

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL
CÁNCER (CSIC-USAL)

Desmoplakina y Plakophilina-1a: Estructura, Distribución Subcelular e Interacciones

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR PRESENTADA POR

Ana María Carballido Vázquez

Bajo la dirección del Doctor

José M de Pereda Vega

Salamanca, 2014

Dr. JOSÉ MARÍA DE PEREDA VEGA, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, CSIC-Universidad de Salamanca).

CERTIFICA:

Que Dña. Ana María Carballido Vázquez, licenciada en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “***Desmoplakin and plakophilin-1a: Structure, subcellular distribution, and interactions***”, y considera que éste reúne originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el Tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca, 15 de Diciembre de 2014

Dr. José María de Pereda Vega

Director de la tesis

Ana M Carballido Vázquez ha realizado esta tesis doctoral siendo beneficiaria de una ayuda predoctoral del programa de Formación de Personal Investigador (BES-2010-038674) del Ministerio de Economía y Competitividad, durante el periodo de septiembre de 2010 a agosto de 2014.

Este trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos del Plan nacional I+D+i “*Bases estructurales de interacciones en hemidesmosomas: integrina $\alpha6\beta4$, BPAG1e y tetraspanina CD151*” (BFU2009-08389) y “*Bases estructurales de la función de plakinas en adhesión celular, implicación en enfermedades*” (BFU2012-32847) financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación, el Ministerio de Economía y Competitividad y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional; y del proyecto del Programa de apoyo a proyectos de investigación de la Consejería de Educación de la junta de Castilla y León titulado “*Plakinas en complejos de adhesión: bases estructurales de su función e identificación de compuestos moduladores*” (CSI181A12-1).

Ana M Carballido Vázquez realizó parte del trabajo de esta tesis durante una estancia de ocho meses en el laboratorio del Prof. Arnoud Sonnenberg en el Netherlands Cancer Institute (NKI) (Ámsterdam, Holanda). Parte de esa estancia estuvo financiada por una ayuda de Estancia Breve (referencia EEBB-I-13-06399) del Ministerio de Economía y Competitividad.

TABLA DE CONTENIDO

<u>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</u>	1
1. Desmosomas	3
2. Componentes de los desmosomas y sus interacciones	4
3. Funciones de los DMs y dinámica del ensamblaje/desensamblaje	5
4. Plakophilinas	6
5. Desmoplakina	7
<u>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</u>	11
<u>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	15
<u>CAPÍTULO 4. RESULTADOS</u>	21
Sección A. Mapeo de los dominios de interacción en el complejo DP-PKP1a	23
1. Mapeo de la región de interacción de PKP1a en DP	25
2. Mapeo de la región de interacción de DP en PKP1a	27
Sección B. Análisis de los determinantes de localización nuclear en PKP1a	29
Sección C. Estudio estructural del dominio plakina de desmoplakina	37
1. Estructura de la región N-terminal del dominio plakina de DP	39
2. Estructura de la región C-terminal del dominio plakina de DP	40
<u>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN</u>	43
Estudio del sitio de interacción de PKP1a en DP	45
Estructura del dominio SR2 de DP	46
Estudio de sitios secundarios de interacción para PKP1 en el SR3 de DP y su relación con la estructura de la mitad N-terminal del PD de DP	46
Estudio del sitio de interacción de DP en PKP1a	47
Identificación de las regiones determinantes de la localización nuclear de PKP1a	48
Estructura de la mitad C-terminal del PD de DP	50
<u>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES</u>	51
<u>REFERENCIAS</u>	55

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Desmosomas

Los desmosomas (DMs) son complejos multi-proteicos que median la adhesión entre células adyacentes. La conexión estable entre células se consigue mediante una red de interacciones proteína-proteína que distribuyen la tensión mecánica entre todas las células, manteniendo la integridad estructural y funcional de los tejidos (Kowalczyk & Green 2013). Los DMs están presentes en todos los tejidos epiteliales y tumores derivados de ellos, así como en tejidos no epiteliales como el músculo cardíaco. Además, son principalmente importantes en tejidos que experimentan estrés mecánico continuado como la piel y el corazón (Franke et al. 2006), siendo de hecho estos tejidos los principales afectados en las enfermedades causadas por defectos en los DMs o las proteínas que los forman. Así, los principales síntomas observados en pacientes con enfermedades desmosomales son fragilidad epidérmica, queratosis palmoplantar y/o cardiomiopatías (Al-Jassar et al. 2013; Delmar & McKenna 2010; Ishida-Yamamoto & Igawa 2014).

Ultraestructuralmente, los desmosomas se ven al microscopio como estructuras simétricas y electrón densas ensambladas en células vecinas. Se necesitan proteínas de tres familias distintas para formar desmosomas completamente funcionales: cadherinas desmosomales, proteínas de la familia armadillo y plakinas (Figura 1). Sin embargo, la composición molecular precisa de los desmosomas es variable ya que la aparición de una u otra isoforma de las proteínas desmosomales depende del estado de diferenciación celular, así como del tejido (Garrod & Chidgey 2008). Esto sugiere que las distintas isoformas de las proteínas desmosomales llevan a cabo funciones específicas para cubrir las necesidades de cada tipo celular o estado de diferenciación.

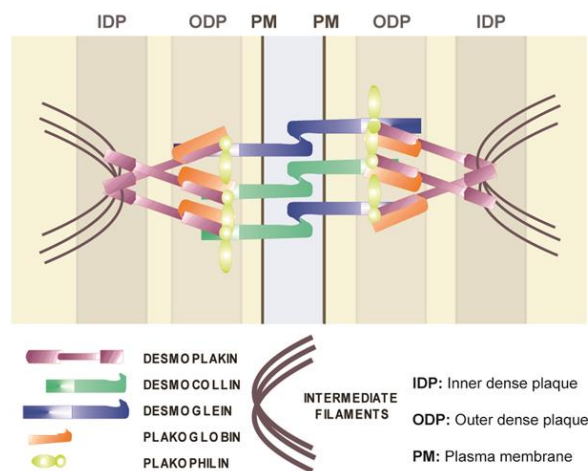


Figura 1. Estructura y composición de los desmosomas. A) Representación esquemática de la composición molecular de los desmosomas y su organización. Las cadherinas desmosomales

(desmogleinas (DSGs, azul) y desmocollinas (DSCs, verde)) interactúan en el espacio extracelular mediante sus dominios C-terminales. Intracelularmente, se unen a proteínas de la familia armadillo (plakoglobina (PKG, naranja) y plakophilinas (PKPs, amarillo)), las cuales median la conexión hasta los filamentos intermedios (IFs, marrón) mediante la interacción con desmoplakina (DP, morado). Las interacciones entre las proteínas de la placa desmosomal y las colas citoplasmáticas de las cadherinas tienen lugar en la placa densa externa (ODP), mientras que el extremo C-terminal de DP se une a los IFs en la placa densa interna (IDP).

2. Componentes de los desmosomas y sus interacciones

Las cadherinas desmosomales pertenecen a la superfamilia de las cadherinas. Las cadherinas son glicoproteínas transmembrana que median la adhesión entre células dependiente de calcio (Saito et al. 2012). En los DMs se combinan dos tipos de cadherinas desmosomales: las desmogleinas, que presentan cuatro isoformas en humanos (DSGs 1-4) y las desmocollinas, con tres isoformas (DSCs 1-3). Ambas, establecen interacciones homo- y hetero-fílicas entre sus dominios extracelulares (Chitaev & Troyanovsky 1997) para crear la superficie de interacción entre células adyacentes. Intracelularmente, interactúan con las proteínas de la placa desmosomal externa (PKG y PKPs).

Las proteínas armadillo (ARM) se caracterizan por la presencia de un dominio central que contiene unidades repetidas de ~42 residuos, los cuales adoptan una conformación en α -hélice (repeticiones ARM) (Choi & Weis 2005; Hatzfeld 1999). La mayor parte de las proteínas-ARM interactúan con muchos y diversos compañeros de interacción mediante el dominio ARM lo que hace que puedan llevar a cabo funciones muy variadas (Tewari et al. 2010). En los DMs dos tipos diferentes de proteínas-ARM unen las colas intracelulares de las cadherinas desmosomales a DP y los IFs: plakoglobina (PKG) y las plakophilinas (PKPs).

Desmoplakina (DP) es un componente esencial de los desmosomas. Perteneció a la familia de las plakinas que conectan los componentes del citoesqueleto a los complejos de unión y adhesión celular (revisado en Bouameur, Favre, & Borradori 2014). En los DMs, DP interactúa con PKG y las PKPs mediante su dominio N-terminal y con los IFs mediante su extremo más C-terminal.

Las interacciones anteriormente descritas se esquematizan en la Figura 2 en donde se pone de manifiesto la compleja red de interacciones que gobierna la arquitectura desmosomal. Concretamente hasta la fecha se han descrito al menos 18 tipos de interacciones entre las proteínas desmosomales (revisado en Harmon & Green 2013).

