwell, K. J. Green (2009): Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *The Journal of cell biology* 185, 7/2009, S. 1243–1258.
- Godsel, L. M., S. N. Hsieh, E. V. Amargo, A. E. Bass, L. T. Pascoe-McGillicuddy, A. C. Huen, M. E. Thorne, C. A. Gaudry, J. K. Park, K. Myung, R. D. Goldman, T.-L. Chew, K. J. Green (2005): Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *The Journal of cell biology* 171, 6/2005, S. 1045–1059.
- Green, K. J., D. A. Parry, P. M. Steinert, M. L. Virata, R. M. Wagner, B. D. Angst, L. A. Nilles (1990): Structure of the human desmoplakins. Implications for function in the desmosomal plaque. *Journal of Biological Chemistry* 265, 5/1990, S. 2603–2612.
- Grossmann, K. S., C. Grund, J. Huelsken, M. Behrend, B. Erdmann, W. W. Franke, W. Birchmeier (2004): Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *The Journal of cell biology* 167, 1/2004, S. 149–160.
- Gschwendt, M., H. J. Müller, K. Kielbassa, R. Zang, W. Kittstein, G. Rincke, F. Marks (1994): Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* 199, 1/1994, S. 93–98.
- Guo, Y.-J., W.-W. Pan, S.-B. Liu, Z.-F. Shen, Y. Xu, L.-L. Hu (2020): ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and therapeutic medicine* 19, 3/2020, S. 1997–2007.
- Hamada, T., A. P. South, Y. Mitsuhashi, T. Kinebuchi, O. Bleck, G. H. S. Ashton, Y. Hozumi, T. Suzuki, T. Hashimoto, R. A. J. Eady, J. A. McGrath (2002): Genotype-phenotype correlation in skin fragility-ectodermal dysplasia syndrome resulting from mutations in plakophilin 1. *Experimental dermatology* 11, 2/2002, S. 107–114.
- Hamilton, M., J. Liao, M. K. Cathcart, A. Wolfman (2001): Constitutive association of c-N-Ras with c-Raf-1 and protein kinase C epsilon in latent signaling modules. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31/2001, S. 29079–29090.
- Hannus, M., M. Beitzinger, J. C. Engelmann, M.-T. Weickert, R. Spang, S. Hannus, G. Meister (2014): siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects. *Nucleic acids research* 42, 12/2014, S. 8049–8061.
- Harris, T. J. C., U. Tepass (2010): Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 7/2010, S. 502–514.
- Harrison, O. J., J. Brasch, G. Lasso, P. S. Katsamba, G. Ahlsen, B. Honig, L. Shapiro (2016): Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 26/2016, S. 7160–7165.
- Hatzfeld, M. (2007): Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1/2007, S. 69–77.
- Hatzfeld, M. (2005): The p120 family of cell adhesion molecules. *European journal of cell biology* 84, 2-3/2005, S. 205–214.
- Hatzfeld, M., C. Haffner, K. Schulze, U. Venzens (2000): The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *The Journal of cell biology* 149, 1/2000, S. 209–222.
- Hatzfeld, M., R. Keil, T. M. Magin (2017): Desmosomes and Intermediate Filaments: Their Consequences for Tissue Mechanics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9, 6/2017.
- Hatzfeld, M., A. Wolf, R. Keil (2014): Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. *Cell communication & adhesion* 21, 1/2014, S. 25–42.
- Hegland, D. D., D. M. Sullivan, I. I. Rovira, A. Li, I. Kovesdi, J. T. Bruder, T. Finkel (1999): Regulation of endothelial cell adherens junctions by a Ras-dependent signal transduction pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 260, 2/1999, S. 371–376.

- Heit, I., R. J. Wieser, T. Herget, D. Faust, M. Borchert-Stuhlträger, F. Oesch, C. Dietrich (2001): Involvement of protein kinase Cdelta in contact-dependent inhibition of growth in human and murine fibroblasts. *Oncogene* 20, 37/2001, S. 5143–5154.
- Helfrich, I., A. Schmitz, P. Zigrino, C. Michels, I. Haase, A. Le Bivic, M. Leitges, C. M. Niessen (2007): Role of aPKC isoforms and their binding partners Par3 and Par6 in epidermal barrier formation. *The Journal of investigative dermatology* 127, 4/2007, S. 782–791.
- Hessabi, T. (2005): Über die Rolle von PKC epsilon während der Wundheilung. Hannover : Universität.
- Higashi, T., A. L. Miller (2017): Tricellular junctions: how to build junctions at the TRICKiest points of epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 28, 15/2017, S. 2023–2034.
- Hirabayashi, N., B. S. Warren, X. J. Wang, S. Petersen-Marht, L. Beltran, M. M. Davis, C. L. Ashendel, J. DiGiovanni (1990): Partial characterization of epidermal protein kinase C in mice sensitive or resistant to phorbol ester. *Molecular carcinogenesis* 3, 3/1990, S. 171–180.
- Hobbs, R. P., K. J. Green (2012): Desmoplakin regulates desmosome hyperadhesion. *The Journal of investigative dermatology* 132, 2/2012, S. 482–485.
- Hofmann, I., M. Casella, M. Schnölzer, T. Schlechter, H. Spring, W. W. Franke (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, 3/2006, S. 1388–1398.
- Hofmann, I., C. Mertens, M. Brettel, V. Nimrich, M. Schnölzer, H. Herrmann (2000): Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *Journal of cell science* 113 (Pt 13), 2000, S. 2471–2483.
- Hogan, C., N. Serpente, P. Cogram, C. R. Hosking, C. U. Bialucha, S. M. Feller, V. M. M. Braga, W. Birchmeier, Y. Fujita (2004): Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Molecular and Cellular Biology* 24, 15/2004, S. 6690–6700.
- Hsu, A. H., M. A. Lum, K.-S. Shim, P. J. Frederick, C. D. Morrison, B. Chen, S. M. Lele, Y. M. Sheinin, T. Daikoku, S. K. Dey, G. Leone, A. R. Black, J. D. Black (2018): Crosstalk between PKC α and PI3K/AKT Signaling Is Tumor Suppressive in the Endometrium. *Cell reports* 24, 3/2018, S. 655–669.
- Hurley, J. H. (2006): Membrane binding domains. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 8/2006, S. 805–811.
- Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu, K.-L. Guan (2002): TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4, 9/2002, S. 648–657.
- Inoue, M., A. Kishimoto, Y. Takai, Y. Nishizuka (1977): Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 252, 21/1977, S. 7610–7616.
- Ivaska, J., K. Vuoriluoto, T. Huovinen, I. Izawa, M. Inagaki, P. J. Parker (2005): PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *The EMBO journal* 24, 22/2005, S. 3834–3845.
- Jansen, A. P., N. E. Dreckschmidt, E. G. Verwiebe, D. L. Wheeler, T. D. Oberley, A. K. Verma (2001): Relation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase and hyperplasia to the different skin tumor-promotion susceptibilities of protein kinase C alpha, -delta and -epsilon transgenic mice. *International journal of cancer* 93, 5/2001, S. 635–643.
- Jonkman, M. F., A. M. G. Pasmooij, S. G. M. A. Pasmans, M. P. van den Berg, H. J. ter Horst, A. Timmer, H. H. Pas (2005): Loss of desmoplakin tail causes lethal acantholytic epidermolysis bullosa. *American journal of human genetics* 77, 4/2005, S. 653–660.

- Joseloff, E., C. Cataisson, H. Aamodt, H. Ocheni, P. Blumberg, A. J. Kraker, S. H. Yuspa (2002): Src family kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic phenotype of skin keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14/2002, S. 12318–12323.
- Kadamur, G., E. M. Ross (2013): Mammalian phospholipase C. *Annual review of physiology* 75, 2013, S. 127–154.
- Kami, K., M. Chidgey, T. Dafforn, M. Overduin (2009): The desmoglein-specific cytoplasmic region is intrinsically disordered in solution and interacts with multiple desmosomal protein partners. *Journal of molecular biology* 386, 2/2009, S. 531–543.
- Kang, J.-H. (2014): Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New Journal of Science* 2014, 2014, S. 1–36.
- Kang, J.-H., R. Toita, C. W. Kim, Y. Katayama (2012): Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. *Biotechnology advances* 30, 6/2012, S. 1662–1672.
- Kashiwagi, M., M. Ohba, K. Chida, T. Kuroki (2002): Protein kinase C eta (PKC eta): its involvement in keratinocyte differentiation. *Journal of biochemistry* 132, 6/2002, S. 853–857.
- Kashiwagi, M., M. Ohba, H. Watanabe, K. Ishino, K. Kasahara, Y. Sanai, Y. Taya, T. Kuroki (2000): PKCeta associates with cyclin E/cdk2/p21 complex, phosphorylates p21 and inhibits cdk2 kinase in keratinocytes. *Oncogene* 19, 54/2000, S. 6334–6341.
- Keil, R., K. Rietscher, M. Hatzfeld (2016): Antagonistic Regulation of Intercellular Cohesion by Plakophilins 1 and 3. *The Journal of investigative dermatology* 136, 10/2016, S. 2022–2029.
- Keshet, Y., R. Seger (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 661, 2010, S. 3–38.
- Khamaisi, M., S. Katagiri, H. Keenan, K. Park, Y. Maeda, Q. Li, W. Qi, T. Thomou, D. Eschuk, A. Tellechea, A. Veves, C. Huang, D. P. Orgill, A. Wagers, G. L. King (2016): PKC δ inhibition normalizes the wound-healing capacity of diabetic human fibroblasts. *The Journal of clinical investigation* 126, 3/2016, S. 837–853.
- Kimura, T. E., A. J. Merritt, D. R. Garrod (2007): Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *The Journal of investigative dermatology* 127, 4/2007, S. 775–781.
- Kirchner, F., A. Schuetz, L.-H. Boldt, K. Martens, G. Dittmar, W. Haverkamp, L. Thierfelder, U. Heinemann, B. Gerull (2012): Molecular insights into arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 missense mutations. *Circulation. Cardiovascular genetics* 5, 4/2012, S. 400–411.
- Kishimoto, A., K. Mikawa, K. Hashimoto, I. Yasuda, S. Tanaka, M. Tominaga, T. Kuroda, Y. Nishizuka (1989): Limited Proteolysis of Protein Kinase C Subspecies by Calcium-dependent Neutral Protease (Calpain). *Journal of Biological Chemistry* 264, 7/1989, S. 4088–4092.
- Kljuic, A., H. Bazzi, J. P. Sundberg, A. Martinez-Mir, R. O'Shaughnessy, M. G. Mahoney, M. Levy, X. Montagutelli, W. Ahmad, V. M. Aita, D. Gordon, J. Uitto, D. Whiting, J. Ott, S. Fischer, T. Gilliam, C. A. Jahoda, R. J. Morris, A. A. Panteleyev, V. T. Nguyen, A. M. Christiano (2003): Desmoglein 4 in Hair Follicle Differentiation and Epidermal Adhesion. *Cell* 113, 2/2003, S. 249–260.
- Knudsen, K. A., M. J. Wheelock (1992): Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from beta-catenin, interacts with E-cadherin and N-cadherin. *The Journal of cell biology* 118, 3/1992, S. 671–679.
- Koch, P. J., M. G. Mahoney, H. Ishikawa, L. Pulkkinen, J. Uitto, L. Shultz, G. F. Murphy, D. Whitaker-Menezes, J. R. Stanley (1997): Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *The Journal of cell biology* 137, 5/1997, S. 1091–1102.

- Koizumi, J., T. Kojima, N. Ogasawara, R. Kamekura, M. Kurose, M. Go, A. Harimaya, M. Murata, M. Osanai, H. Chiba, T. Himi, N. Sawada (2008): Protein kinase C enhances tight junction barrier function of human nasal epithelial cells in primary culture by transcriptional regulation. *Molecular pharmacology* 74, 2/2008, S. 432–442.
- Koretzky, G. A., M. Wahi, M. E. Newton, A. Weiss (1989): Heterogeneity of protein kinase C isoenzyme gene expression in human T cell lines. Protein kinase C-beta is not required for several T cell functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 143, 5/1989, S. 1692–1695.
- Kouklis, P. D., E. Hutton, E. Fuchs (1994): Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *The Journal of cell biology* 127, 4/1994, S. 1049–1060.
- Kowalczyk, A. P., E. A. Bornslaeger, J. E. Borgwardt, H. L. Palka, A. S. Dhaliwal, C. M. Corcoran, M. F. Denning, K. J. Green (1997): The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *The Journal of cell biology* 139, 3/1997, S. 773–784.
- Kowalczyk, A. P., K. J. Green (2013): Structure, function, and regulation of desmosomes. *Progress in molecular biology and translational science* 116, 2013, S. 95–118.
- Kowalczyk, A. P., M. Hatzfeld, E. A. Bornslaeger, D. S. Kopp, J. E. Borgwardt, C. M. Corcoran, A. Settler, K. J. Green (1999): The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *Journal of Biological Chemistry* 274, 26/1999, S. 18145–18148.
- Kröger, C., F. Loschke, N. Schwarz, R. Windoffer, R. E. Leube, T. M. Magin (2013): Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α -mediated desmoplakin phosphorylation. *The Journal of cell biology* 201, 5/2013, S. 681–692.
- Kundu, S. T., P. Gosavi, N. Khapare, R. Patel, A. S. Hosing, G. B. Maru, A. Ingle, J. A. Decaprio, S. N. Dalal (2008): Plakophilin3 downregulation leads to a decrease in cell adhesion and promotes metastasis. *International journal of cancer* 123, 10/2008, S. 2303–2314.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 5259/1970, S. 680–685.
- Lai Cheong, J. E., V. Wessagowit, J. A. McGrath (2005): Molecular abnormalities of the desmosomal protein desmoplakin in human disease. *Clinical and experimental dermatology* 30, 3/2005, S. 261–266.
- Lawrence, D. A. (1996): Transforming growth factor-beta: a general review. *European cytokine network* 7, 3/1996, S. 363–374.
- Lee, Y. S., S. H. Yuspa, A. A. Dlugosz (1998): Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C signaling pathway. *The Journal of investigative dermatology* 111, 5/1998, S. 762–766.
- Leontieva, O. V., J. D. Black (2004): Identification of two distinct pathways of protein kinase Calpha down-regulation in intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 7/2004, S. 5788–5801.
- Lewis, J. E., J. K. Wahl, K. M. Sass, P. J. Jensen, K. R. Johnson, M. J. Wheelock (1997): Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *The Journal of cell biology* 136, 4/1997, S. 919–934.
- Li, W., H. Mischak, J. C. Yu, L. M. Wang, J. F. Mushinski, M. A. Heidaran, J. H. Pierce (1994): Tyrosine phosphorylation of protein kinase C-delta in response to its activation. *Journal of Biological Chemistry* 269, 4/1994, S. 2349–2352.