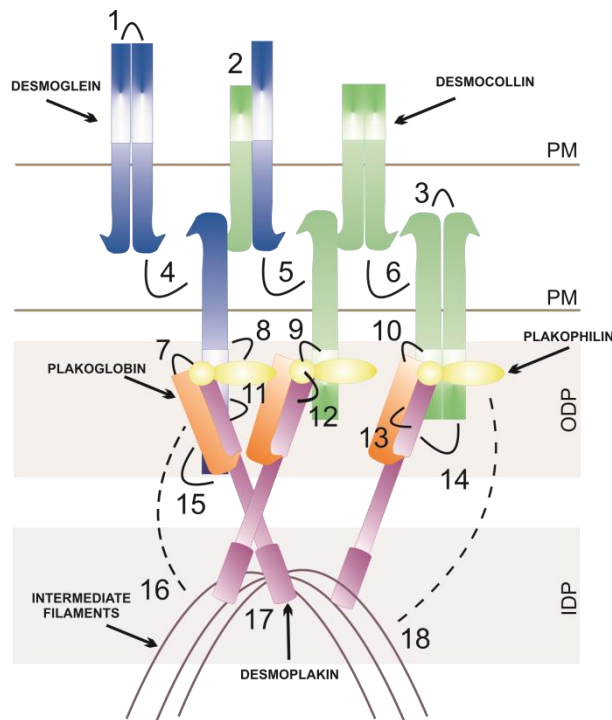


Figura2. Interacciones entre las proteínas desmosomales. Representación esquemática de la organización desmosomal mostrando las principales interacciones entre las proteínas desmosomales publicadas hasta la fecha. Los sitios específicos de interacción no están representados en el diagrama que sólo indica qué proteínas interactúan entre sí. Además, para simplificar la figura se han omitido las isoformas y variantes de las distintas proteínas. PM: membrana plasmática; ODP: placa densa externa; IDP: placa densa interna.

3. Funciones de los DMs y dinámica del ensamblaje/desensamblaje

Durante años los DMs se han considerado simples uniones celulares con una función meramente estructural. Sin embargo, hoy en día se sabe que participan en múltiples procesos regulados por rutas de señalización importantes para la forma y movilidad celular o para el balance entre proliferación y diferenciación. La participación en todos estos procesos requiere una estricta regulación de la dinámica de los DMs que deben ser ensamblados y desensamblados para atender a las necesidades de los tejidos. Esta remodelación de los DMs es de vital importancia en procesos como cierre de heridas y en el desarrollo y morfogénesis.

En queratinocitos en cultivo, los DMs son ensamblados en respuesta a crecimiento en alta densidad o aumento de los niveles de calcio extracelular (Bikle et al. 2013; Kimura et al. 2007). La diferenciación de los queratinocitos debida al aumento de calcio intracelular es similar al patrón de diferenciación de estas células en la epidermis donde hay un gradiente de calcio desde la capa basal al *stratum granulosum* (Kimutai et al. 2002) y por ello se ha usado extensamente para el control de la formación de DMs *in vitro*. La importancia de la regulación por calcio se ve también reflejada en la

aparición de enfermedades relacionadas con un mal funcionamiento de la homeostasis del calcio, como es la enfermedad de Darier o la enfermedad Hailey-Haley (Leinonen et al. 2009).

4. Plakophilinas

Las plakophilinas son proteínas específicas de vertebrados que, en base a su secuencia primaria, han sido clasificadas dentro de la subfamilia p120-catenina. Esta familia la componen siete miembros de los que sólo las plakophilinas están presentes en los DMs en vez de en las uniones adherentes (AJs) (Carnahan et al. 2010).

Estructuralmente, las PKPs se caracterizan por presentar nueve repeticiones armadillo. Entre el quinto y sexto dominio existe una secuencia espaciadora que actúa de bisagra y le confiere a las PKPs una característica forma doblada (PDB: 1XM9; Choi & Weis 2005). El dominio ARM está flanqueado por un extremo N-terminal considerablemente largo y un extremo C-terminal muy corto. La región N-terminal de las PKPs (dominio cabeza) no presenta estructura secundaria conocida y se le considera mayormente desordenada. Además, no presenta homología entre las tres PKPs, tan solo una pequeña región cerca de extremo N-terminal denominada región de homología 2 (HR2) muestra cierto grado de similitud entre las PKPs (Bonné et al. 1999). Todas las proteínas conocidas que interactúan con las PKPs lo hacen a través del dominio cabeza lo que contrasta con el resto de proteínas armadillo que interactúan a través del dominio armadillo (Huber et al. 1997; Choi & Weis 2005) (Figura 3).

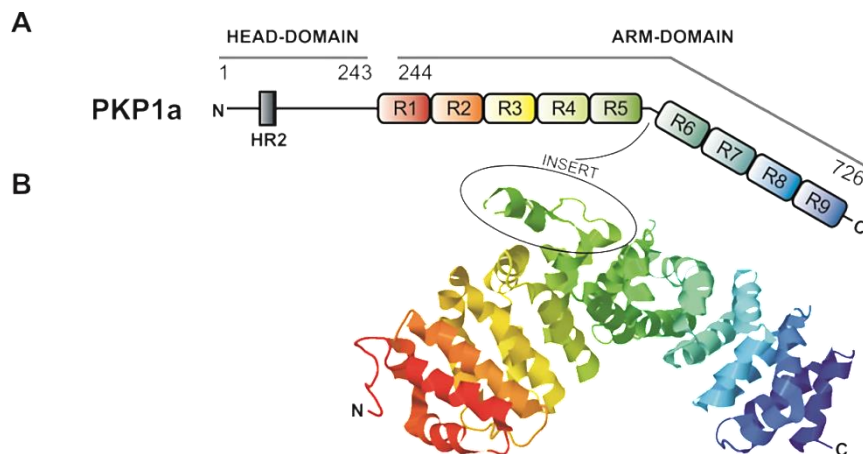


Figura 3. Estructura multidominio de plakophilina 1a. A) Representación esquemática de la organización en dominio de PKP1a. **B)** Estructura cristalográfica del dominio armadillo de PKP1a (PDB: 1XM9).

Las PKPs muestran patrones de expresión complejos y a veces solapantes. PKP2 tiene la localización más amplia, estando presente en todas las células epiteliales

proliferativas así como en tejidos no epiteliales como el corazón (Rickelt 2012). PKP3 también presenta una distribución amplia pero no aparece en los DMs de cardiomiocitos o hepatocitos (Bonné et al. 2003). PKP1 sin embargo se localiza en los DMs de epitelios complejos y transicionales pero no en epitelios simples (Moll et al. 1997). Las tres PKPs presentan dos isoformas. Una corta “a” y una larga “b” debido a procesamiento alternativo de los genes (Schmidt et al. 1997; Mertens et al. 1996; Mühmer et al. 2014). Las isoformas también presentan distintos patrones de expresión.

Las PKPs aumentan la cohesión entre células reclutando a otros componentes desmosomales a los DMs. Además actúan como puentes que unen las cadherinas desmosomales a DP y los IFs (Chen et al. 2002; Bonné et al. 2003; Bornslaeger et al. 2001). PKP1 incrementa el número y tamaño de los DMs cuando es sobre-expresada en células en cultivo lo que concuerda con la alta expresión de PKP1 en las capas suprabasales de la epidermis que contiene muchos DMs de gran tamaño (Kowalczyk et al. 1999; Hatzfeld et al. 2000; South et al. 2003; South 2004).

Además de su función en los DMs, las PKPs también participan en otros procesos como la reorganización del citoesqueleto de actina, el control del crecimiento y la migración celular o la síntesis de proteínas (revisadas en Hatzfeld, Wolf, & Keil 2014; ver ejemplos en Godsel et al. 2010; Hatzfeld et al. 2000; Hofmann et al. 2006; Koetsier et al. 2014; Mertens et al. 2001; Wolf et al. 2010). Relacionado con esto, las PKPs han sido observadas en el núcleo tanto de células que forman DMs, como en células que no los forman (Schmidt et al. 1997; Mertens et al. 1996; Bonné et al. 1999). Aunque la localización nuclear ha sido demostrada para todas las PKPs, PKP1 es la más prominente en el núcleo por lo que probablemente su localización nuclear es regulada por distintos mecanismos. La función de las PKPs en el núcleo no se conoce en la actualidad y sólo se han descrito ciertas interacciones que podrían estar relacionadas con esta localización como la interacción entre PKP2 y la RNA-polimerasa III, la de PKP3 con el factor de transcripción ETV1/ER81 y la de PKP1 con DNA de cadena sencilla (Mertens et al. 2001; Sobolik-Delmaire et al. 2010; Munoz et al. 2014).

5. Desmoplakina

Desmoplakina (DP) pertenece a la familia de las plakinas que son proteínas multimodulares que interconectan elementos del citoesqueleto con las uniones de membrana. Dichas interconexiones contribuyen a la forma y polaridad celular. Además, las plakinas participan en procesos dinámicos como migración celular o

diferenciación actuando como adaptadores de proteínas de señalización celular (para una revisión ver Bouameur et al. 2014 o Sonnenberg & Liem 2007).

La familia de las plakinas en mamíferos está compuesta por 7 miembros pero sólo DP está presente en los DMs en donde es un componente esencial. DP también está presente en uniones especializadas como el *area composita* presente en cardiomiocitos (Franke et al. 2006).

DP presenta la típica estructura multi-modular de las plakinas con un dominio N-terminal denominado dominio plakina de alrededor de 1000 residuos y compuesto principalmente de estructura secundaria en α -hélice. Después, una región central compuesta por un dominio coiled-coil de homodimerización, responsable de la formación de dímeros paralelos (Keefess et al. 1989). Por último, el dominio C-terminal cuenta con tres dominios de repetición de plakina designados A, B y C y regiones reguladoras que participan en la unión a IFs (Sonnenberg & Liem 2007; Kouklis et al. 1994) (Figura 4).

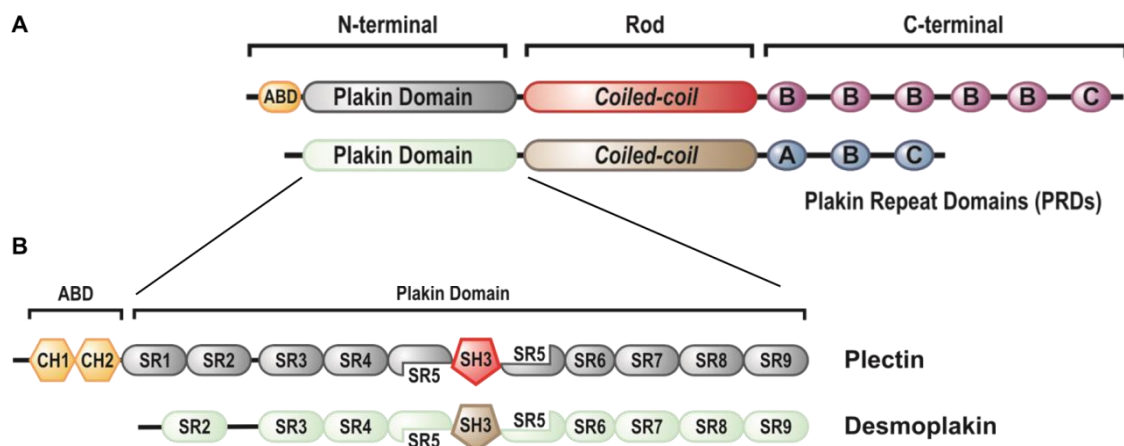


Figura 4. Representación esquemática de la estructura multi-modular de plectina y desmoplakina.

A) Representación esquemática de la estructura del dominio plakina de plectina y desmoplakina. Ambas proteínas comparten la organización tripartita. **B)** Detalle de la organización en dominios del dominio plakina de plectina y desmoplakina. Plectina contiene 9 dominios de repetición de espectrina (SRs) (Ortega et al. 2011), mientras que a DP le falta el primero (SR1) por lo que sólo se compone de 8 SRs. En el extremo más N-terminal plectina presenta un dominio ABD compuesto por un par de dominios de homología a calponina (CH1 y CH2).

Basándose en análisis de conservación de secuencia se ha sugerido que el dominio plakina de DP está compuesto por 6 SRs (SR3-SR6, SR8-SR9). Sin embargo, modelado por homología basado en la estructura atómica de regiones del dominio plakina de plectina (datos no publicados) sugieren que en el dominio plakina de DP también están presentes el SR2 y el SR7. Los dominios SR2 y SR3 están separados por una secuencia espaciadora de aproximadamente 20 residuos mientras que los

otros SRs están unidos por hélices continuas desde un SRs al siguiente. Como en otras plakinas un dominio SH3 está insertado en el SR5 (Jefferson et al. 2007). Aparentemente, el SH3 en plakinas cumple una función estructural, probablemente aportando estabilidad al dominio plakina, pues no puede establecer interacciones con otras proteínas porque la interfaz canónica de interacción está ocluida por interacciones hidrofóbicas con residuos del dominio plakina (Ortega et al. 2011). El dominio plakina de DP es importante para dirigir a la proteína a los DMs y para interactuar con PKG y las PKPs (Bornslaeger et al. 2001; Kowalczyk et al. 1999; Kowalczyk et al. 1997).

En humanos DP existe en 2 isoformas (DPI / DPII) debido al procesamiento alternativo del gen primario en la zona del dominio central (Keefess et al. 1989). Además se ha descrito una tercera isoforma menor denominada DPIa con un tamaño intermedio a las anteriores (Cabral et al. 2010).

Mutaciones en DP se relacionan con severas enfermedades que afectan a la piel, pelo, uñas y dientes, así como al corazón (revisado en Cheong, Wessagowit & McGrath 2005). Así, ratones deplecionados totalmente para DP (Gallicano et al. 2009) o condicionales en la epidermis (Vasioukhin et al. 2001) mueren tempranamente después del nacimiento. Esto ratones presentan DMs que ultraestructuralmente parecen normales pero que están completamente faltos de uniones a IFs lo que resulta en el fatal desenlace. Por lo tanto, aunque DP parece no ser necesaria para el ensamblaje de los DMs sí que lo es para formar DMs funcionales.

Fuera de los DMs, DP ha sido implicada en la organización de los microtúbulos, el control de la forma y tamaño de la microvilli en el epitelio intestinal y en la formación y estabilización de la microvasculatura (Lechler & Fuchs 2007; Sumigray & Lechler 2012; Zhou et al. 2004; Gallicano et al. 2001).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Conocer como las proteínas desmosomales están asociadas desde un punto de vista estructural proporciona información útil sobre la función de las proteínas, la organización de los DMs e incluso su regulación (ver un ejemplo en Garrod et al. 2005). Este conocimiento es fundamental para entender como las células mantienen su forma y polaridad, regulan su movimiento, la adhesión a sus vecinas o mecanotransducen señales originadas en las uniones célula-célula.

El objetivo principal de esta tesis profundizar en el conocimiento de la organización de los DMs mediante el estudio y caracterización de dos de sus proteínas, DP y PKP1a, y sus interacciones. Para alcanzar este objetivo principal se han fijado los siguientes objetivos secundarios:

- i) Mapear de manera precisa los sitios de interacción implicados en la formación del complejo DP-PKP1a
- ii) Identificar las regiones que gobiernan la localización subcelular de DP y PKP1a
- iii) Estudiar en profundidad la estructura del dominio plakina de DP

Estos objetivos se han abordado con una estrategia multidisciplinar con la que ha sido posible delimitar las zonas de reconocimiento DP-PKP1a en ambas moléculas. Además, hemos identificado las regiones necesarias para la localización desmosomal o nuclear de PKP1a y obtenido una visión integral de la estructura del dominio plakina de DP.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos utilizados para el desarrollo de este trabajo se pueden englobar dentro de tres categorías principales: (i) materiales y métodos de biología molecular, (ii) materiales y métodos de biología celular, (iii) materiales y métodos biofísicos.

i) Los materiales y métodos de biología molecular se han usado principalmente para hacer el clonaje de la amplia colección de proteínas recombinantes utilizada en la tesis. Resumiendo, tras la obtención del cDNA específico para DP, PKP1a, PKP2a y PKG las construcciones fueron amplificadas por PCR y clonadas en los vectores indicados mediante metodologías estándar de biología molecular. Todas las construcciones fueron secuenciadas antes de usarse. Los cebadores utilizados para amplificar los cDNAs de DP, PKP1a, PKP2a y PKG tienen entre 29 y 46 bases de largo y una temperatura de fusión de ~60°C. Incluyen además secuencias reconocidas por enzimas de restricción específicas y en caso de ser necesario otros elementos como codones de parada (TAG) o la secuencia Kozak (Kozak 1986). Dependiendo del tipo de experimento se han utilizado distintos vectores para expresar las proteínas de fusión:

- Vectores de expresión en bacterias: se utilizó pBluescript SK (-) (Agilent technologies) para hacer modificaciones en el DNA como mutagénesis. Además, se utilizó el vector pETEV15b que es un derivado del vector pET15b (Novagen) para la expresión de proteínas con una etiqueta de ocho histidinas (Alonso-García et al. 2009). Para las construcciones que queríamos expresar en bacterias sin ninguna etiqueta (DP-CT-GCN4-22b) se utilizó el vector pET22b (Novagen).

- Vectores de expresión en células de mamífero: Se utilizaron los vectores pCEFLAG y pCEFLHA (Chiariello et al. 2000) para producir proteínas de fusión con la etiqueta FLAG y HA, respectivamente. Estas construcciones se utilizaron en experimentos de co-inmunoprecipitación y para estudios de localización subcelular mediante inmunofluorescencia. Además, se utilizaron los vectores pcDNA3-CFP y pcDNA3-Venus para crear proteínas de fusión con una etiqueta fluorescente (CFP o Venus). Estos vectores fueron creados y modificados en nuestro laboratorio utilizando el vector vacío pcDNA3 (Invitrogen) y los cDNAs de CFP y Venus gentilmente cedidos por el Prof. A. Sonnenberg (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam; The Netherlands). Se crearon versiones de estos vectores con las etiquetas CFP y Venus tanto en el extremo amino, como en el carboxilo.

Todas las construcciones han sido mantenidas en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α y purificadas usando el GeneJET™ Plasmid Miniprep or Maxiprep Kits (Thermo Fisher Scientific) usando las especificaciones del fabricante.

ii) Dentro de los materiales y métodos de biología celular las distintas líneas celulares utilizadas en la tesis se resumen en la tabla 1, que también incluye las condiciones de cultivo y congelación, los proveedores y referencias seleccionadas sobre cada línea celular.