- Li, W., C. Nadelman, N. S. Gratch, W. Li, M. Chen, N. Kasahara, D. T. Woodley (2002): An important role for protein kinase C-delta in human keratinocyte migration on dermal collagen. *Experimental cell research* 273, 2/2002, S. 219–228.
- Li, Y., D. L. Wheeler, W. Alters, L. Chaiswing, A. K. Verma, T. D. Oberley (2005): Early epidermal destruction with subsequent epidermal hyperplasia is a unique feature of the papilloma-independent squamous cell carcinoma phenotype in PKCepsilon overexpressing transgenic mice. *Toxicologic pathology* 33, 6/2005, S. 684–694.
- Liu, Y., N. V. Belkina, C. Graham, S. Shaw (2006): Independence of protein kinase C-delta activity from activation loop phosphorylation: structural basis and altered functions in cells. *Journal of Biological Chemistry* 281, 17/2006, S. 12102–12111.
- Lopez-Ojeda, W., A. Pandey, M. Alhaji, A. M. Oakley (2021): StatPearls. *Anatomy, Skin (Integument)*, Treasure Island (FL).
- Lorch, J. H., J. Klessner, J. K. Park, S. Getsios, Y. L. Wu, M. S. Stack, K. J. Green (2004): Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 35/2004, S. 37191–37200.
- Loschke, F., M. Homberg, T. M. Magin (2016): Keratin Isotypes Control Desmosome Stability and Dynamics through PKC α . *The Journal of investigative dermatology* 136, 1/2016, S. 202–213.
- Lu, Y., M. Muller, D. Smith, B. Dutta, K. Komurov, S. Iadevaia, D. Ruths, J. T. Tseng, S. Yu, Q. Yu, L. Nakhleh, G. Balazsi, J. Donnelly, M. Schurdak, S. Morgan-Lappe, S. Fesik, P. T. Ram, G. B. Mills (2011): Kinome siRNA-phosphoproteomic screen identifies networks regulating AKT signaling. *Oncogene* 30, 45/2011, S. 4567–4577.
- Lu, Z., D. Liu, A. Hornia, W. Devonish, M. Pagano, D. A. Foster (1998): Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Molecular and Cellular Biology* 18, 2/1998, S. 839–845.
- Manning, B. D., L. C. Cantley (2007): AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 7/2007, S. 1261–1274.
- Manning, B. D., A. Toker (2017): AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 3/2017, S. 381–405.
- Margolis, B., E. Y. Skolnik (1994): Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 5, 6/1994, S. 1288–1299.
- Martiny-Baron, G., M. G. Kazanietz, H. Mischak, P. M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marmé, C. Schächtele (1993): Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *Journal of Biological Chemistry* 268, 13/1993, S. 9194–9197.
- Mathur, M., L. Goodwin, P. Cowin (1994): Interactions of the cytoplasmic domain of the desmosomal cadherin Dsg1 with plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 269, 19/1994, S. 14075–14080.
- Matsui, M. S., S. L. Chew, V. A. DeLeo (1992): Protein kinase C in normal human epidermal keratinocytes during proliferation and calcium-induced differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 99, 5/1992, S. 565–571.
- Maynard, R. L., N. Downes (2019): The Skin or the Integument. In: *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*. Elsevier, S. 303–315.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. T. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. M. Martelli, R. A. Franklin (2007): Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 8/2007, S. 1263–1284.

- McGrath, J. A., J. R. McMillan, C. S. Shemanko, S. K. Runswick, I. M. Leigh, E. B. Lane, D. R. Garrod, R. A. Eady (1997): Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nature genetics* 17, 2/1997, S. 240–244.
- McMillan, J. R., M. Haftek, M. Akiyama, A. P. South, H. Perrot, J. A. McGrath, R. A. J. Eady, H. Shimizu (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. *The Journal of investigative dermatology* 121, 1/2003, S. 96–103.
- Meigel, W. N., S. Gay, L. Weber (1977): Dermal architecture and collagen type distribution. *Archives for dermatological research = Archiv fur dermatologische Forschung* 259, 1/1977, S. 1–10.
- Mendoza, M. C., E. E. Er, J. Blenis (2011): The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences* 36, 6/2011, S. 320–328.
- Meng, J. J., E. A. Bornslaeger, K. J. Green, P. M. Steinert, W. Ip (1997): Two-hybrid analysis reveals fundamental differences in direct interactions between desmoplakin and cell type-specific intermediate filaments. *Journal of Biological Chemistry* 272, 34/1997, S. 21495–21503.
- Mertens, C., I. Hofmann, Z. Wang, M. Teichmann, S. Sepehri Chong, M. Schnölzer, W. W. Franke (2001): Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14/2001, S. 7795–7800.
- Mertens, C., C. Kuhn, W. W. Franke (1996): Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *The Journal of cell biology* 135, 4/1996, S. 1009–1025.
- Michie, A. M., R. Nakagawa (2005): The link between PKC α regulation and cellular transformation. *Immunology letters* 96, 2/2005, S. 155–162.
- Miyazaki, K., K. Yoshizaki, C. Arai, A. Yamada, K. Saito, M. Ishikawa, H. Xue, K. Funada, N. Haruyama, Y. Yamada, S. Fukumoto, I. Takahashi (2016): Plakophilin-1, a Novel Wnt Signaling Regulator, Is Critical for Tooth Development and Ameloblast Differentiation. *PloS one* 11, 3/2016, e0152206.
- Morrison, D. K. (2012): MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, 11/2012.
- Motley, E. D., K. Eguchi, C. Gardner, A. L. Hicks, C. M. Reynolds, G. D. Frank, M. Mifune, M. Ohba, S. Eguchi (2003): Insulin-induced Akt activation is inhibited by angiotensin II in the vasculature through protein kinase C- α . *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 41, 3 Pt 2/2003, S. 775–780.
- Motley, E. D., S. M. Kabir, K. Eguchi, A. L. Hicks, C. D. Gardner, C. M. Reynolds, G. D. Frank, S. Eguchi (2001): Protein kinase C inhibits insulin-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 47, 6/2001, S. 1059–1062.
- Müller, J., D. A. Ritt, T. D. Copeland, D. K. Morrison (2003): Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *The EMBO journal* 22, 17/2003, S. 4431–4442.
- Müller, L., K. Rietscher, R. Keil, M. Neuholz, M. Hatzfeld (2020): Plakophilin 3 phosphorylation by ribosomal S6 kinases supports desmosome assembly. *Journal of cell science* 133, 8/2020.
- Neuber, S., S. Jäger, M. Meyer, V. Wischmann, P. J. Koch, R. Moll, A. Schmidt (2015): c-Src mediated tyrosine phosphorylation of plakophilin 3 as a new mechanism to control desmosome composition in cells exposed to oxidative stress. *Cell and tissue research* 359, 3/2015, S. 799–816.
- Neuber, S., M. Mühmer, D. Wratten, P. J. Koch, R. Moll, A. Schmidt (2010): The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family. *Dermatology research and practice* 2010, 2010, S. 101452.
- Newton, A. C. (2010): Protein kinase C: poised to signal. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298, 3/2010, E395-402.

- Nie, Z., A. Merritt, M. Rouhi-Parkouhi, L. Tabernero, D. Garrod (2011): Membrane-impermeable cross-linking provides evidence for homophilic, isoform-specific binding of desmosomal cadherins in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 3/2011, S. 2143–2154.
- Niger, C., C. Hebert, J. P. Stains (2010): Interaction of connexin43 and protein kinase C-delta during FGF2 signaling. *BMC biochemistry* 11, 2010, S. 14.
- Nishikawa, K., S. Yamamoto, H. Nagumo, R. Kato (1997): Activation of phorbol ester responsive form of protein kinase C zeta in association with Ca(2+)-induced differentiation of primary cultured mouse epidermal cells. *Japanese journal of pharmacology* 73, 2/1997, S. 171–174.
- Nishizuka, Y. (1988): The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 6184/1988, S. 661–665.
- Niu, C., D. H. Boschelli, L. N. Tumeay, N. Bhagirath, J. Subrath, J. Shim, Y. Wang, B. Wu, C. Eid, J. Lee, X. Yang, A. Brennan, D. Chaudhary (2009): First generation 5-vinyl-3-pyridinecarbonitrile PKCtheta inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 20/2009, S. 5829–5832.
- Norgett, E. E., S. J. Hatsell, L. Carvajal-Huerta, J. C. Cabezas, J. Common, P. E. Purkis, N. Whittock, I. M. Leigh, H. P. Stevens, D. P. Kelsell (2000): Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Human molecular genetics* 9, 18/2000, S. 2761–2766.
- O'Keefe, E. J., H. P. Erickson, V. Bennett (1989): Desmoplakin I and desmoplakin II. *Journal of Biological Chemistry* 264, 14/1989, S. 8310–8318.
- Osada, S., K. Mizuno, T. C. Saïdo, Y. Akita, K. Suzuki, T. Kuroki, S. Ohno (1990): A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *Journal of Biological Chemistry* 265, 36/1990, S. 22434–22440.
- Papp, H., G. Czifra, J. Lázár, M. Gönczi, L. Csernoch, L. Kovács, T. Bíró (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Experimental dermatology* 12, 6/2003, S. 811–824.
- Paramio, J. M., C. Segrelles, S. Ruiz, J. L. Jorcano (2001): Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Molecular and Cellular Biology* 21, 21/2001, S. 7449–7459.
- Parkinson, S. J., J. A. Le Good, R. D. H. Whelan, P. Whitehead, P. J. Parker (2004): Identification of PKCzeta1: an endogenous inhibitor of cell polarity. *The EMBO journal* 23, 1/2004, S. 77–88.
- Pasdar, M., Z. Li, V. Chlumecky (1995): Plakoglobin: kinetics of synthesis, phosphorylation, stability, and interactions with desmoglein and E-cadherin. *Cell motility and the cytoskeleton* 32, 4/1995, S. 258–272.
- Peifer, M., P. D. McCrea, K. J. Green, E. Wieschaus, B. M. Gumbiner (1992): The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *The Journal of cell biology* 118, 3/1992, S. 681–691.
- Piepenhagen, P. A., W. J. Nelson (1993): Defining E-cadherin-associated protein complexes in epithelial cells: plakoglobin, beta- and gamma-catenin are distinct components. *Journal of cell science* 104 (Pt 3), 1993, S. 751–762.
- Pitelka, D. R., B. N. Taggart, S. T. Hamamoto (1983): Effects of extracellular calcium depletion on membrane topography and occluding junctions of mammary epithelial cells in culture. *The Journal of cell biology* 96, 3/1983, S. 613–624.
- Porro, A. M., C. A. Seque, M. C. C. Ferreira, M. M. S. e. S. Enokihara (2019): Pemphigus vulgaris. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 94, 3/2019, S. 264–278.

- Qi, M., E. A. Elion (2005): MAP kinase pathways. *Journal of cell science* 118, Pt 16/2005, S. 3569–3572.
- Radice, G. L., M. C. Ferreira-Cornwell, S. D. Robinson, H. Rayburn, L. A. Chodosh, M. Takeichi, R. O. Hynes (1997): Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *The Journal of cell biology* 139, 4/1997, S. 1025–1032.
- Reyland, M. E. (2009): Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14, 2009, S. 2386–2399.
- Rietscher, K. (2018): Regulation of PKP1's function in intercellular adhesion, proliferation and barrier formation. *Universitäts- und Landesbibliothek Sachsen-Anhalt*.
- Rietscher, K., R. Keil, A. Jordan, M. Hatzfeld (2018): 14-3-3 proteins regulate desmosomal adhesion via plakophilins. *Journal of cell science* 131, 10/2018.
- Rietscher, K., A. Wolf, G. Hause, A. Rother, R. Keil, T. M. Magin, M. Glass, C. M. Niessen, M. Hatzfeld (2016): Growth Retardation, Loss of Desmosomal Adhesion, and Impaired Tight Junction Function Identify a Unique Role of Plakophilin 1 In Vivo. *The Journal of investigative dermatology* 136, 7/2016, S. 1471–1478.
- Rimpler, U. (2014): Funktionelle Charakterisierung von Desmocollin 2 während der Embryonalentwicklung und im adulten Herzen in der Maus. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- Ringvold, H. C., R. A. Khalil (2017): Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 78, 2017, S. 203–301.
- Robinson, P. J. (1992): Differential stimulation of protein kinase C activity by phorbol ester or calcium/phosphatidylserine in vitro and in intact synaptosomes. *Journal of Biological Chemistry* 267, 30/1992, S. 21637–21644.
- Roh, J. Y., J. R. Stanley (1995): Plakoglobin binding by human Dsg3 (pemphigus vulgaris antigen) in keratinocytes requires the cadherin-like intracytoplasmic segment. *The Journal of investigative dermatology* 104, 5/1995, S. 720–724.
- Rothen-Rutishauser, B., F. K. Riesen, A. Braun, M. Günthert, H. Wunderli-Allenspach (2002): Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *The Journal of membrane biology* 188, 2/2002, S. 151–162.
- Rueden, C. T., J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena, K. W. Eliceiri (2017): ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics* 18, 1/2017, S. 529.
- Sabio, G., R. J. Davis (2014): TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in immunology* 26, 3/2014, S. 237–245.
- Sacco, P. A., T. M. McGranahan, M. J. Wheelock, K. R. Johnson (1995): Identification of plakoglobin domains required for association with N-cadherin and alpha-catenin. *Journal of Biological Chemistry* 270, 34/1995, S. 20201–20206.
- Saito, N., Y. Shirai (2002): Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *Journal of biochemistry* 132, 5/2002, S. 683–687.
- Saitou, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda, S. Tsukita (1998): Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *The Journal of cell biology* 141, 2/1998, S. 397–408.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona

- (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 7/2012, S. 676–682.
- Schmidt, A., S. Jäger (2005): Plakophilins--hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *European journal of cell biology* 84, 2-3/2005, S. 189–204.
- Schmidt, A., L. Langbein, S. Prätzel, M. Rode, H. R. Rackwitz, W. W. Franke (1999): Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation; research in biological diversity* 64, 5/1999, S. 291–306.
- Schmidt, A., L. Langbein, M. Rode, S. Prätzel, R. Zimbelmann, W. W. Franke (1997): Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell and tissue research* 290, 3/1997, S. 481–499.
- Schönwasser, D. C., R. M. Marais, C. J. Marshall, P. J. Parker (1998): Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Molecular and Cellular Biology* 18, 2/1998, S. 790–798.
- Shafir, E., E. Ziv, H. Reuveni, M. Niv (2006): PROTEIN KINASE C INHIBITORS FOR PREVENTION OF INSULIN RESISTANCE AND TYPE 2 DIABETES. US20050694691P C07K14/47;A61K38/00;C07K7/06;C07K14/81;C12N15/09.
- Sharma, G. D., A. Kakazu, H. E. P. Bazan (2007): Protein kinase C alpha and epsilon differentially modulate hepatocyte growth factor-induced epithelial proliferation and migration. *Experimental eye research* 85, 2/2007, S. 289–297.
- Sharma, G. D., P. Ottino, N. G. Bazan, H. E. P. Bazan (2005): Epidermal and hepatocyte growth factors, but not keratinocyte growth factor, modulate protein kinase C α translocation to the plasma membrane through 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 280, 9/2005, S. 7917–7924.
- Sheridan, D. L., Y. Kong, S. A. Parker, K. N. Dalby, B. E. Turk (2008): Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *Journal of Biological Chemistry* 283, 28/2008, S. 19511–19520.
- Shibata, T., M. Gotoh, A. Ochiai, S. Hirohashi (1994): Association of plakoglobin with APC, a tumor suppressor gene product, and its regulation by tyrosine phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 203, 1/1994, S. 519–522.
- Singh, R., P. Lei, S. T. Andreadis (2009): PKC-delta binds to E-cadherin and mediates EGF-induced cell scattering. *Experimental cell research* 315, 17/2009, S. 2899–2913.
- Singh, R. K., S. Kumar, P. K. Gautam, M. S. Tomar, P. K. Verma, S. P. Singh, A. Acharya (2017a): Protein kinase C- α and the regulation of diverse cell responses. *Biomolecular concepts* 8, 3-4/2017, S. 143–153.
- Singh, R. M., E. Cummings, C. Pantos, J. Singh (2017b): Protein kinase C and cardiac dysfunction: a review. *Heart failure reviews* 22, 6/2017, S. 843–859.
- Sklyarova, T., S. Bonn , P. D'Hooge, G. Denecker, S. Goossens, R. de Rycke, G. Borgonie, M. B sl, F. van Roy, J. van Hengel (2008): Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *The Journal of investigative dermatology* 128, 6/2008, S. 1375–1385.
- Slosberg, E. D., Y. Yao, F. Xing, A. Ikui, M. R. Jirousek, I. B. Weinstein (2000): The protein kinase C beta-specific inhibitor LY379196 blocks TPA-induced monocytic differentiation of HL60 cells the protein kinase C beta-specific inhibitor LY379196 blocks TPA-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Molecular carcinogenesis* 27, 3/2000, S. 166–176.
- Smith, E. A., E. Fuchs (1998): Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *The Journal of cell biology* 141, 5/1998, S. 1229–1241.

- SNELL, R. S. (1965): THE FATE OF EPIDERMAL DESMOSOMES IN MAMMALIAN SKIN. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* (Vienna, Austria : 1948) 66, 4/1965, S. 471–477.
- Sobolik-Delmaire, T., D. Katafiasz, J. K. Wahl (2006): Carboxyl terminus of Plakophilin-1 recruits it to plasma membrane, whereas amino terminus recruits desmoplakin and promotes desmosome assembly. *Journal of Biological Chemistry* 281, 25/2006, S. 16962–16970.
- Sobolik-Delmaire, T., R. Reddy, A. Pashaj, B. J. Roberts, J. K. Wahl (2010): Plakophilin-1 localizes to the nucleus and interacts with single-stranded DNA. *The Journal of investigative dermatology* 130, 11/2010, S. 2638–2646.
- Söhl, G., K. Willecke (2004): Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research* 62, 2/2004, S. 228–232.
- Soltoff, S. P. (2007): Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKC δ . *Trends in pharmacological sciences* 28, 9/2007, S. 453–458.
- Sonnenberg, A., R. K. H. Liem (2007): Plakins in development and disease. *Experimental cell research* 313, 10/2007, S. 2189–2203.
- Sonnenberg, A., A. M. Rojas, J. M. de Pereda (2007): The structure of a tandem pair of spectrin repeats of plectin reveals a modular organization of the plakin domain. *Journal of molecular biology* 368, 5/2007, S. 1379–1391.
- South, A. P., H. Wan, M. G. Stone, P. J. C. Dopping-Hepenstal, P. E. Purkis, J. F. Marshall, I. M. Leigh, R. A. J. Eady, I. R. Hart, J. A. McGrath (2003): Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *Journal of cell science* 116, Pt 16/2003, S. 3303–3314.
- Spindler, V., J. Waschke (2014): Desmosomal cadherins and signaling: lessons from autoimmune disease. *Cell communication & adhesion* 21, 1/2014, S. 77–84.
- Standaert, M. L., G. Bandyopadhyay, Y. Kanoh, M. P. Sajan, R. V. Farese (2001): Insulin and PIP3 activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry* 40, 1/2001, S. 249–255.
- Stappenbeck, T. S., J. A. Lamb, C. M. Corcoran, K. J. Green (1994): Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks. *Journal of Biological Chemistry* 269, 47/1994, S. 29351–29354.
- Steinberg, S. F. (2008): Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiological reviews* 88, 4/2008, S. 1341–1378.
- Stokoe, D., F. McCormick (1997): Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *The EMBO journal* 16, 9/1997, S. 2384–2396.
- Suzuki, A., C. Ishiyama, K. Hashiba, M. Shimizu, K. Ebnet, S. Ohno (2002): aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *Journal of cell science* 115, Pt 18/2002, S. 3565–3573.
- Takai, Y., A. Kishimoto, M. Inoue, Y. Nishizuka (1977): Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *Journal of Biological Chemistry* 252, 21/1977, S. 7603–7609.
- Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, F. Tomita (1986): Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipidCa⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 135, 2/1986, S. 397–402.
- Tang, V. W., D. A. Goodenough (2003): Paracellular Ion Channel at the Tight Junction. *Biophysical Journal* 84, 3/2003, S. 1660–1673.
- Tariq, H., J. Bella, T. A. Jowitt, D. F. Holmes, M. Rouhi, Z. Nie, C. Baldock, D. Garrod, L. Tabernero (2015): Cadherin flexibility provides a key difference between desmosomes and adherens

- junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 17/2015, S. 5395–5400.
- Terrell, E. M., D. K. Morrison (2019): Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 9, 1/2019.
- Thomason, H. A., N. H. Cooper, D. M. Ansell, M. Chiu, A. J. Merrit, M. J. Hardman, D. R. Garrod (2012): Direct evidence that PKC α positively regulates wound re-epithelialization: correlation with changes in desmosomal adhesiveness. *The Journal of pathology* 227, 3/2012, S. 346–356.
- Todorovic, V., J. L. Koetsier, L. M. Godsel, K. J. Green (2014): Plakophilin 3 mediates Rap1-dependent desmosome assembly and adherens junction maturation. *Molecular biology of the cell* 25, 23/2014, S. 3749–3764.
- Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle (1991): The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 266, 24/1991, S. 15771–15781.
- Tumey, L. N., N. Bhagirath, A. Brennan, N. Brooijmans, J. Lee, X. Yang, D. H. Boschelli (2009): 5-Vinyl-3-pyridinecarbonitrile inhibitors of PKC θ : optimization of enzymatic and functional activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17, 23/2009, S. 7933–7948.
- Tunggal, J. A., I. Helfrich, A. Schmitz, H. Schwarz, D. Günzel, M. Fromm, R. Kemler, T. Krieg, C. M. Niessen (2005): E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *The EMBO journal* 24, 6/2005, S. 1146–1156.
- Ueda, Y., S. i. Hirai, S. i. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno, S. Ohno (1996): Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *Journal of Biological Chemistry* 271, 38/1996, S. 23512–23519.
- Ueffing, M., J. Lovrić, A. Philipp, H. Mischak, W. Kolch (1997): Protein kinase C-epsilon associates with the Raf-1 kinase and induces the production of growth factors that stimulate Raf-1 activity. *Oncogene* 15, 24/1997, S. 2921–2927.
- Ullrich, A., J. Schlessinger (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 2/1990, S. 203–212.
- Ünal, E. B., F. Uhlitz, N. Blüthgen (2017): A compendium of ERK targets. *FEBS Letters* 591, 17/2017, S. 2607–2615.
- van Hengel, J., L. Gohon, E. Bruyneel, S. Vermeulen, M. Cornelissen, M. Mareel, F. von Roy (1997): Protein kinase C activation upregulates intercellular adhesion of alpha-catenin-negative human colon cancer cell variants via induction of desmosomes. *The Journal of cell biology* 137, 5/1997, S. 1103–1116.
- van Tintelen, J. P., M. M. Entius, Z. A. Bhuiyan, R. Jongbloed, A. C. P. Wiesfeld, A. A. M. Wilde, J. van der Smagt, L. G. Boven, M. M. A. M. Mannens, I. M. van Langen, R. M. W. Hofstra, L. C. Otterspoor, P. A. F. M. Doevendans, L.-M. Rodriguez, I. C. van Gelder, R. N. W. Hauer (2006): Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation* 113, 13/2006, S. 1650–1658.
- Vanezis, A., C. Thaitirarot, M. Butt, I. Squire, N. Samani, G. Rodrigo (2014): 208 The PKC Epsilon/AMPK ALPHA/ENOS Pathway is Implicated as a Mechanism by which Remote Ischaemic Conditioning Attenuates Endothelin-1 Mediated Cardiomyocyte Hypertrophy. *Heart (British Cardiac Society)* 100, Suppl 3/2014, A114-A114.
- Vanhaesebroeck, B., J. Guillermet-Guibert, M. Graupera, B. Bilanges (2010): The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 5/2010, S. 329–341.