Tabla 1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Línea celular	Organismo	Tejido	Medio	Medio congelación	Proveedor	Referencias seleccionadas
COS-1	<i>C. aethiops</i>	riñón	DMEM	DMEM + 5-10% DMSO	C. Guerrero (CIC, Salamanca)	(Gluzman 1981)
COS-7	<i>C. aethiops</i>	riñón	DMEM	DMEM + 5-10% DMSO	A. Sonnenberg (NKI, Amsterdam)	(Gluzman 1981)
Hek293T	<i>H. sapiens</i>	riñón	DMEM	DMEM + 5-10% DMSO	A. Sonnenberg (NKI, Amsterdam)	(DuBridge et al. 1987)
NHK	<i>H. sapiens</i>	prepucio	K-SFM	50% SFM + 40% FBS + 10% DMSO	A. Sonnenberg (NKI, Amsterdam)	(Niessen et al. 1996)
HaCaT	<i>H. sapiens</i>	piel	DMEM	50% DMEM + 40% FBS + 10% DMSO	A. Sonnenberg (NKI, Amsterdam)	(Boukamp et al. 1988)
PA-JEB/ β 4	<i>H. sapiens</i>	piel	K-SFM	50% SFM + 40% FBS + 10% DMSO	A. Sonnenberg (NKI, Amsterdam)	(Niessen et al. 1996)
PKP1-null	<i>H. sapiens</i>	piel	K-SFM	50% SFM + 40% FBS + 10% DMSO	AP. South (MRI, Dundee)	(South et al. 2003)

NHK, queratinocitos humanos; PKP1-null, queratinocitos que no expresan PKP1; *C. aethiops*, *Cercopithecus aethiops*; *H. sapiens*, Homo sapiens; K-SFM, medio de queratinocitos sin suero

Las proteínas de fusión fueron transfectadas de manera transitoria utilizando Pei (Polysciences inc.), JetPei (Polyplus transfection) o X-tremeGENE 9/HP (Roche). Para los experimentos que necesitaban extractos celulares (Western Blot (WB) y Co-inmunoprecipitación (Co-IPs)) estos se obtuvieron usando un buffer de lisis con 0.5 % Triton X-100. Los WB y las Co-IPs se revelaron utilizando el reactivo ECL (Bio-rad, Thermo o GE Healthcare) o el sistema de imagen en infrarrojo Odyssey (LI-COR, Inc.). Las Co-IP se hicieron usando el gel de afinidad anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich) que se incubó con los extractos celulares durante 1 hora a 4°C. Los resultados de las Co-IPs se revelaron por WB.

Las células utilizadas para inmunofluorescencia y microscopía confocal se crecieron en cubreobjetos. Se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2-4 % y se permeabilizaron con 0.2 % Tritón X-100 antes de incubar con los anticuerpos primarios y secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último se montaron en los cubreobjetos utilizando Mowiol (Calbiochem). Para la detección de PKPs endógenas se utilizaron

distintos procedimientos en función de la localización de las PKPs que se quisiese observar (ver Rickelt, 2012; Schmidt et al., 1997; South et al., 2003). Así, para los experimentos donde se necesitaba ver las PKPs también en el núcleo las células fueron tratadas con 0.2 % Tritón X-100 en PBS por cinco minutos antes de fijarlas. Para teñir el núcleo de las células se utilizó DAPI (Invitrogen), yoduro de propidio (Life Technologies) o TO-PRO-3 (Life Technologies).

Los experimentos de microscopía de vida media de fluorescencia (FLIM) se realizaron utilizando el sistema LIFA (Lambert Instruments Fluorescence lifetime Attachment, Lambert Instruments BV) en un microscopio invertido Leica DM IRE2 (Leica Microsystems) (detalles técnicos en Qiaole Zhao et al., 2012). El par de FRET utilizado fue CFP/Venus. Con CFP se etiquetaron las construcciones de PKP1a mientras que con Venus las de DP. El análisis de los datos de FLIM se realizó con el programa GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc.), utilizando una prueba t de Student de 2 colas con la corrección de Welch (Ruxton 2006). Los p-valor ≤ 0.05 fueron considerados significativos.

iii) Materiales y métodos de biología estructural: Para los estudios estructurales se emplearon principalmente métodos biofísicos que requieren el uso de proteínas purificadas. Las proteínas etiquetadas con una cola de 8 histidinas se produjeron en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)T1 (Studier & Moffatt 1986) tras la adición de 0.2 mM IPTG. Para su purificación las bacterias se lisaron y se recogió la fracción soluble que se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni²⁺ Hi-Trap (GE Healthcare) asociada a un sistema ÄKTA Prime (GE Healthcare). Tras la primera purificación la cola de histidinas fue eliminada utilizando una proteasa TEV y se purificó la proteína de nuevo en una segunda cromatografía de afinidad. Las fracciones que contenían la proteína se dializaron frente al buffer deseado y la proteína se concentró mediante ultra-filtración en celdas Amicon (Millipore). La determinación de la concentración de proteína se realizó midiendo la absorbancia de los amino ácidos aromáticos (A₂₈₀). Con todas las proteínas purificadas se pusieron ensayos de cristalización con al menos 432 condiciones de cristalización tanto a temperatura ambiente, como a 4°C.

El análisis de secuencia se hizo utilizando herramientas bioinformáticas como el repositorio Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), Clustal Omega (Sievers & Higgins 2014) para los alineamientos múltiples, el software HHMER (<http://hmmer.janelia.org/>) (Finn et al. 2011) para la construcción de perfiles HMM o Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred>) (Cole et al. 2008) y PredictProtein

(<https://www.predictprotein.org/>) (Yachdav et al. 2014) para la predicción de estructura secundaria.

Utilizamos dicroísmo circular (CD) para determinar la estructura secundaria de fragmentos del dominio plakina (Kelly, Jess, & Price, 2005 and Ranjbar & Gill, 2009). A partir de la forma de los espectros medidos entre ~187 y 260 nm y mediante el empleo de herramientas bioinformáticas se puede conocer el porcentaje de cada tipo de estructura secundaria presente en una proteína. Además, el estudio de los cambios en las señales de CD al inducir la desnaturalización de la molécula por temperatura o agentes químicos permite estudiar la estabilidad conformacional de las proteínas (Fasman 1996). Los perfiles de desnaturalización fueron realizados por temperatura usando una rampa desde 20 a 90 °C con una tasa de calentamiento de 40 °C/hora. Las medidas se hicieron con una longitud de onda fija de 222 nm. El análisis de los datos de desnaturalización se llevó a cabo mediante el ajuste de los mismos por mínimos cuadrados a un modelo de dos estados que asume un equilibrio entre el estado plegado y el no plegado (Greenfield 2007).

El análisis de estabilidad conformacional también se realizó mediante Thermofluor que se basa en los cambios en fluorescencia de una sonda fluorescente que se une a regiones hidrofóbicas de las proteínas (Pantoliano et al. 2001). Para estos experimentos se utilizó la sonda Sypro Orange (Life Technologies) y un termociclador cuantitativo IQ5 (Biorad). Los datos se midieron cada 0.5°C y la temperatura de fusión de la proteína (T_m) se calculó como el máximo de la derivada de la señal de fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT).

Además, la estructura del dominio plakina de DP se estudió mediante dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) (Mertens & Svergun, 2010; Koch, Vachette, & Svergun, 2003). Mediante esta técnica en donde las proteínas en solución son expuestas a un haz de rayos-X se puede obtener información acerca del tamaño, forma y estado oligomérico de las proteínas basándose en parámetros como el radio de giro (R_g), el volumen de partícula hidratada (V_p) o el tamaño máximo de partícula (D_{max}). Adicionalmente, mediante métodos *ab-initio* se pueden obtener estructuras tridimensionales a baja resolución.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Sección A. Mapeo de los dominios de interacción en el complejo DP-PKP1 α

El mapeo de los dominios de interacción en el complejo DP-PKP1a se realizó combinando tres técnicas diferentes. En primer lugar, se hicieron ensayos de Co-IP a partir de lisados celulares de células COS-1 transfectadas con construcciones etiquetadas con FLAG o HA. Seguidamente, las interacciones se validaron mediante microscopía de fluorescencia (FLIM y ensayos de co-localización) con células COS-7 y queratinocitos transfectados con construcciones etiquetadas con CFP o Venus. Los principales resultados obtenidos son los siguientes:

1. Mapeo de la región de interacción de PKP1a en DP

En células COS, la mitad N-terminal del dominio plakina de DP (DP-NT, región 1-545) interacciona con PKP1 en co-IP y ensayos de FLIM. Además, DP-PD (dominio plakina completo, región 1-1056) y DP-NT son reclutados al núcleo por PKP1a, lo que no ocurre con la mitad C-terminal (DP-CT, región 544-1056). Estos resultados son independientes de la etiqueta utilizada y de la localización de la misma (extremo N- o C-terminal).

Los experimentos de co-localización se realizaron también en tres líneas diferentes de queratinocitos, obteniendo los mismos resultados. Esto apoya la idea de que PKP1a interacciona con DP mediante su mitad N-terminal (Figura 5).

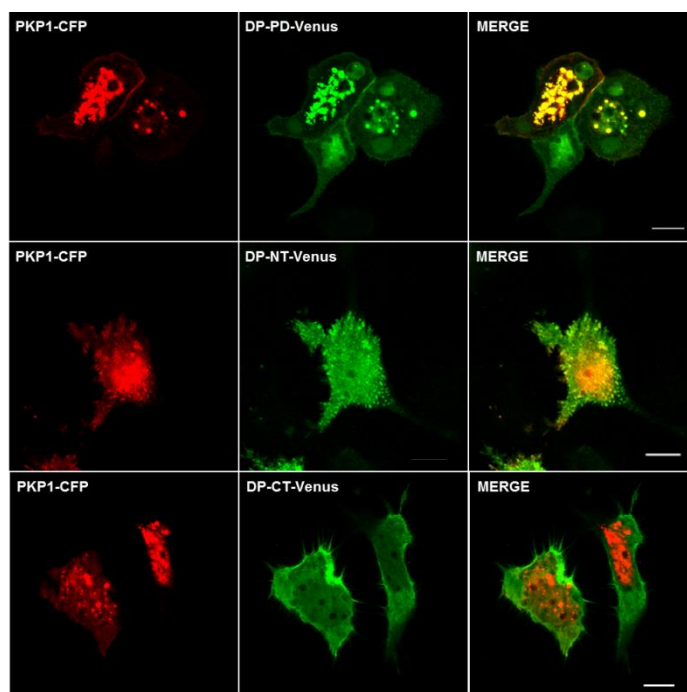


Figura 5. Localización subcelular de PKP1a y fragmentos de DP co-transfectados en PA-JEB/β4. Imágenes de microscopía confocal de PA-JEB/β4 expresando PKP1a y un fragmento de DP, etiquetados con CFP (rojo) o Venus (verde), respectivamente. La co-localización se muestra en la columna de la derecha (MERGE) en amarillo. Barra de escala, 10 μm.