- Vasioukhin, V., E. Bowers, C. Bauer, L. Degenstein, E. Fuchs (2001): Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nature cell biology* 3, 12/2001, S. 1076–1085.
- Velnati, S., S. Centonze, F. Girivetto, D. Capello, R. M. Biondi, A. Bertoni, R. Cantello, B. Ragnoli, M. Malerba, A. Graziani, G. Baldanzi (2021): Identification of Key Phospholipids That Bind and Activate Atypical PKCs. *Biomedicines* 9, 1/2021.
- Wagner, J., P. von Matt, R. Sedrani, R. Albert, N. Cooke, C. Ehrhardt, M. Geiser, G. Rummel, W. Stark, A. Strauss, S. W. Cowan-Jacob, C. Beerli, G. Weckbecker, J.-P. Evenou, G. Zenke, S. Cottens (2009): Discovery of 3-(1H-indol-3-yl)-4-2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-ylpyrrole-2,5-dione (AEB071), a potent and selective inhibitor of protein kinase C isotypes. *Journal of medicinal chemistry* 52, 20/2009, S. 6193–6196.
- Walko, G., M. J. Castañón, G. Wiche (2015): Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell and tissue research* 360, 2/2015, S. 363–378.
- Wallis, S., S. Lloyd, I. Wise, G. Ireland, T. P. Fleming, D. Garrod (2000): The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 11, 3/2000, S. 1077–1092.
- Walter, E., F. Vielmuth, M.-T. Wanuske, M. Seifert, R. Pollmann, R. Eming, J. Waschke (2019): Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion. *Frontiers in Immunology* 10, 2019, S. 1128.
- Wang, H. Q., R. C. Smart (1999): Overexpression of protein kinase C-alpha in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF-alpha expression but not tumor promotion. *Journal of cell science* 112 (Pt 20), 1999, S. 3497–3506.
- Wang, X., H.-C. Chuang, J.-P. Li, T.-H. Tan (2012): Regulation of PKC- θ function by phosphorylation in T cell receptor signaling. *Frontiers in Immunology* 3, 2012, S. 197.
- Wang, X. J., B. S. Warren, L. M. Beltrán, S. P. Fosmire, J. DiGiovanni (1993): Further identification of protein kinase C isozymes in mouse epidermis. *Journal of cancer research and clinical oncology* 119, 5/1993, S. 279–287.
- Weiske, J., T. Schöneberg, W. Schröder, M. Hatzfeld, R. Tauber, O. Huber (2001): The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44/2001, S. 41175–41181.
- Wen, H. C., W. C. Huang, A. Ali, J. R. Woodgett, W. W. Lin (2003): Negative regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt signalling pathway by PKC. *Cellular signalling* 15, 1/2003, S. 37–45.
- Witcher, L. L., R. Collins, S. Puttagunta, S. E. Mechanic, M. Munson, B. Gumbiner, P. Cowin (1996): Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 271, 18/1996, S. 10904–10909.
- Wolf, A., M. Hatzfeld (2010): A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9, 15/2010, S. 2973–2978.
- Wolf, A., M. Krause-Gruszczynska, O. Birkenmeier, A. Ostareck-Lederer, S. Hüttelmaier, M. Hatzfeld (2010): Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *The Journal of cell biology* 188, 4/2010, S. 463–471.
- Wolf, A., K. Rietscher, M. Glaß, S. Hüttelmaier, M. Schutkowski, C. Ihling, A. Sinz, A. Wingenfeld, A. Mun, M. Hatzfeld (2013): Insulin signaling via Akt2 switches plakophilin 1 function from stabilizing cell adhesion to promoting cell proliferation. *Journal of cell science* 126, Pt 8/2013, S. 1832–1844.
- Wortzel, I., R. Seger (2011): The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & cancer* 2, 3/2011, S. 195–209.

- Wu, R. Y., M. Abdullah, P. Määttä, A. V. C. Pilar, E. Scruten, K. C. Johnson-Henry, S. Napper, C. O'Brien, N. L. Jones, P. M. Sherman (2017): Protein kinase C δ signaling is required for dietary prebiotic-induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. *Scientific reports* 7, 2017, S. 40820.
- Wu-Zhang, A. X., A. C. Newton (2013): Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. *The Biochemical journal* 452, 2/2013, S. 195–209.
- Xu, K.-P., D. A. Dartt, F.-S. X. Yu (2002): EGF-induced ERK phosphorylation independent of PKC isozymes in human corneal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 43, 12/2002, S. 3673–3679.
- Yang, Z., N. E. Bowles, S. E. Scherer, M. D. Taylor, D. L. Kearney, S. Ge, V. V. Nadvoretzkiy, G. DeFreitas, B. Carabello, L. I. Brandon, L. M. Godsel, K. J. Green, J. E. Saffitz, H. Li, G. A. Danieli, H. Calkins, F. Marcus, J. A. Towbin (2006): Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation research* 99, 6/2006, S. 646–655.
- Yen, T. T. H., D. T. P. Thao, T. L. Thuoc (2014): An overview on keratinocyte growth factor: from the molecular properties to clinical applications. *Protein and peptide letters* 21, 3/2014, S. 306–317.
- Yin, T., S. Getsios, R. Caldelari, L. M. Godsel, A. P. Kowalczyk, E. J. Müller, K. J. Green (2005): Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry* 280, 48/2005, S. 40355–40363.
- Yonezawa, T., R. Kurata, M. Kimura, H. Inoko (2009): PKC delta and epsilon in drug targeting and therapeutics. *Recent patents on DNA & gene sequences* 3, 2/2009, S. 96–101.
- Yousef, H., M. Alhaji, S. Sharma (2021): StatPearls. *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis, Treasure Island (FL)*.
- Yuki, T., A. Haratake, H. Koishikawa, K. Morita, Y. Miyachi, S. Inoue (2007): Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Experimental dermatology* 16, 4/2007, S. 324–330.
- Zhang, G., M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg, J. H. Hurley (1995): Crystal structure of the Cys2 activator-binding domain of protein kinase C δ in complex with phorbol ester. *Cell* 81, 6/1995, S. 917–924.
- Zhang, M.-C., H. Furukawa, K. Tokunaka, K. Saiga, F. Date, Y. Owada, M. Nose, M. Ono (2008): Mast cell hyperplasia in the skin of Dsg4-deficient hypotrichosis mice, which are long-living mutants of lupus-prone mice. *Immunogenetics* 60, 10/2008, S. 599–607.
- Zihni, C., C. Mills, K. Matter, M. S. Balda (2016): Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews. Molecular cell biology* 17, 9/2016, S. 564–580.

6. Anhang

6.1. Tabellen

Tab. A1 Relevante PKC-Inhibitoren

Inhibitor	Wirkort/ kompetitiv gegen	Spezifität [IC ₅₀]	Literatur
Balanol	ATP-Bindung	PKC βII>βI>η>δ>α>ε	(Defauw et al., 1996; Mochly-Rosen et al., 2012)
Carbonitril (5-Vinyl-3-pyridincarbonitril Derivat)	Katalytische Domäne	PKCθ 4,7 nM	(Tumey et al., 2009; Niu et al., 2009)
CGP53353	ATP-Bindung	PKCβI 3,8 μM PKCβII 0,41 μM Andere c und nPKCs > 22 μM	(Chalfant et al., 1996)
Chelerythrine	ATP-Bindung	PKC: 0,7 μM	(Herbert et al., 1990)
Enzastaurin	ATP-Bindung	PKCα 39 nM β 6 nM γ 83 nM ε 110 nM	(Faul et al., 2003; Graff et al., 2005)
GF109203X (Bisindolylmaleimid)	ATP-Bindung	PKCα 8,4 nM βI 18 nM βII 16 nM γ 20 nM δ 210 nM ε 132 nM ζ 5800 nM	(Toullec et al., 1991; Gekeler et al., 1996)
Gö6976	Katalytische Domäne	PKCα 2,3; βI 6,2 nM PKCδ; η; ζ > 3 μM	(Martiny-Baron et al., 1993)
Gö6983	ATP-Bindung	PKCα 7 nM β 7 nM γ 6 nM δ 10 nM ζ 60 nM	(Gschwendt et al., 1996)
Isoquinoline H-7	ATP-Bindung	PKC: 6 μM	(Howcroft und Lindquist, 1991)
KCe-12 und KCe-16	Substrat Bindung	PKCε	(Shafrir et al., 2006; Yonezawa et al., 2009)
LY379196	ATP-Bindung	PKCβ 30-50 nM PKC α; δ; η; γ ~600 nM	(Slosberg et al., 2000)

Inhibitor	Wirkort/ kompetitiv gegen	Spezifität [IC ₅₀]	Literatur
Perylenequinone Calphostin C (UCN-1028C)	Regulatorische Domäne	c und nPKCs ~50 nM	(Ogiwara et al., 1998)
Ro 31-8220	Katalytische Domäne	PKC α 5 nM β I 24 nM β II: 14 nM γ 27 nM ϵ 24 nM	(Wilkinson et al., 1993; Davies et al., 2000)
Rottlerin	ATP-Bindung	PKC δ 3-6 μ M PKC α ; β ; γ 30-42 μ M PKC ϵ ; η ; ζ 80-100 μ M	(Gschwendt et al., 1994)
Ruboxistaurin (LY333531)	ATP-Bindung	PKC β I 4,7; β II: 5,9 nM	(Jirousek et al., 1996)
Sotrastaurin (AEB071)	ATP-Bindung	α 0,95 nM β I 0,64 nM δ 2,1 nM ϵ 3,2 nM η 1,8 nM θ 0,22 nM (Ki)	(Wagner et al., 2009; Evenou et al., 2009, 2009)
Spheciosterol sulfat A-C	Katalytische Domäne	PKC ζ A: 1,6 μ M B: 0,5 μ M C: 0,1 μ M	(Whitson et al., 2009)
Sphingosin	Regulatorische Domäne	PKCs 2,8 μ M	(Khan et al., 1990)
Staurosporin	ATP-Bindung	PKC α 12 nM, β 11 nM γ 14 nM δ 20 nM η 4 nM	(Tamaoki et al., 1986; Ward und O'Brian, 1992)
Taxol (Tamoxifen)	Regulatorische Domäne	cPKCs	(Rohlf et al., 1998; Zarate et al., 2007)
UCN-01 (7- Hydroxystaurosporin)	ATP-Bindung	PKC 40 nM	(Tamaoki, 1991)

Tab. A2 Potentielle Phosphorylierungsstellen desmosomaler Proteine nach dem Peptid-Kinase-Array

Protein	Peptid Start	Sequenz	PKC α	PKC δ	PKC η	S/T	RXXS/T	Konserviert Maus	Voraussage Kinexus PhosphoNet Score >300	Hits auf Phosphosite.org
PKP1-human	41	VQEQVM MTV KRQK SK	-	-	+	T48 S54	- S54	T48 S54	- -	T48: 0 S54: 1
PKP1-human	61	TL SH SRN RG SMYDGLA	-	-	+	T61 S63 S65 S69	- - - -	T61 S63 S65 S69	- - S65 S69	T61: 1 S63: 2 S65: 3 S69: 3
PKP1-human	76	DN YNYG T TSR SS YYS	+	-	+	T82 T83 S84 S86 S87 S90	- - - - - -	T83 T84 S85 S87 S88 S91	- - - - S87 S90	T82: 3 T83: 1 S84: 1 S86: 1 S87: 1 S90: 0
PKP1-human	81	G TTSR SS YYS SKFQAG	+	+	+	T82 T83 S84 S86 S87 S90	- - - - - -	T83 T84 S85 S87 S88 S91	- - - - S87 S90	T82: 3 T83: 1 S84: 1 S86: 1 S87: 1 S90: 0
PKP1-human	86	SS YYS SKFQAGNGSWG	-	-	+	S86 S87 S90 S98	- - - -	S87 S88 S91 S99	- S87 S90 -	S86: 1 S87: 1 S90: 0 S98: 2
PKP1-human	96	NG SWG YPIYNG TLKR	+	-	-	S98 T107	- -	S99 T108	- -	S98: 2 T107: 4
PKP1-human	106	G TLK REPNRR SS Y	-	-	+	T107 S118 S119	- S118 S119	T108 S119 S120	- S118 -	T107: 4 S118: 8 S119: 13
PKP1-human	116	R FSS YSQ MENW SRHY	+	-	-	S118 S119 S121 S127	S118 S119 - -	S119 S120 S122 S128	S118 - - -	S118: 8 S119: 13 S121: 13 S127: 1
PKP1-human	121	SQ MENW SRHYPRG SC	+	+	+	S121 S127 S134	- - -	S122 S128 S135	- - S134	S121: 13 S127: 1 S134: 0
PKP1-human	126	W SRHY PRG SC NTTGA	-	+	+	S127 S134 T137 T138	- - - -	S128 S135 T138 -	- S134 - -	S127: 1 S134: 0 T137: 1 T138: 0
PKP1-human	161	CD PRGT LRK G TLG SK	-	+	-	T166 T171 S174	- T171 -	T167 T172 S175	- - -	T166: 36 T171: 2 S174: 1
PKP1-human	176	GQ KTT Q NRYS F Y STC	+	+	+	T179 T180 S185 S188 T189	- - - - -	T180 T181 S186 S189 T190	- - S185 - -	T179: 1 T180: 1 S185: 80 S188: 9 T189: 10
PKP1-human	181	Q NRYS F Y STC S GQKA	-	+	+	S185 S188 T189 S191	- - - -	S186 S189 T190 S192	S185 - - -	S185: 80 S188: 9 T189: 10 S191: 19
PKP1-human	421	AL V PQRAT SS RVNLS	-	+	+	T428 S429 S430 S435	- S429 - -	- - - S415	- S429 - -	T428: 0 S429: 0 S430: 0 S435: 0
PKP1-human	441	RQ TMR NY S GLID S LM	-	+	-	T443 S448 S453	- S448 -	T423 S428 S433	- - -	T443: 0 S448: 0 S453: 0
PKP1-human	481	N L SYRLDAE VPT RYR	+	-	+	S483 T492	- -	S463 T472	S483 -	S483: 0 T492: 1
PKP1-human	611	V V RS GAS LLSNMSRH	-	+	-	S614 S617 S620 S623	- - - -	S594 S597 S600 S603	- - - -	S614: 0 S617: 0 S620: 0 S623: 0