Una vez que confirmamos la mitad N-terminal de DP como la región de interacción de PKP1a, creamos fragmentos de DP de menor tamaño para hacer un mapeado más preciso del sitio de unión de PKP1a. Mediante ensayos de Co-IP pudimos acotar la región de interacción de PKP1a en DP a la región formada por el SR2 (64-170) (Figura 6).

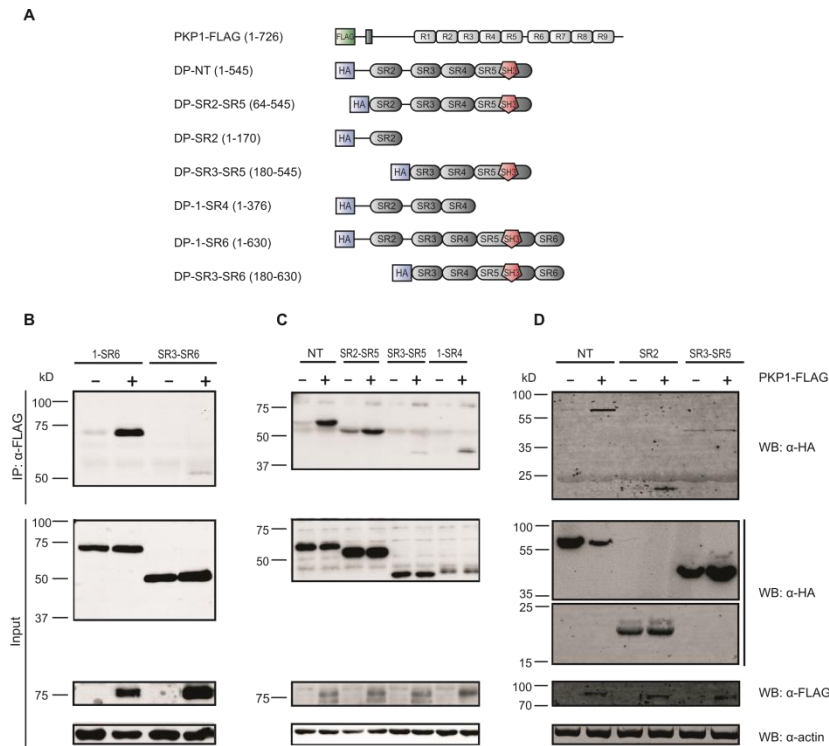


Figura 6. Análisis de la interacción entre PKP1a y fragmentos del N-terminal de DP por Co-IP. A) Representación esquemática de PKP1a etiquetado con FLAG y los distintos fragmentos de DP etiquetados con HA utilizados para los ensayos de Co-IP. **A)** Análisis de la contribución del dominio SR6 a la interacción DP/PKP1a. **B)** Análisis de la contribución del dominio SR5(SH3) a la interacción DP/PKP1a. **C)** Análisis de la contribución del dominio SR2 a la interacción DP/PKP1a.

Utilizando construcciones similares pero con proteínas fluorescentes estos resultados fueron validados por FLIM y por ensayos de co-localización, con resultados muy similares. Así, pudimos concluir que el principal determinante para la interacción de PKP1a en DP se encuentra situado en el dominio SR2 del dominio plakina. Este dominio es necesario y suficiente para la interacción aunque parece que residuos en el dominio SR3 podrían estar contribuyendo también en parte a la interacción pues en algunos experimentos fragmentos que empiezan en el SR3 retienen parte de la interacción entre DP y PKP1a (Figura 7).

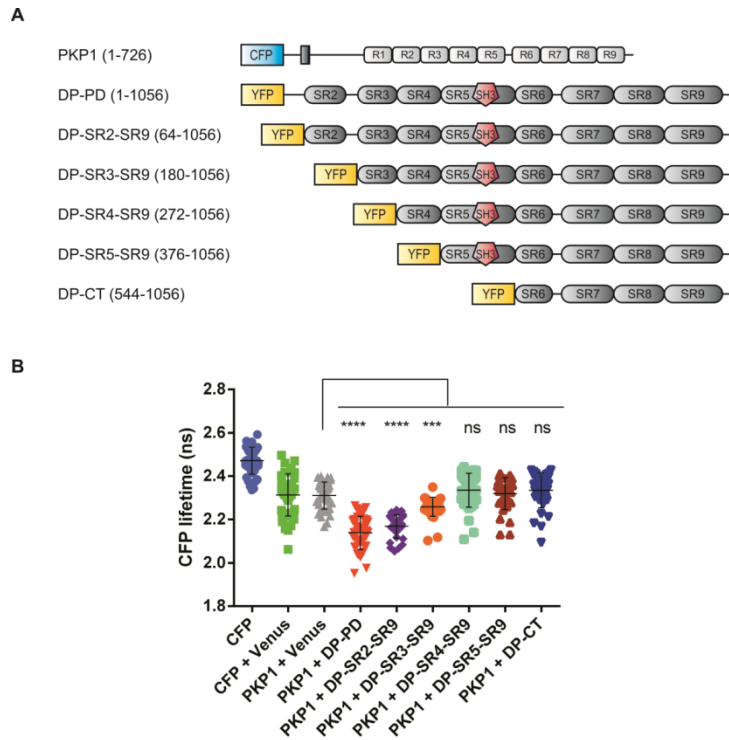


Figura 7. Análisis de la interacción entre PKP1a y DP estudiado mediante FLIM. A) Representación esquemática de las construcciones utilizadas en el experimento. PKP1a está unido por el extremo amino-terminal a CFP, mientras que las construcciones de DP lo están a Venus. **B)** La interacción entre DP y PKP1a se estudió en células COS-7 mediante FLIM y se representa mediante gráficos de dispersión de la vida media de CFP (CFP lifetime). El estudio estadístico se realizó empleando una t de Student con corrección de Welch. Los resultados se indican mediante **** ($p \leq 0.0001$); *** ($p \leq 0.001$); ns, no significativo ($p > 0.05$).

2. Mapeo de la región de interacción de DP en PKP1a

De manera análoga se estudió la región de interacción de DP en PKP1a. Una vez confirmado por los tres métodos (Co-IP, FLIM y co-localización) que DP interactuaba con PKP1a por el dominio cabeza (N-terminal), se intentó conocer de manera más precisa dicha región de interacción. Para ello se crearon nuevos fragmentos que comprenden zonas más pequeñas de esta región y se volvió a ensayar la interacción con DP-PD o DP-NT (Figura 8).

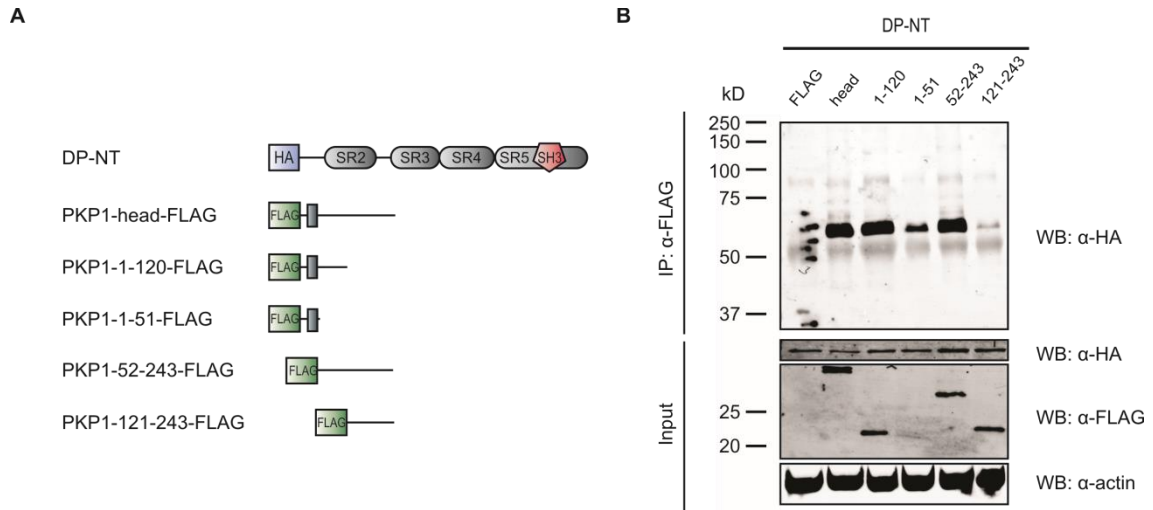


Figura 8. Mapeo del sitio de interacción de DP dentro del dominio cabeza de PKP1a por Co-IP. A) Representación esquemática de DP-NT-HA y los fragmentos de PKP1a etiquetados con FLAG. **B)** Resultados de la Co-IP revelados mediante WB anti-HA. La expresión de las proteínas en los lisados celulares también se evaluó mediante WB anti-HA y anti-FLAG. La β -actina ha sido utilizada como control de carga.

En experimentos de FLIM y co-localización se obtuvieron resultados comparables. En conjunto muestran que la región 52-121 del dominio cabeza de PKP1a es crucial para la interacción de DP.

Una vez delimitada esta región de ~70 residuos fuimos un paso más allá y mapeamos nuevamente la región de interacción dentro de esta región mediante la creación de nuevas construcciones para experimentos de FLIM. Los resultados de estos experimentos permitieron acotar de manera muy precisa la región de interacción de DP en PKP1a en la que participan principalmente los residuos 98-116.

**Sección B. Análisis de los determinantes
de localización nuclear en PKP1 α**

Las regiones importantes para la localización subcelular de PKP1a se estudiaron mediante la creación de un amplio repertorio de fragmentos de PKP1a unidos a una proteína fluorescente (CFP) que se transfectaron de manera transitoria tanto en células que forman desmosomas (queratinocitos), como en células que no los forman o al menos no prominentemente (células COS). La localización subcelular de los distintos fragmentos de PKP1a se estudió mediante microscopía confocal.

Tanto en células COS, como en queratinocitos, PKP1a completo (región 1-726) y el dominio cabeza (región 1-243) se localizan en el núcleo mientras que el dominio armadillo (región 244-726) presenta una localización citoplasmática difusa sin presencia prominente en ningún orgánulo. También comprobamos la localización subcelular de otras proteínas desmosomales tanto mediante inmunofluorescencia de las proteínas endógenas, como sobre-expresando PKG o PKP2a. La localización observada en ambos casos fue la esperada y comparable entre las proteínas expresadas de manera ectópica y las proteínas endógenas. Con estos experimentos pudimos concluir que las proteínas de fusión compuestas por fragmentos de PKP1a y CFP son proteínas funcionales en el sentido de que se pueden incorporar a desmosomas formados en queratinocitos y a la vez presentan una localización subcelular comparable a las proteínas endógenas por lo que son válidas para estudiar los determinantes de la localización nuclear. Por último, como la localización nuclear de PKP1a se observa tanto en células COS, como en queratinocitos se puede también concluir que la función nuclear de PKP1a es independiente de la formación de DMs y por eso el resto de experimentos de localización subcelular los hicimos con células COS-7.

El siguiente paso en la determinación de la región necesaria para la localización nuclear de PKP1a consistió en el análisis de la localización subcelular de una serie de fragmentos de PKP1a que son mutantes de delección del N-terminal cada vez más pronunciados hacia el extremo C-terminal (Figura 9).

Mediante esta colección de fragmentos establecimos la región 116-132 como determinante de la localización nuclear de PKP1a ya que fragmentos cortados hasta el 116 (regiones 1-726, 52-726, 75-726, 98-726, 110-726 y 116-726) todavía presentaban una localización exclusivamente nuclear mientras que sin embargo los fragmentos 132-726, 151-726, 181-726 y el 244-726 (dominio armadillo), perdían la exclusividad nuclear y aparecían difusamente distribuidos en toda la célula. El fragmento 121-726 presentó una distribución intermedia pues aunque ya aparecía en el citoplasma seguía teniendo una localización prominente en el núcleo.

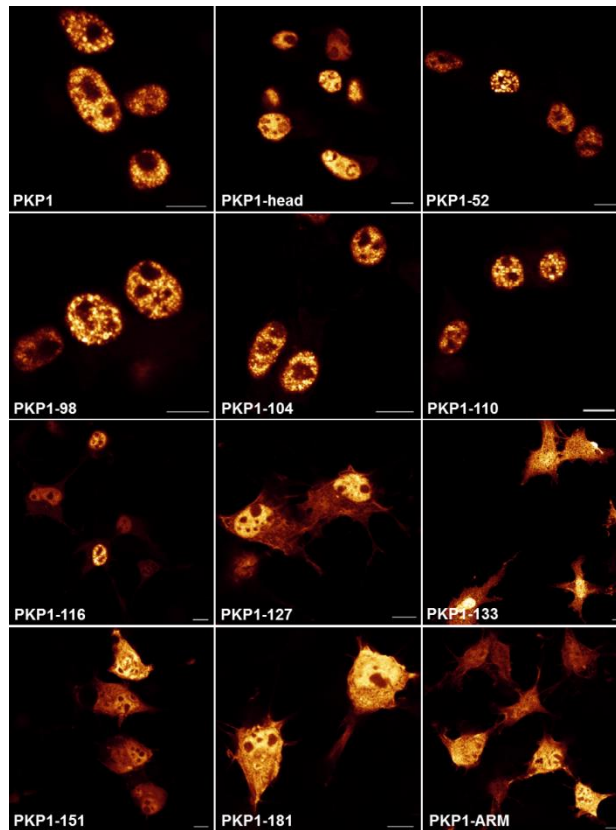


Figura 9. Distribución subcelular de mutantes de delección del N-terminal de PKP1a etiquetados con CFP y expresados en células COS-7. Imágenes de microscopía confocal de células COS-7 transfectadas con cada mutante de delección de PKP1a. La fluorescencia fue detectada tras la excitación de CFP (442 nm). Barra de escala, 10 μ m.

Después quisimos estudiar si esta región determinante para la localización nuclear era también suficiente por sí sola para dirigirse al núcleo. Para ellos transfectamos células COS-7 con el fragmento PKP1-116-132 (región 116-133) pero la distribución subcelular observada era indistinguible de la de CFP libre por lo que creamos dos nuevos fragmentos un poco más largos (PKP1-1-115 (región 1-115) y PKP1-1-132 (región 1-132)). La localización de estos fragmentos tampoco nos ofreció resultados concluyentes pues aunque sí que parece que el fragmento PKP1-132 tiene una localización más prominente en el núcleo, PKP1-115 también aparece. Por tanto, podemos concluir que la región 116-132 aun siendo importante para localización nuclear no es suficiente para localizarse por sí misma en el núcleo.

Teniendo en cuenta la cooperatividad que parece necesaria para el reclutamiento al núcleo de PKP1a nos preguntamos si la región 110-150 sería prescindible en una situación donde estuviesen presentes otras secuencias del dominio cabeza. Para ello construimos mutantes de delección de las regiones 116-132 y de las regiones 110-150. Estos mutantes los hicimos tanto en el dominio cabeza de PKP1, como en la proteína

completa. Sólo la delección de los residuos 110-150 en el dominio cabeza tuvo algún efecto en la localización nuclear de las proteínas. En este caso, además de aparecer en el núcleo aparecían también en el citoplasma. El hecho de que la eliminación de los determinantes principales de localización nuclear no afecte a la localización de los mutantes de delección indica que en realidad el proceso de reclutamiento al núcleo de PKP1a está mediado por múltiples segmentos en el dominio cabeza de esta proteína. Cuando todos son eliminados la proteína pierde la localización nuclear pero cuando alguno está presente, PKP1a continua presente en el núcleo.

Algo que nos intrigaba era que PKP1a nunca parecía estar completamente excluida del núcleo y nos planteamos que los mutantes de delección que no deberían aparecer en el núcleo estuviesen presentes porque estaban homo-asociando con la PKP1 endógena (Hofmann, Mücke, et al. 2000). Para descartar esta posibilidad utilizamos células que están totalmente deplecionadas para PKP1 porque provienen de un paciente con fragilidad dérmica (South et al. 2003). Hicimos experimentos en paralelo con queratinocitos humanos normales y estos queratinocitos que no tienen PKP1 endógena por lo que en ningún caso PKP1-ARM podría estar yendo al núcleo debido a dimerización. No vimos ninguna diferencia en la distribución de los mutantes en ambas células por lo que pudimos concluir que los mutantes de delección de PKP1a no estaban yendo al núcleo por homo-asociación con la proteína endógena.

Lo siguiente que nos planteamos es si podría ser la etiqueta utilizada la que estuviese llevando a los mutantes de PKP1a al núcleo. Para ello estudiamos la localización subcelular de un grupo de construcciones seleccionadas etiquetadas con FLAG y HA. Las construcciones con la etiqueta HA las construimos además en dos vectores distintos (pcDNA3-HA y pCEFLHA). Sorprendentemente, cuando utilizamos los vectores pCEFLAG y pCEFLHA PKP1-ARM (región 244-726) apareció totalmente excluida del núcleo, sin embargo, con el vector pcDNA3-HA y la misma etiqueta HA PKP1-ARM apareció, como en el caso de PKP1-ARM-CFP, mayoritariamente en el citoplasma pero no excluida del núcleo. Por tanto, para estar seguros de que los experimentos realizados con las construcciones etiquetadas con CFP eran válidos, repetimos los experimentos de localización subcelular con unos fragmentos seleccionados obteniendo los mismos resultados en cuanto a la región importante para la localización subcelular de PKP1a. Concretamente, PKP1-75 (región 75-726) y PKP1-116 (116-726) presentaron una localización exclusivamente nuclear mientras que PKP1-151 (región 151-726) y PKP1-ARM (región 244-726) se localizaron solamente en el citoplasma. PKP1-121 (región 121-726) presentó una localización

intermedia apareciendo en ambos compartimentos, al igual que con la etiqueta CFP (Figura 10).