Protein	Peptid Start	Sequenz	PKC α	PKC δ	PKC η	S/T	RXXS/T	Konserviert Maus	Voraussage Kinexus PhosphoNet Score >300	Hits auf Phosphosite.org
PKP1-human	616	ASLLSNMSRHPLLHR	-	+	+	S617 S620 S623	-	S597 S600 S603	- - -	S617: 0 S620: 0 S623: 0
PKP1-human	711	MWSSKELQGVLRQQG	-	+	-	S713 S714	-	- S695	- -	S713: 0 S714: 0
PKP1-human	731	LGTLAGANSLRNFTS	-	-	+	T733 S739 T744 S745	- - T744 -	- - T725 S726	- S739 - -	T733: 0 S739: 2 T744: 0 S745: 0
PKP1-human	736	GANSRLNFTSRF	+	+	+	S739 T744 S745	- T744 -	- T725 S726	S739 - -	S739: 2 T744: 0 S745: 0

Protein	Peptid Start	Sequenz	PKC α	PKC δ	PKC η	S/T	RXXS/T	Konserviert Maus	Voraussage Kinexus PhosphoNet Score >300	Hits auf Phosphosite.org
DSP-human	6	GSHPRINTLGRMIRA	-	-	+	S7 T13	- T13	S7 T13	- -	S7: 4 T13: 13
DSP-human	31	TSGGGGTSRMYSRR	+	+	+	T31 S32 T37 S38 S43	- - - - -	T31 - T47 S48 S53	- - - - S43	T31: 4 S32: 7 T37: 5 S38: 2 S43: 2
DSP-human	36	GTRMYYSRRGVITD	+	+	+	T37 S38 S43 T49	- - - -	T47 S48 S53 -	- - S43 -	T37: 5 S38: 2 S43: 2 T49: 8
DSP-human	151	ALYKAISVPRVRRAS	+	+	+	S157 S165	- S165	S169 S177	S157 S165	S157: 11 S165: 132
DSP-human	391	YLKGLQDSIRKKYPC	+	+	+	S398	-	S410	-	S398: 2
DSP-human	1411	RLKNTLTQTENLRR	-	+	+	T1415 T1417 T1419 T1420	- - - -	T1427 - T1431 T1432	- - - -	T1415: 0 T1417: 0 T1419: 0 T1420: 0
DSP-human	2136	DPVNSVFLPKDVALA	+	-	-	S2140	-	S2152	-	S2140: 0
DSP-human	2201	LSVQKRSMSFQGIHQ	+	+	+	S2202 S2207 S2209	- - S2209	S2214 S2219 S2221	- - S2209	S2202: 1 S2207: 8 S2209: 67
DSP-human	2451	KQVQTSQKNTLRKRR	-	+	+	T2455 S2456 T2460	- - -	T2467 S2468 T2472	- - -	T2455: 0 S2456: 0 T2460: 1
DSP-human	2506	ITITGSDGSTRVVLV	-	+	-	T2507 T2509 S2511 S2514 T2515	- - - - -	T2519 T2521 S2523 S2526 T2527	- - - - -	T2507: 0 T2509: 0 S2511: 0 S2514: 0 T2515: 0
DSP-human	2511	SDGSTRVVLVDRKGTG	-	+	-	S2511 S2514 T2515 T2524	- - - -	S2523 S2526 T2527 T2536	- - - -	S2511: 0 S2514: 0 T2515: 0 T2524: 2

Protein	Peptid Start	Sequenz	PKC α	PKC δ	PKC η	S/T	RXXS/T	Konserviert Maus	Voraussage Kinexus PhosphoNet Score >300	Hits auf Phosphosite.org
PG-human	51	RQYTLKKTITTYTQGV	-	+	-	T54 T58 T59 T60 T62	T54 - - - -	T54 T58 T59 T60 T62	- - - - -	T54: 29 T58: 3 T59: 3 T60: 3 T62: 4

PG-human	201	TARCTTSILHNLSHH	-	+	+	T201 T205 T206 S207 S213	- - T206 - -	T201 T205 T206 S207 S213	- - - - -	T201: 0 T205: 1 T206: 0 S207: 0 S213: 0
PG-human	331	TSRVLKVLVCPSPNK	-	+	-	T331 S332 S339 S343	- - - -	T331 S332 S339 S343	- - - -	T331: 0 S332: 0 S339: 0 S343: 0

Protein	Peptid Start	Sequenz	PKC α	PKC δ	PKC η	S/T	RXXS/T	Konserviert Maus	Voraussage Kinexus PhosphoNet Score >300	Hits auf Phosphosite.org
DSC1-human	820	QSFTQPRLGEKVLYC	-	+	-	S821 T823	- -	T813 T815	- -	S821: 0 T823: 0
DSG1-human	1035	ARSRITKYSTVQYSK	+	+	-	S1037 T1040 S1043 T1044 S1048	- - - - -	S1045 T1048 - T1052 S1056	- - - - -	S1037: 0 T1040: 0 S1043: 1 T1044: 2 S1048: 0
DSG2-human	1095	HSNSTITTSSTRVTK	-	+	+	S1096 S1098 T1099 T1101 T1102 S1103 S1104 T1105 T1108	- - - - - - - - -	- S1102 T1103 T1105 T1106 S1107 S1108 T1109 T1112	- - - - - S1104 - -	S1096: 0 S1098: 2 T1099: 1 T1101: 0 T1102: 0 S1103: 0 S1104: 0 T1105: 0 T1108: 0
DSG2-human	1100	ITTSSTRVTKHSTVQ	-	+	+	T1101 T1102 S1103 S1104 T1105 T1108 S1111 T1112	- - - - - - - -	T1105 T1106 S1107 S1108 T1109 T1112 S1115 T1116	- - - S1104 - - - -	T1101: 0 T1102: 0 S1103: 0 S1104: 0 T1105: 0 T1108: 0 S1111: 1 T1112: 0

6.2. Abbildungen

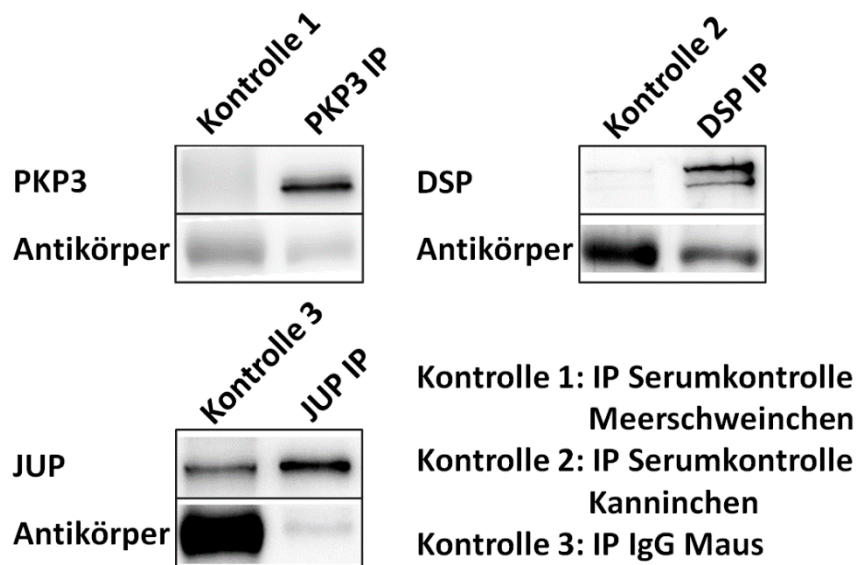
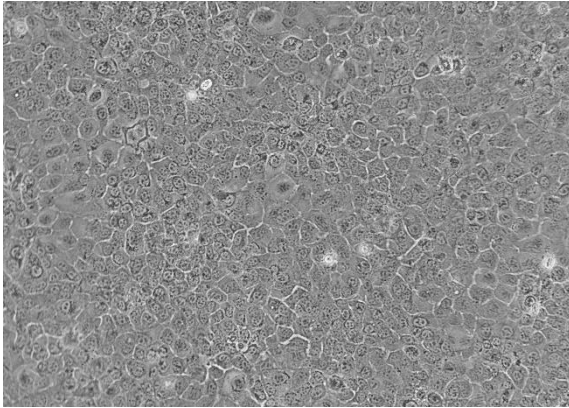


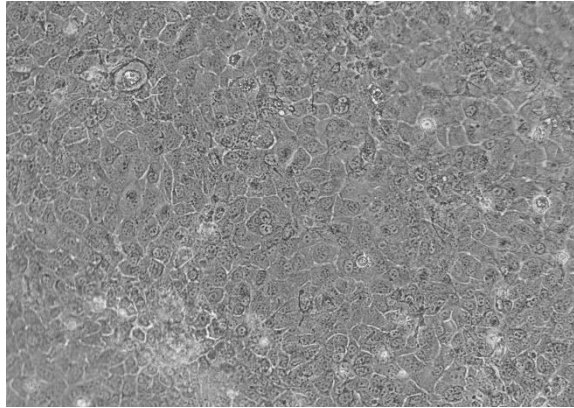
Abb. A1 Spezifitätskontrollen für Immunpräzipitationen (IP)

Dargestellt sind die Western-Blots für PKP3, DSP und JUP im Vergleich zu ihrer jeweiligen unspezifischen Serum- bzw. IgG-Kontrolle. Im Verhältnis zur jeweiligen Antikörpermenge war die Menge an Protein, die unspezifisch präzipitiert wurde, vernachlässigbar. MKZ-wt wurden zuvor 24 h in HCM kultiviert.

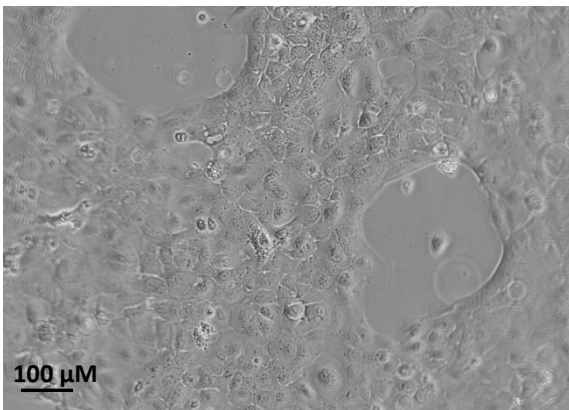
Si Kontrolle 48h



Si PKC α



Si PKC δ



Si PKC η

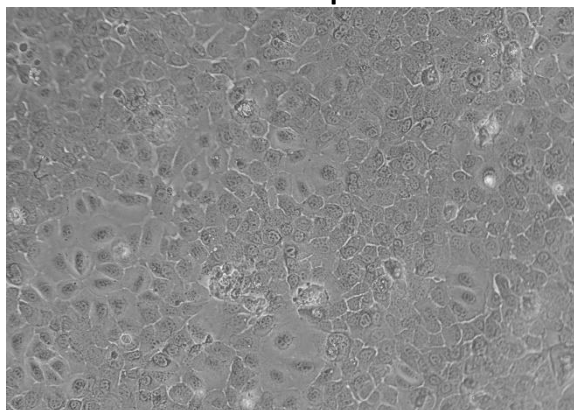


Abb. A2 Effekt des PKC Knockdowns auf den Zellrasen

MKZ wurden 48 h nach dem siRNA-mediierten *Knockdown* fotografiert. Sie wurden zuvor 24h in HCM kultiviert. Der *Knockdown* der PKC δ zeigt große, deutliche Lücken im Zellrasen.

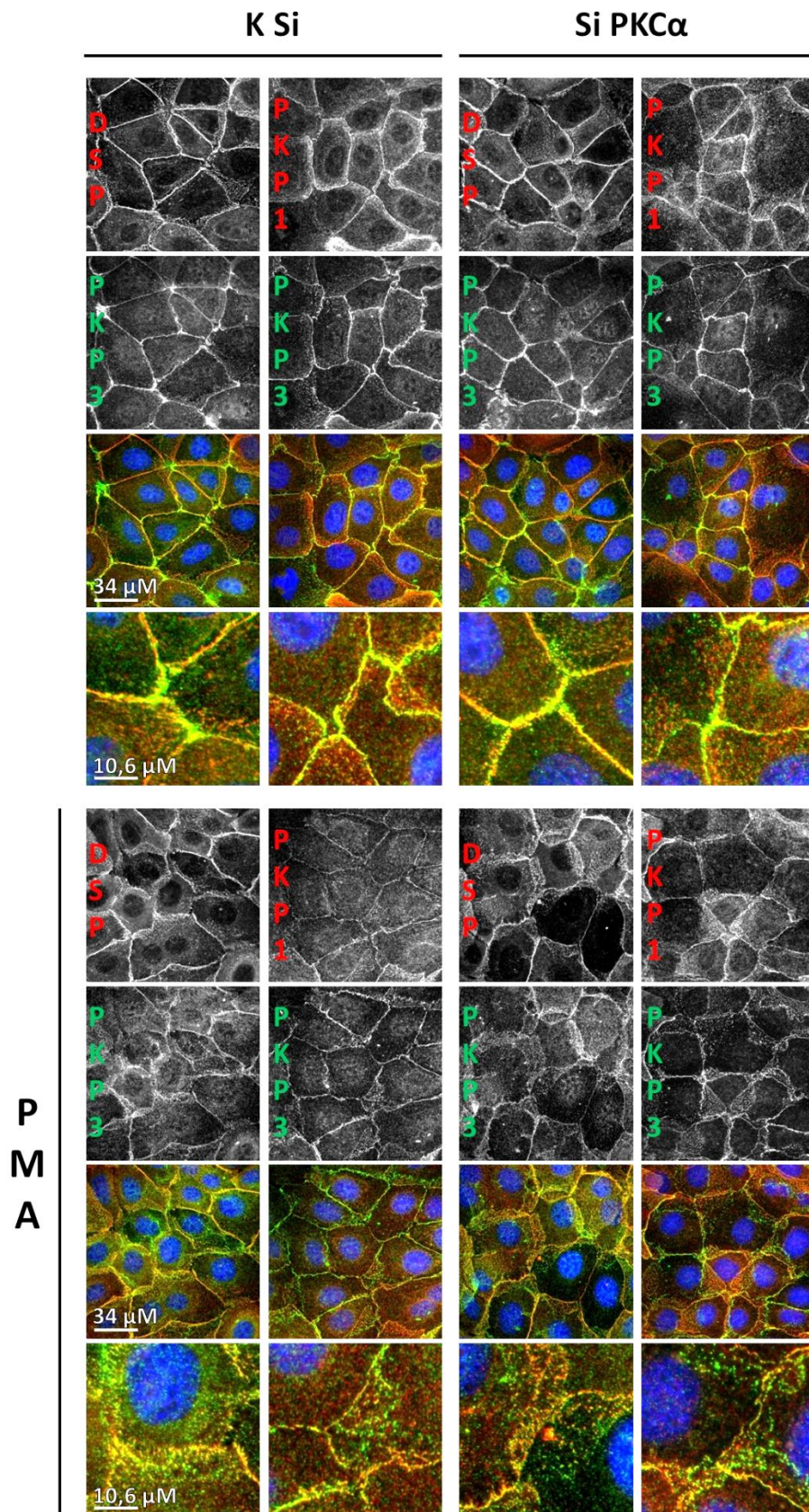


Abb. A3 Einfluss des *Knockdowns* der PKC α auf die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP
 MKZ wurden 48 h nach dem siRNA-medierte*n* *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24h in HCM kultiviert und für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP und PKP1 je rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μ m, der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μ m

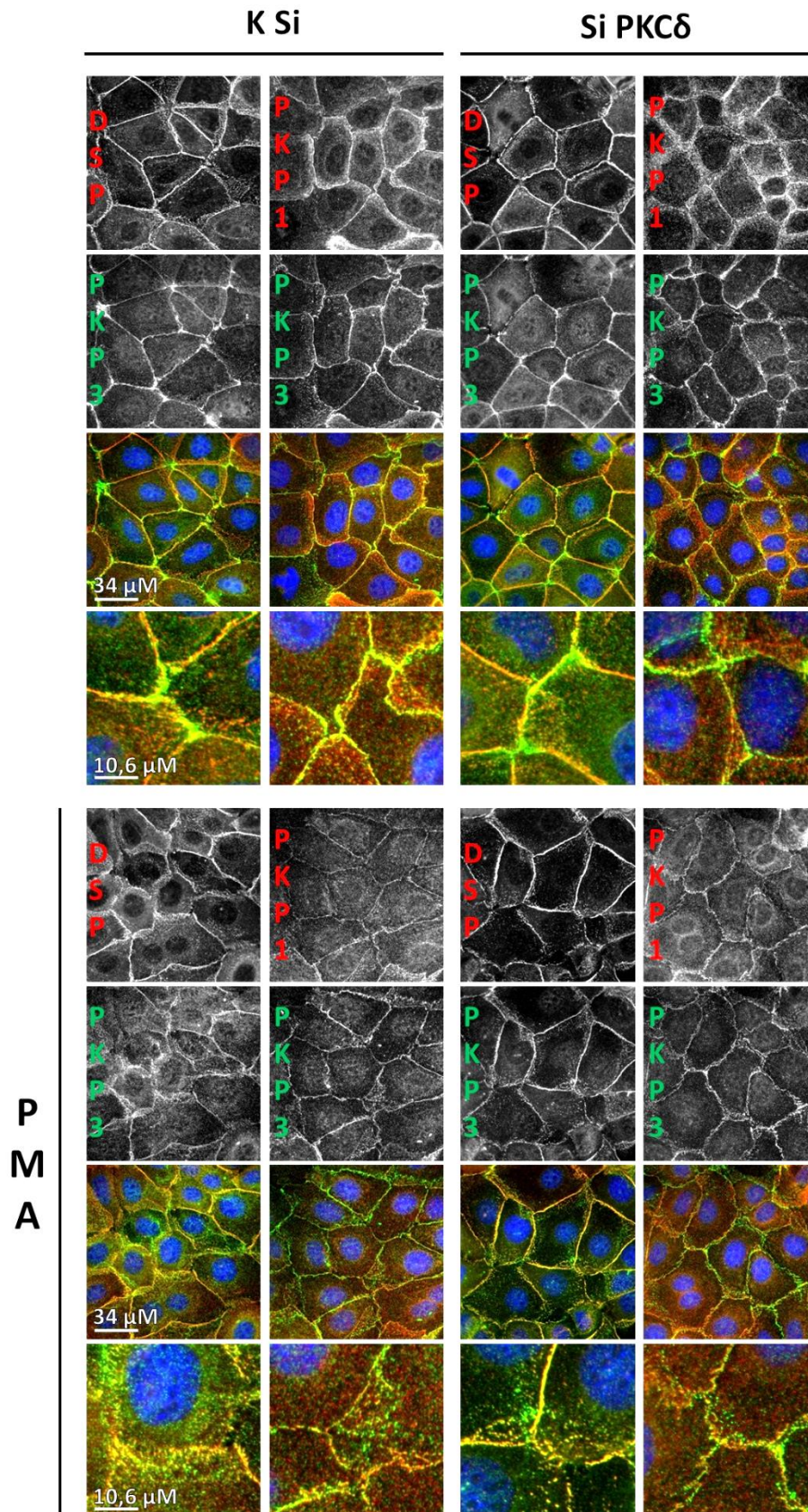


Abb. A4 Einfluss des *Knockdowns* der PKC δ auf die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP

MKZ wurden 48 h nach dem siRNA-medierte*n* *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24h in HCM Medium kultiviert und für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP und PKP1 je rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μ m. der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42.5 μ m

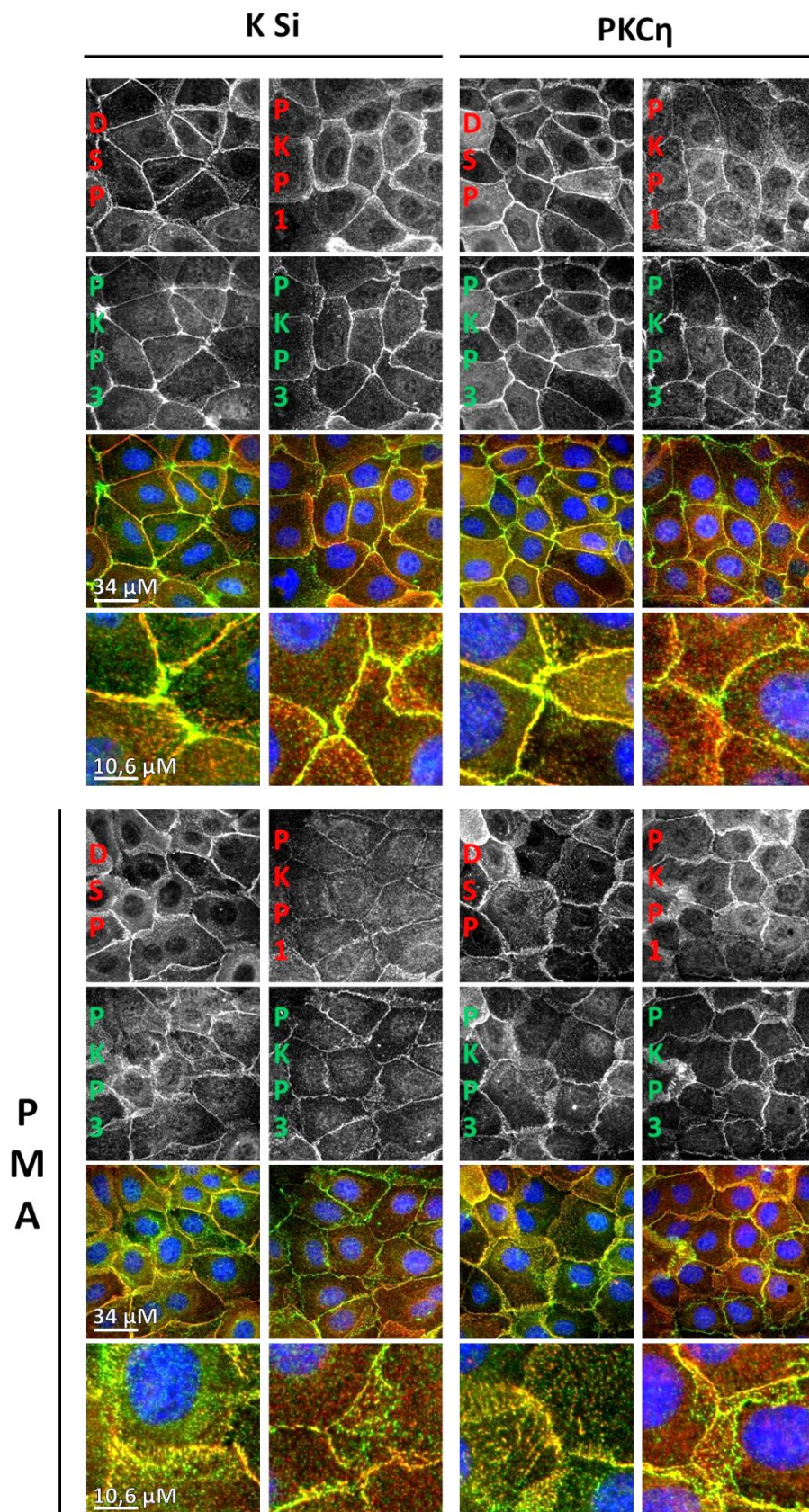


Abb. A5 Einfluss des *Knockdowns* der PKC η auf die Lokalisation von PKP3, PKP1 und DSP
 MKZ wurden 48 h nach dem siRNA-medierte*n* *Knockdown* untersucht. Sie wurden zuvor 24h in HCM Medium kultiviert und für 15 Minuten mit PMA stimuliert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. PKP3 ist grün, DSP und PKP1 je rot und die Zellkerne blau dargestellt. Ein Bild entspricht einer Länge von 136 μ m, der vergrößerte Ausschnitt einer Länge von 42,5 μ m

PKP3 Maus

10	20	30	40	50
MQEGNFLLSA	LQPETGVCSL	ALPSDLQLDR	RGAEGPEADR	LRAARVQEQV
60	70	80	90	100
RARLLQLGQQ	SRHNGSAELD	GSAESARGMP	RGQYHTMQTG	FSSRSQGMSS
110	120	130	140	150
DKTSTFRPIA	KPAYSPASWS	SRSAVDLTCS	RRLSS AHNGG	SAFGAVGYGG
160	170	180	190	200
TQPTPPMPTR	PVS FHERGGA	ASRADYDTLS	LRSLRLGPGG	LDDRYSVVSE
210	220	230	240	250
QLEPAAASTY	RAYAYE RQAS	SGSSRAGGLD	WPEATEGPPS	RTIRAPAMRT
260	270	280	290	300
LQRFQSS SHRS	RGGT GSVSGA	GLEPVARAPS	VRSL LSLAD	SGHLPDVRGL
310	320	330	340	350
DSYTGHRTLQ	RLSS GFDDID	LPSAVKYLMA	SDPNLQVLGA	AYIQH RCYS D
360	370	380	390	400
AAAKQARSL	QAVPRLVKLF	NHANQEVQRH	AT GAMRNLIY	DNVDNKLALV
410	420	430	440	450
EENGI FELLR	TLREQDDEL	KNVTGILWNL	SSSDHLKDRL	ARDTLEQLTD
460	470	480	490	500
LVLSPLSGAG	GPPLIQNAS	EAEIFYNATG	FLRNLS SASQ	ATRQKMRECH
510	520	530	540	550
GLVDALVTYI	NHALDVGKCE	DKSVENAVCV	LRNLS YRLYD	EMPPSALQRL
560	570	580	590	600
EGRGRDMAG	APPGEMVGC	TPQSRRLREL	PLTADALTFA	EVSKDPKGLE
610	620	630	640	650
WLWSPQIVGL	YNRLQRCEL	NRHTT EAAAAG	ALQNITAGDR	RWAGVLSRLA
660	670	680	690	700
LEQERILNPL	LDRVRT ADHN	QLRSLT GLIR	NLS RNARNKD	EMSTKVVS
710	720	730	740	750
IEKLPGSVGE	KCPPAEVLVN	IIAVLNNLVV	ASPIAARDLL	YFDGLRKLIV
760	770	780	790	
IKKKRSDPS	EKSS RAAS SL	LANLWQYSKL	HRDFRAKGYR	KEDFLGP