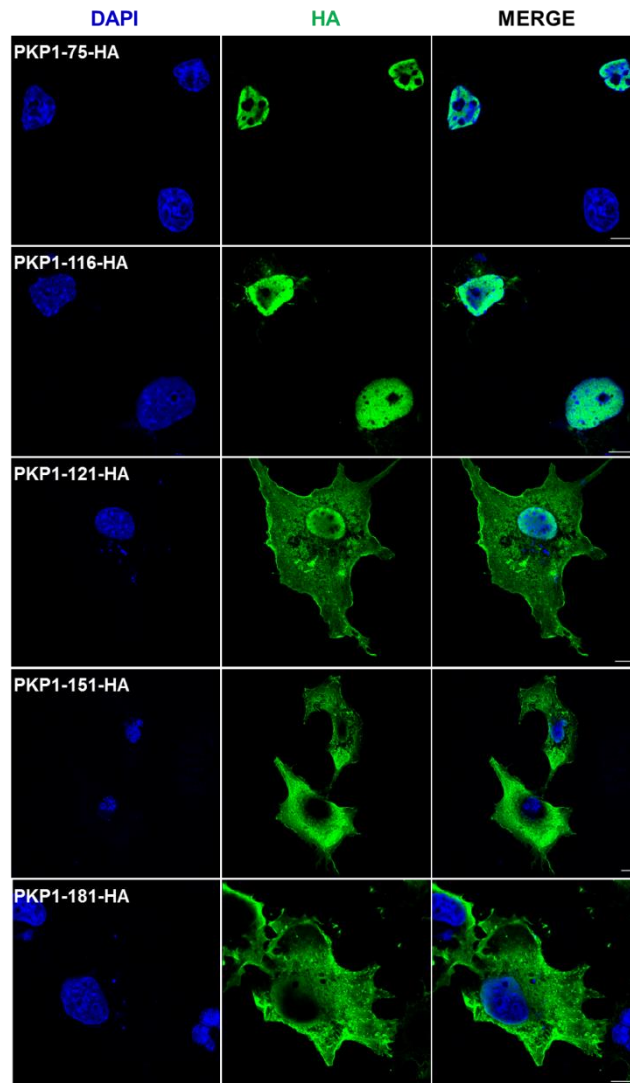


Figura 10. Distribución subcelular de mutantes de delección del N-terminal de PKP1a clonados en pCEFLHA. Imágenes de inmunofluorescencia de mutantes de delección del N-terminal de PKP1a clonados en pCEFLHA (etiqueta-HA). Los fragmentos de PKP1a fueron detectados con un anticuerpo monoclonal anti-HA (16B12, Covance, verde). El núcleo está teñido en azul con DAPI. Barra de escala, 10 μ m.

Por último, dado que la localización de PKP1 está determinada por regiones en el dominio cabeza de la proteína, nos preguntamos si en PKP2 ocurriría lo mismo. Para comprobarlo creamos una colección de mutantes de delección del N-terminal de PKP2 con la etiqueta CFP y estudiamos su localización subcelular mediante microscopía confocal.

Los fragmentos PKP2-65 (región 65-838) y PKP2-151 (región 151-838), presentaron una localización predominante en la membrana plasmática indistinguible de la de la proteína completa. Sin embargo, los fragmentos con delecciones mayores se distribuyeron por toda la célula de manera difusa.

Por tanto, al igual que PKP1, la distribución subcelular de PKP2 está gobernada por regiones en el dominio cabeza pero, en este caso, esas regiones llevan a PKP2 a la membrana plasmática y no al núcleo en células COS-7. Además, teniendo en cuenta todos los resultados, podemos concluir que la presencia en el núcleo de construcciones de PKP1a y PKP2a a las que le falta la secuencia que determina su localización en la célula probablemente no se corresponda a una función nativa sino al efecto de haberle eliminado la secuencia de reconocimiento de localización celular.

Sección C.

**Estudio estructural del dominio
plakina de desmoplakina**

1. Estructura de la región N-terminal del dominio plakina de DP

Desde un punto de vista estructural, la presencia del dominio SR2 de DP ha sido puesta en entredicho por algunos autores (Al-Jassar et al. 2011; Choi & Weis 2011). Estos autores se basan en estudios de conservación de secuencia y análisis de homología de secuencia no supervisados. Sin embargo, nuestros estudios de modelado por homología a partir de la estructura cristalográfica de este dominio en BPAG1 y plectina indican que sí que existe un SR precediendo al SR3.

Para confirmar la presencia de dicho dominio utilizamos en primer lugar herramientas bioinformáticas de análisis de secuencia que predijeron la existencia de estructura secundaria α -hélice en la región que se corresponde con este dominio (~60-155). Además, creamos dos fragmentos de esta región de DP que purificamos y caracterizamos mediante técnicas biofísicas. En primer lugar utilizamos dicroísmo circular para confirmar la predicción de estructura secundaria en α -hélice, obteniendo un porcentaje de hélice alfa de entre un 70 y un 90%. Además, mediante desnaturalización por temperatura estudiamos la estabilidad térmica de estos fragmentos. La temperatura de fusión (T_m) de DP-SR2-L (64-164) fue de 74.2 ± 0.3 °C, mientras que la de la construcción más corta, DP-SR2-S (64-155), fue de 61.1 ± 0.1 °C. La gran diferencia entre la T_m de ambos fragmentos indica que el segmento 156-164 contribuye a la estabilidad térmica del SR2 de DP. Estos experimentos los validamos también utilizando Thermofluor que también mide la estabilidad térmica de los fragmentos pero mediante un ensayo basado en fluorescencia. Con esta técnica obtuvimos resultados comparables que confirmaron que el fragmento largo es más estable que el corto. Todos estos análisis nos permitieron concluir que la región 64-164 de DP forma un dominio estructural ordenado y estable con un alto contenido en hélice alfa compatible con la presencia de un dominio SR en esta región aunque, probablemente, no canónico.

Tras el estudio del fragmento SR2 por separado extendimos el estudio a la región N-terminal completa (región 1-630). En este caso estudiamos la estructura a baja resolución mediante SAXS. A partir de la curva de dispersión obtuvimos parámetros informativos sobre la estructura de la molécula. Resumiendo, podemos decir que la región 1-630 es un monómero en solución que presenta una forma alargada. Además, a partir de los modelos *ab initio* realizados con DALAI_GA sabemos que la estructura está un poco doblada hacia el extremo N-terminal. También realizamos modelados de cuerpo rígido utilizando un modelo atómico compuesto. Para crear este modelo por una parte hicimos un modelado por homología del SR2 de BPAG1e, cuya estructura atómica hemos resuelto en el laboratorio, y lo unimos a la estructura atómica publicada

del fragmento SR3-SR6 de DP (código del PDB: 3R6N). Los modelos de cuerpo rígido se pueden superponer en la envuelta creada mediante modelos *ab initio* con un buen ajuste (Figura 11). Los modelos de cuerpo rígido obtenidos sugieren que el dominio SR2 se encuentra adyacente al SR3 en la estructura lo que permitiría el establecimiento de interacciones entre ambos dominios.

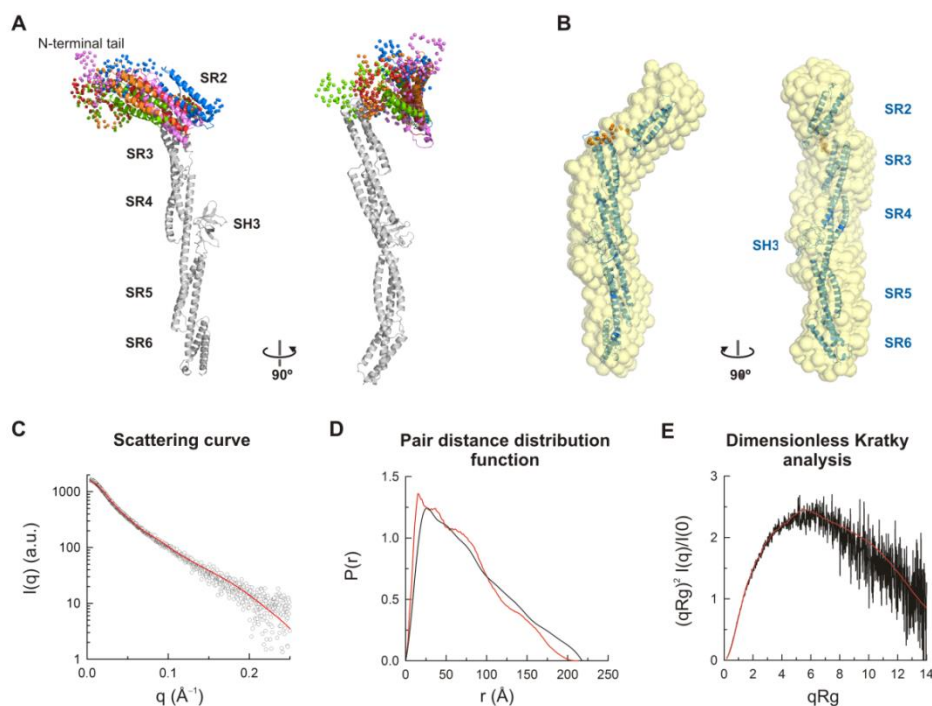


Figura 11. Modelo de la región 1-630 de DP obtenido por modelado de cuerpo rígido. A) Representación de cinco modelos del fragmento 1-630. El SR2 de cada modelo está representado en distintos colores mientras que la región SR3-SR6 se ha representado en gris y es idéntica en todos los modelos. Los segmentos conectores se han modelado como átomos *dummy*. **B)** Superposición de un modelo representativo de los mostrados en A sobre la envuelta calculada con modelos *ab initio*. **C)** Curva de dispersión, función de distribución de distancias y representación de kratky de los datos experimentales (negro) y ajuste de los modelos obtenidos mediante modelado de cuerpo rígido (rojo).

2. Estructura de la región C-terminal del dominio plakina de DP

Después del dominio plakina, las plakinas tienen un dominio de homo-dimerización que se sabe que es el responsable de la formación de dímeros paralelos (Foisner et al., 1991; Green et al., 1992; Wiche, 1998). Para comprobar que nuestras construcciones eran capaces de formar dímeros hicimos un ensayo de homo-asociación utilizando dos construcciones distintas, DP-CT (región 545-1056) que tiene la región más amino terminal del dominio central de homo-dimerización (segmento 1026-1056) y DP-CT-1025 (región 545-1025) que sólo comprende la mitad C-terminal del dominio plakina. Los resultados de los ensayos de homo-asociación en células

COS-1 indicaron que la región 1026-1056 del dominio de dimerización de DP es necesaria y suficiente para que DP forme dímeros en células en cultivo.