PKP3 Mensch

10	20	30	40	50
MQDGNFLLSA	LQPEAGVCSL	ALPSDLQLDR	RGAEGPEAER	LRAARVQEQV
60	70	80	90	100
RARLLQLGQQ	PRHNGAAEPE	PEAETA RGTS	RGQYHTLQAG	FSSRSQGLSG
110	120	130	140	150
DKTSGFRPIA	KPAYSPASWS	SRSAVDLSCS	RRLSS AHNGG	SAFGAAGYGG
160	170	180	190	200
AQPTPPMPTR	PVS FHERGGV	GSRADYDTLS	LRSLRLGPGG	LDDRYSLVSE
210	220	230	240	250
QLEPAATSTY	RAFAYE RQAS	SSSSRAGGLD	WPEATEVSPS	RTIRAPAVRT
260	270	280	290	300
LQRFQSS SHRS	RGVGGAVPGA	VLEPVARAPS	VRSL LSLAD	SGHLPDVHGF
310	320	330	340	350
NSYGSHRTLQ	RLSS GFDDID	LPSAVKYLMA	SDPNLQVLGA	AYIQHKCYSD
360	370	380	390	400
AAAKQARSL	QAVPRLVKLF	NHANQEVQRH	AT GAMRNLIY	DNADNKLALV
410	420	430	440	450
EENGI FELLR	TLREQDDEL	KNVTGILWNL	SSSDHLKDRL	ARDTLEQLTD
460	470	480	490	500
LVLSPLSGAG	GPPLIQNAS	EAEIFYNATG	FLRNLS SASQ	ATRQKMRECH
510	520	530	540	550
GLVDALVTSI	NHALDAGKCE	DKSVENAVCV	LRNLS YRLYD	EMPPSALQRL
560	570	580	590	600
EGRGRRDLA	APPGEVGC	TPQSRRLREL	PLAADALTFA	EVSKDPKGLE
610	620	630	640	650
WLWSPQIVGL	YNRLQRCEL	NRHTT EAAAAG	ALQNITAGDR	RWAGVLSRLA
660	670	680	690	700
LEQERILNPL	LDRVRT ADHH	QLRSLT GLIR	NLS RNARNKD	EMSTKVVS
710	720	730	740	750
IEKLPGSVGE	KSPPAEVLVN	IIAVLNNLVV	ASPIAARDLL	YFDGLRKLIF
760	770	780	790	
IKKKRSDPS	EKSS RAAS SL	LANLWQYNKL	HRDFRAKGYR	KEDFLGP

Abb. A6 Vergleich der PKP3-Sequenz in Maus und Mensch

RXXS/T-Motive sind in rot markiert.

PMA

Sequenzabdeckung 54,7 %

10	20	30	40	50
MQEGNFLLSA	LQPETGVC SL	ALPSDLQLDR	RGAEGPEADR	LRAARVQEQV
60	70	80	90	100
RARLLQLGQQ	SRHNGSAELD	GSAESARGMP	RGQYHTMQTG	FSSRSQMSG
110	120	130	140	150
DKTSTFRPIA	KPAYSPASWS	SRSVDLTCS	RRLSSAHNGG	SAFGAVGYGG
160	170	180	190	200
TQPTPPMPTR	PVSFHERGGA	ASRADYDTLS	LRSLRLGPGG	LDDRYSVVSE
210	220	230	240	250
QLEPAAASTY	RAYAYERQAS	SGSSRAGGLD	WPEATEGPPS	RTIRAPAMRT
260	270	280	P 290	300
LQRFQSSHRS	RGGTGSVSGA	GLEPVARAPS	VRSLSLSLAD	SGHLPDVRGL
310	PP 320	330	340	350
DSYTGHRITLQ	RLSSGFDDID	LPSAVKYLMA	SDPNLQVLGA	AYIQHRCYSD
360	370	380	390	400
AAAKKQARSL	QAVPRLVKLF	NHANQEVQRH	ATGAMRNLIY	DNVDNKLALV
410	420	430	440	450
EENGIFELLR	TLREQDDEL	KNVTGILWNL	SSSDHLKDRL	ARDTLEQLTD
460	470	480	490	500
LVLSPLSGAG	GPPLIQONAS	EAEIFYNATG	FLRNLSSASQ	ATRQKMRECH
510	520	530	540	550
GLVDALVTYI	NHALDVGKCE	DKSVENAVCV	LRNLSYRLYD	EMPPSALQRL
560	570	580	590	600
EGRGRDMAG	APPGEMVGC	TPQSRRLREL	PLTADALTFA	EVSKDPKGLE
610	620	630	640	650
WLWSPQIVGL	YNRLQRCCEL	NRHTTEAAAG	ALQNITAGDR	RWAGVLSRLA
660	670	680	690	700
LEQERILNPL	LDRVRTADHN	QLRSLTGLIR	NLSRNARNKD	EMSTKVVS
710	720	730	740	750
IEKLPGSVGE	KCPPAEVLVN	IIAVLNNLVV	ASPIAARDLL	YFDGLRKLVF
760	770	780	790	
IKKKRSDPDS	EKSSRAASSL	LANLWQYSKL	HRDFRAKGYR	KEDFLGP

Sotrastaurin

Sequenzabdeckung 48,8 %

10	20	30	40	50
MQEGNFLLSA	LQPETGVC SL	ALPSDLQLDR	RGAEGPEADR	LRAARVQEQV
60	70	80	90	100
RARLLQLGQQ	SRHNGSAELD	GSAESARGMP	RGQYHTMQTG	FSSRSQMSG
110	120	130	140	150
DKTSTFRPIA	KPAYSPASWS	SRSVDLTCS	RRLSSAHNGG	SAFGAVGYGG
160	170	180	190	200
TQPTPPMPTR	PVSFHERGGA	ASRADYDTLS	LRSLRLGPGG	LDDRYSVVSE
210	220	230	240	250
QLEPAAASTY	RAYAYERQAS	SGSSRAGGLD	WPEATEGPPS	RTIRAPAMRT
260	270	280	290	300
LQRFQSSHRS	RGGTGSVSGA	GLEPVARAPS	VRSLSLSLAD	SGHLPDVRGL
310	PP 320	330	340	350
DSYTGHRITLQ	RLSSGFDDID	LPSAVKYLMA	SDPNLQVLGA	AYIQHRCYSD
360	370	380	390	400
AAAKKQARSL	QAVPRLVKLF	NHANQEVQRH	ATGAMRNLIY	DNVDNKLALV
410	420	430	440	450
EENGIFELLR	TLREQDDEL	KNVTGILWNL	SSSDHLKDRL	ARDTLEQLTD
460	470	480	490	500
LVLSPLSGAG	GPPLIQONAS	EAEIFYNATG	FLRNLSSASQ	ATRQKMRECH
510	520	530	540	550
GLVDALVTYI	NHALDVGKCE	DKSVENAVCV	LRNLSYRLYD	EMPPSALQRL
560	570	580	590	600
EGRGRDMAG	APPGEMVGC	TPQSRRLREL	PLTADALTFA	EVSKDPKGLE
610	620	630	640	650
WLWSPQIVGL	YNRLQRCCEL	NRHTTEAAAG	ALQNITAGDR	RWAGVLSRLA
660	670	680	690	700
LEQERILNPL	LDRVRTADHN	QLRSLTGLIR	NLSRNARNKD	EMSTKVVS
710	720	730	740	750
IEKLPGSVGE	KCPPAEVLVN	IIAVLNNLVV	ASPIAARDLL	YFDGLRKLVF
760	770	780	790	
IKKKRSDPDS	EKSSRAASSL	LANLWQYSKL	HRDFRAKGYR	KEDFLGP

Abb. A7 Sequenzabdeckung von PKP3 aus der Messung der Facility Massenspektrometrie Halle (Saale)

Der nachgewiesene Bereich von PKP3 ist grün markiert, Phosphorylierungen sind Rot dargestellt.

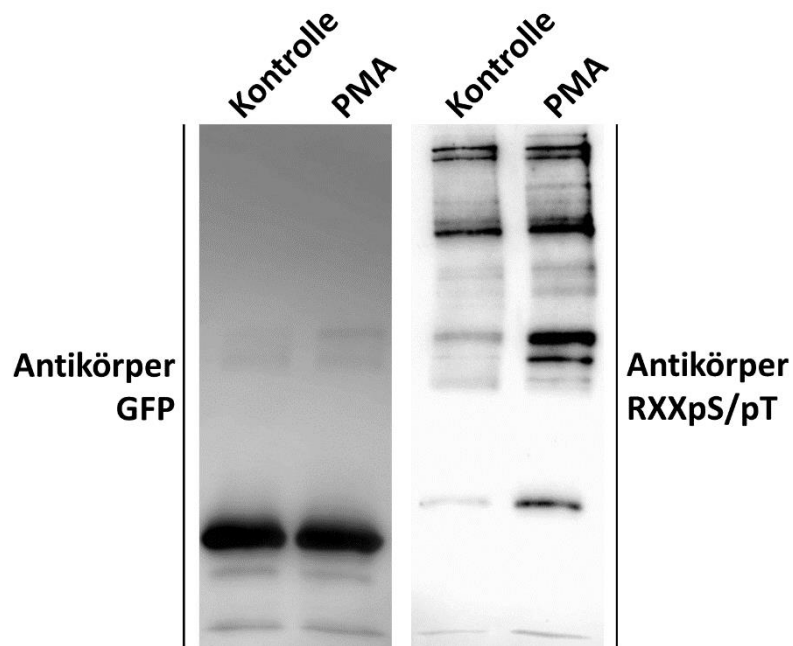


Abb. A8 Phosphorylierungskontrolle GFP

MKZ+GFP wurden 24 h in HCM kultiviert und 15 min mit PMA stimuliert. Dargestellt ist die Phosphorylierung im RXXS/T-Motiv im Input im Vergleich zur GFP-Menge. Es ist erkennbar das GFP nicht nach PMA-Stimulation phosphoryliert wurde.

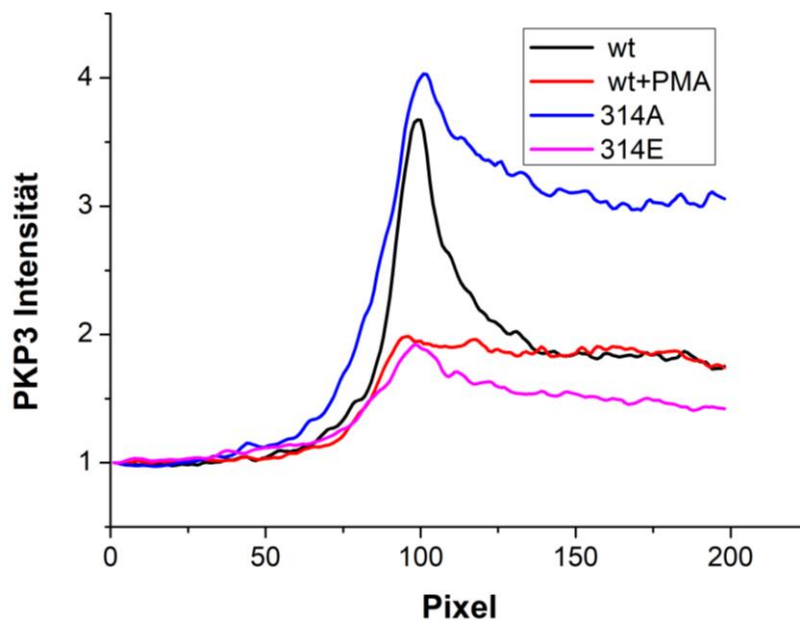


Abb. A9 PKP3 Lokalisation der 313/314-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ± PMA

Zur Quantifizierung der PKP3-Lokalisation von Abb. 14 im Vergleich zu Abb. 38 wurde eine 200 pxl lange Linie über den lateralen Bereich, durch den trizellulären bis ins Zytoplasma gelegt. Der Mittelwert aller Messungen ist grafisch für die jeweilige Behandlung/Linie dargestellt.

6.3. Listen

6.3.1. Geräte-Liste

Biometra Trio PCR Thermocycler	Analytik Jena; Jena; Deutschland
Biometra Standard Power Pack P25	Analytik Jena; Jena; Deutschland
Bio-Rad Mini-Trans-Blot® Cell	Bio-Rad; München; Deutschland
Bio-Rad Power Pack HC 250 V	Bio-Rad; München; Deutschland
Electrophoresis Power Supply Consort EV231	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Fusion-SL 3500.WL Imaging System	Peqlab; Erlangen; Deutschland
Heracell 240i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fischer Scientific; Waltham; USA
Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific; Waltham; USA
Heraeus Cytosperm 2 CO ₂ -Inkubator	Thermo Fischer Scientific; Waltham; USA
Heraeus Pico 17 Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific; Waltham; USA
Hettich Mikro 220 R Zentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen; Deutschland
Hettich Universal 320R Zentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen; Deutschland
Hettich 1617 Rotor	Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen; Deutschland
Hettich 1195-A Rotor	Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen; Deutschland
Infinite M PLEX	Tecan; Männedorf; Schweiz
Labnet Heitzblock D1302-230 V	Labnet Internationals; Edison; USA
Magnet-Rührer RH basic 2	IKA; Staufen; Deutschland
Milli-Q Direct 8 Wasseraufbereitung	Merck; Darmstadt; Deutschland
Nikon DS-L4 Steuereinheit	Nikon; Minato; Japan
Nikon Eclipse E600 Mikroskop	Nikon; Minato; Japan
Nikon Eclipse Ts2 Mikroskop	Nikon; Minato; Japan
PerfektBlue Semi-dry Blotter	Peqlab; Erlangen; Deutschland
Perfection V600 Photo scanner	Epson; Suwa; Japan
pH Enomenal	VWR; Radnor; USA

Primoverte Zeiss Mikroskop	Carl Zeiss; Jena; Deutschland
Roche LightCycler 480 Real-Time PCR	Roche; Basel; Schweiz
Rotator 34528	Snijders Scientifics; Tilburg; Niederlande
Stuart Rotator SB3	Bibby Scientifics; Staffordshire; UK
Thermomixer HLC	Science Service GmbH; München; Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
UV-Tisch	bts Biotech Trade & Service GmbH; Kraichtal; Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries; New York; USA
VWR® Power Source 250 V	VWR; Radnor; USA
VWR® Rocker Plattform	VWR; Radnor; USA
Wasserbad Laura Aqualine AI 18	Lauda; Königshofen; Deutschland

6.3.2. Software-Liste

BioRender	BioRender.com (2021)
Fusion Software v17	Peqlab; Erlangen; Deutschland
ImageJ Fiji 1.53c	ImageJ; Wayne Rasband; Open Source (Schindelin et al., 2012)
LightCycler 480 Software 1.5	Roche; Basel; Schweiz
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation; Redmond; USA
Microsoft Paint 2004	Microsoft Corporation; Redmond; USA
NIS-Elements AR 4.12.00	Nikon; Minato; Japan
NIS-Elements L	Nikon; Minato; Japan
Origin 8.5.1	Origin Lab; Northampton; USA
PhotoScape 3.7	Mooii Tech; Korea
Tecan i-control	Tecan; Männedorf; Schweiz

6.4. Literaturverzeichnis Anhang

- Chalfant, C. E., S. Ohno, Y. Konno, A. A. Fisher, L. D. Bisnauth, J. E. Watson, D. R. Cooper (1996): A carboxy-terminal deletion mutant of protein kinase C beta II inhibits insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 10, 10/1996, S. 1273–1281.
- Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical journal* 351, Pt 1/2000, S. 95–105.
- Defauw, J. M., M. M. Murphy, G. E. Jagdmann, H. Hu, J. W. Lampe, S. P. Hollinshead, T. J. Mitchell, H. M. Crane, J. M. Heerding, J. S. Mendoza, J. E. Davis, J. W. Darges, F. R. Hubbard, S. E. Hall (1996): Synthesis and protein kinase C inhibitory activities of acyclic balanol analogs that are highly selective for protein kinase C over protein kinase A. *Journal of medicinal chemistry* 39, 26/1996, S. 5215–5227.
- Evenou, J.-P., J. Wagner, G. Zenke, V. Brinkmann, K. Wagner, J. Kovarik, K. A. Welzenbach, G. Weitz-Schmidt, C. Guntermann, H. Towbin, S. Cottens, S. Kaminski, T. Letschka, C. Lutz-Nicoladoni, T. Gruber, N. Hermann-Kleiter, N. Thuille, G. Baier (2009): The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 330, 3/2009, S. 792–801.
- Faul, M. M., J. R. Gillig, M. R. Jirousek, L. M. Ballas, T. Schotten, A. Kahl, M. Mohr (2003): Acyclic N-(azacycloalkyl)bisindolylmaleimides: isozyme selective inhibitors of PKC β . *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 11/2003, S. 1857–1859.
- Gekeler, V., R. Boer, F. Uberall, W. Ise, C. Schubert, I. Utz, J. Hofmann, K. H. Sanders, C. Schächtele, K. Klemm, H. Grunicke (1996): Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *British journal of cancer* 74, 6/1996, S. 897–905.
- Graff, J. R., A. M. McNulty, K. R. Hanna, B. W. Konicek, R. L. Lynch, S. N. Bailey, C. Banks, A. Capen, R. Goode, J. E. Lewis, L. Sams, K. L. Huss, R. M. Campbell, P. W. Iversen, B. L. Neubauer, T. J. Brown, L. Musib, S. Geeganage, D. Thornton (2005): The protein kinase C β -selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer research* 65, 16/2005, S. 7462–7469.
- Gschwendt, M., S. Dieterich, J. Rennecke, W. Kittstein, H.-J. Mueller, F.-J. Johannes (1996): Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Inhibition from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Letters* 392, 2/1996, S. 77–80.
- Gschwendt, M., H. J. Müller, K. Kielbassa, R. Zang, W. Kittstein, G. Rincke, F. Marks (1994): Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* 199, 1/1994, S. 93–98.
- Herbert, J. M., J. M. Augereau, J. Gleye, J. P. Maffrand (1990): Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications* 172, 3/1990, S. 993–999.
- Howcroft, T., R. R. Lindquist (1991): The protein kinase C inhibitor 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7) inhibits PMA-induced promiscuous cytolytic activity but

- not specific cytolytic activity by a cloned cytolytic T lymphocyte. *Biochemical and biophysical research communications* 179, 2/1991, S. 720–725.
- Jirousek, M. R., J. R. Gillig, C. M. Gonzalez, W. F. Heath, J. H. McDonald, D. A. Neel, C. J. Rito, U. Singh, L. E. Stramm, A. Melikian-Badalian, M. Baevsky, L. M. Ballas, S. E. Hall, L. L. Winneroski, M. M. Faul (1996): (S)-13-(dimethylamino)methyl-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16, 21-dimetheno-1H, 13H-dibenzoc,pyrrolo[3,4-h]1,4,13-oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-dione (LY333531) and related analogues: isozyme selective inhibitors of protein kinase C beta. *Journal of medicinal chemistry* 39, 14/1996, S. 2664–2671.
- Khan, W. A., R. Dobrowsky, S. El Touny, Y. A. Hannun (1990): Protein kinase C and platelet inhibition by D-erythro-sphingosine: Comparison with N,N-dimethylsphingosine and commercial preparation. *Biochemical and biophysical research communications* 172, 2/1990, S. 683–691.
- Martiny-Baron, G., M. G. Kazanietz, H. Mischak, P. M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marmé, C. Schächtele (1993): Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *Journal of Biological Chemistry* 268, 13/1993, S. 9194–9197.
- Mochly-Rosen, D., K. Das, K. V. Grimes (2012): Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature reviews. Drug discovery* 11, 12/2012, S. 937–957.
- Niu, C., D. H. Boschelli, L. N. Tumey, N. Bhagirath, J. Subrath, J. Shim, Y. Wang, B. Wu, C. Eid, J. Lee, X. Yang, A. Brennan, D. Chaudhary (2009): First generation 5-vinyl-3-pyridinecarbonitrile PKC θ inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 20/2009, S. 5829–5832.
- Ogiwara, T., T. Negishi, C. L. Chik, A. K. Ho (1998): Differential effects of two protein kinase C inhibitors, calphostin C and Gö6976, on pineal cyclic nucleotide accumulation. *Journal of neurochemistry* 71, 4/1998, S. 1405–1412.
- Rohlf, C., M. V. Blagosklonny, E. Kyle, A. Kesari, I. Yi Kim, D. J. Zelner, F. Hakim, J. Trepel, R. C. Bergan (1998): Prostate cancer cell growth inhibition by tamoxifen is associated with inhibition of protein kinase C and induction of p21^{waf1/cip1}. *The Prostate* 37, 1/1998, S. 51–59.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 7/2012, S. 676–682.
- Shafir, E., E. Ziv, H. Reuveni, M. Niv (2006): PROTEIN KINASE C INHIBITORS FOR PREVENTION OF INSULIN RESISTANCE AND TYPE 2 DIABETES. US20050694691P C07K14/47;A61K38/00;C07K7/06;C07K14/81;C12N15/09.
- Slosberg, E. D., Y. Yao, F. Xing, A. Ikui, M. R. Jirousek, I. B. Weinstein (2000): The protein kinase C beta-specific inhibitor LY379196 blocks TPA-induced monocytic differentiation of HL60 cells the protein kinase C beta-specific inhibitor LY379196 blocks TPA-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Molecular carcinogenesis* 27, 3/2000, S. 166–176.
- Tamaoki, T. (1991): [28] Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors. In: *Protein Phosphorylation Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, and Protein Phosphatases*. Elsevier, S. 340–347.
- Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, F. Tomita (1986): Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipidCa⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 135, 2/1986, S. 397–402.
- Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle (1991): The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 266, 24/1991, S. 15771–15781.

- Tumey, L. N., N. Bhagirath, A. Brennan, N. Brooijmans, J. Lee, X. Yang, D. H. Boschelli (2009): 5-Vinyl-3-pyridinecarbonitrile inhibitors of PKC θ : optimization of enzymatic and functional activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17, 23/2009, S. 7933–7948.
- Wagner, J., P. von Matt, R. Sedrani, R. Albert, N. Cooke, C. Ehrhardt, M. Geiser, G. Rummel, W. Stark, A. Strauss, S. W. Cowan-Jacob, C. Beerli, G. Weckbecker, J.-P. Evenou, G. Zenke, S. Cottens (2009): Discovery of 3-(1H-indol-3-yl)-4-2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-ylpyrrole-2,5-dione (AEB071), a potent and selective inhibitor of protein kinase C isoforms. *Journal of medicinal chemistry* 52, 20/2009, S. 6193–6196.
- Ward, N. E., C. A. O'Brian (1992): Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine: evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates. *Molecular pharmacology* 41, 2/1992, S. 387–392.
- Whitson, E. L., T. S. Bugni, P. S. Chockalingam, G. P. Concepcion, X. Feng, G. Jin, M. K. Harper, G. C. Mangalindan, L. A. McDonald, C. M. Ireland (2009): Fibrosterol sulfates from the Philippine sponge *Lissodendoryx (Acanthodoryx) fibrosa*: sterol dimers that inhibit PKC ζ . *The Journal of organic chemistry* 74, 16/2009, S. 5902–5908.
- Wilkinson, S. E., P. J. Parker, J. S. Nixon (1993): Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *The Biochemical journal* 294 (Pt 2), 1993, S. 335–337.
- Yonezawa, T., R. Kurata, M. Kimura, H. Inoko (2009): PKC delta and epsilon in drug targeting and therapeutics. *Recent patents on DNA & gene sequences* 3, 2/2009, S. 96–101.
- Zarate, C. A., J. B. Singh, P. J. Carlson, J. Quiroz, L. Jolkovsky, D. A. Luckenbaugh, H. K. Manji (2007): Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar disorders* 9, 6/2007, S. 561–570.

Danksagung

Vorweg danke ich der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung dieses Forschungsprojektes. Ich bedanke mich außerdem bei der Facility Massenspektrometrie Halle (Saale) für das Durchführen der Massenspektrometrie-Experimente. Zudem danke ich der Arbeitsgruppe Magin dafür, dass sie mir die DSP-KO-Zellen zur Verfügung gestellt haben und Dr. M. Schutkowski dafür, dass er sich bereiterklärt hat, diese Arbeit als Repräsentant des biochemischen Instituts zu betreuen. Des Weiteren danke ich Dr. Keil und Dr. Rietscher für die Generierung der übrigen Zelllinien und die Einarbeitung in dieses Projekt. Herzlichen Dank zudem an Andrej Mun für die methodische Einarbeitung und an Lisa Müller für die Unterstützung in der Zellkultur. Generell möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet haben und selbstverständlich bei allen Mitgliedern der AG Hatzfeld für die schöne gemeinsame Zeit und die konstruktiven Gespräche. Zu guter Letzt bedanke ich mich aufrichtig bei Frau Dr. M. Hatzfeld, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, für die wissenschaftliche Diskussionen, Beratung und Betreuung dieser Promotion. Und selbstverständlich ein herzliches Dankeschön, dafür dass ich die Zeit in ihrer Arbeitsgruppe verbringen durfte.

Lebenslauf

Name	Marvin Erdmann Neuholz
Wohnort	06110 Halle (Saale)
Geb.	19.01.1993 (Lüneburg, Deutschland)

Berufliche Laufbahn

April 2017 – Dezember 2020	Wissenschaftlicher Mitarbeiter AG Hatzfeld, Molekulare Medizin, Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
----------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ausbildung

2017- heute	Promotion Biochemie Angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat.
2014-2016	Masterstudium Biochemie an der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Master of Science (M. Sc) Titel: "Entwicklung neuer peptidbasierender Sirtuin 5 Inhibitoren" AG Schutkowski
2011-2014	Bachelorstudium Biochemie an der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc) Titel: "3D-QSAR-Untersuchungen von Palm I-Inhibitoren der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis C- Virus" AG Thondorf
2004-2011	Wilhelm-Raabe-Schule Lüneburg Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Publikationsliste (1)

Müller, L., K. Rietscher, R. Keil, **M. Neuholz**, M. Hatzfeld (2020): Plakophilin 3 phosphorylation by ribosomal S6 kinases supports desmosome assembly. Journal of cell science 133, 8/2020.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden und, dass die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind. Des Weiteren erkläre ich, dass diese Arbeit an keiner weiteren Einrichtung eingereicht wurde und dies mein erster Promotionsversuch ist. Ebenfalls versichere ich, dass keine Vorstrafen vorliegen und keine laufenden Verfahren gegen mich laufen.

Halle (Saale), den 08.07.21

Marvin E. Neuholz