Decidimos estudiar mediante SAXS la estructura del fragmento DP-CT (región 545-1056) en solución. Para ello la expresamos en *E. coli* y la purificamos por cromatografía de afinidad. El análisis de los datos de SAXS nos permitió saber que a diferencia de lo que pasa *in vivo*, el segmento 1026-1056 del dominio de dimerización de DP no es suficiente para mediar la oligomerización *in vitro*.

Por tanto, para estudiar la estructura dimérica de la mitad C-terminal del dominio plakina, estabilizamos esta conformación mediante la fusión en el extremo C-terminal del dominio plakina del segmento 249-281 del dominio GCN4 de dimerización (O'Shea et al. 1991). La estructura de este nuevo fragmento (DP-CT-GCN4, región 660-1060 de DP) se estudió mediante SAXS y en este caso, el volumen de Porod (~119 kDa) sí que se corresponde con el de un dímero. El cálculo de la $P(r)$ sugirió una D_{max} ~245 Å. Se generaron modelos *ab initio* utilizando DAMMIF, la envuelta resultante del ponderado de diez modelos independientes es una estructura alargada con unas dimensiones aproximadas de 240 Å x 105 Å x 45 Å.

Además se creó un modelo atómico compuesto del dímero de DP-SR7-SR9 unido a GCN4. La posición de los protómeros se tomó de la posición que ocupan en el cristal del dímero de plectina. La superposición del modelo atómico sobre la envuelta a baja resolución generada con los métodos *ab initio* ofreció un buen ajuste. Sin embargo, el ajuste de los datos teóricos a los datos experimentales hace pensar que aunque sí que parece que el dímero de DP tenga una organización cerrada mediada por contactos inter-protómeros, la organización específica de los dos protómeros de DP puede ser ligeramente distinta a la del dímero de plectina.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Estudio del sitio de interacción de PKP1a en DP

La interacción entre DP y PKP1 ha sido demostrada en queratinocitos utilizando Co-IP y ultracentrifugación en gradiente de densidad (Hofmann, Mertens, et al. 2000). Estudios posteriores utilizando proteínas de fusión han delimitado la región de interacción a la mitad N-terminal del dominio plakina (región 1-584) (Hatzfeld et al. 2000; Kowalczyk et al. 1999; Bornslaeger et al. 2001). Sin embargo, no se había hecho hasta la fecha un estudio preciso de la región de interacción de PKP1 en DP.

Nosotros hemos creado una extensa colección de fragmentos del dominio plakina con los que hemos estudiado su interacción con PKP1 utilizando tres metodologías complementarias: Co-IP, FLIM y ensayos de co-localización. Además, hemos comparado la distribución subcelular de DP y PKP1a tanto en células que no forman DMs, como en células que sí que lo hacen.

En primer lugar, confirmamos la interacción entre DP y la mitad N-terminal del dominio plakina utilizando nuestras tres metodologías. Después, nos centramos en mapear de manera precisa esta región, pudiendo descartar que los dominios SR5(SH3) y SR6 fuesen necesarios para dicha interacción. Finalmente pudimos acotar la zona de interacción de PKP1a en DP al dominio SR2.

Un estudio anterior también había tratado de delimitar la zona de interacción de DP y PKP1a (Smith & Fuchs 1998). Estos autores encontraron que los primeros 176 residuos de DP eran necesarios para la localización de DP en los DMs. Además, estudiaron la capacidad de este fragmento para interactuar con otros componentes desmosomales y vieron que era capaz de interactuar con Dsc1, PKP1 y PKG, aunque con esta última débilmente. El mapeo de la zona de interacción de PKP1 en DP no era el objetivo de estos autores por lo que no profundizaron más en el estudio, sin embargo, nuestros resultados coinciden perfectamente con los que ellos habían observado previamente. En conclusión, tanto Smith y Fuchs, como nosotros consideramos a la región correspondiente al SR2 como determinante para la interacción con PKP1.

Además, una serie de estudios anteriores también habían localizado la región de interacción entre p0071/PKP4 y DP (Setzer et al. 2004). P0071 es un miembro de la subfamilia p120-catenina como las PKPs aunque normalmente se localiza en las uniones adherentes (Keil et al. 2013; Calkins et al. 2003). Sin embargo, p0071 tiene la capacidad de interactuar con proteínas desmosomales como DP y, de hecho, se cree que participa en la regulación conjunta de uniones adherentes (AJs) y desmosomas (DMs) (Setzer et al. 2004). El mapeo de la región de interacción de

p0071 en DP identificó la región 1-160 de DP como determinante de esta unión (Calkins et al. 2003). La función de p0071 es totalmente opuesta a la de PKP1a. El hecho de que compartan la misma región de interacción en DP sugiere la posibilidad de que en la regulación conjunta de AJs y DMs puedan participar p0071 y PKP1a mediante la competición por la unión a DP. Apoyando esta idea, la presencia de sitios de interacción mutuamente excluyentes ya había sido demostrada también para la interacción de p0071 y p120-cetenina con cadherinas (Calkins et al. 2003).

Estructura del dominio SR2 de DP

Sorprendentemente, desde un punto de vista estructural, la existencia del dominio SR2 de DP ha sido puesta en entredicho por varios autores que consideraban a la región 1-179 de DP, mayormente desestructurada (Al-Jassar et al. 2011; Choi & Weis 2011). Sin embargo, basándonos en la estructura de plectina, nosotros pensamos que el extremo N-terminal de DP sí que tiene una organización similar al resto de dominio del dominio plakina. Para demostrarlo combinamos el uso de herramientas bioinformáticas con la expresión y purificación a partir de cultivos bacterianos de dos construcciones de este dominio de distinto tamaño. Mediante dicroísmo circular demostramos que la región correspondiente al SR2 tiene un alto contenido en hélice alfa, además, el fragmento largo (64-164) tiene una estabilidad térmica mucho mayor que el corto (64-155) lo que nos hace pensar que el segmento (155-164) aporta estabilidad a este dominio y, por tanto, forma parte de él. La estabilidad conformacional de ambos fragmentos la medimos también mediante ensayos Thermofluor, obteniendo unas temperaturas de fusión de ~ 66 °C y ~ 55 °C, para el fragmento largo y corto, respectivamente. Además de ser consecuentes con las obtenidas previamente por dicroísmo, son similares a las obtenidas por Al-Jassar et al. (2011) para otros fragmentos del dominio plakina, lo que sugiere que esta región tiene una organización conformacional similar a la de los otros SRs.

Estudio de sitios secundarios de interacción para PKP1 en el SR3 de DP y su relación con la estructura de la mitad N-terminal del PD de DP

Nuestros experimentos para el mapeo del sitio de interacción de PKP1a en DP sugerían que, aunque el SR2 parece ser el mayor punto de interacción, a lo largo del dominio SR3 de DP también parecen establecerse interacciones secundarias. Para comprobar esta hipótesis estudiamos la organización estructural de la mitad N-terminal del dominio plakina. Para ello producimos en *E. coli* y purificamos el fragmento 1-630 de DP y lo estudiamos mediante SAXS.

El análisis estructural de esta región proporcionó datos muy interesantes pues, aunque presenta una estructura mayormente alargada, hacia el extremo N-terminal la envuelta de baja resolución presenta como un abultamiento. Los modelos de cuerpo rígido explican este abultamiento por la colocación del SR2 al lado del SR3. La colocación repetitiva de este dominio adyacente al SR3 en los distintos modelos indica que estos dos dominios pueden estar estableciendo interacciones laterales entre ellos. Estos resultados concuerdan con la estructura atómica del cristal de la región SR3-SR6 de DP que es una estructura monomérica y con forma alargada (Choi & Weis 2011). Choi y Weis ya habían especulado en su trabajo sobre la posibilidad de que existiese una alta flexibilidad inter-dominio entre la región SR2-SR3 debido a que estos dominios están separados por una secuencia espaciadora de ~20 residuos mientras que el resto están unidos por hélices continuas desde un SR al siguiente. Por tanto, la estructura a baja resolución que presentamos aquí es compatible con una organización tridimensional en donde el SR2 está plegado sobre el SR3 lo que posibilita la formación de una superficie de interacción en la que el SR3 puede cooperar con el SR2 para la interacción con PKP1a.

Estudio del sitio de interacción de DP en PKP1a

Estudios anteriores habían determinado que PKP1a interaccionaba con DP mediante su dominio N-terminal o dominio cabeza (región 1-243) (Hofmann et al., 2000; Kowalczyk, 1999; Sobolik-Delmaire, Katafiasz, & Wahl, 2006). El dominio cabeza de PKP1 es considerado mayormente desordenado pues sólo una pequeña región cerca del N-terminal (HR2) presenta estructura secundaria en α -hélice. Los estudios de proteínas desordenadas coinciden en señalar que este tipo de organización proporciona a las proteínas una gran plasticidad para interaccionar con otras proteínas, capacitándolas para desarrollar múltiples funciones (Zhuang et al. 2011). En este sentido, en los últimos años se ha reconocido el rol multifuncional de las PKPs que, además de participar en adhesión celular, desempeñan otras funciones no-desmosomales en el núcleo y citoplasma (revisado en Hatzfeld et al. 2014; ver ejemplos en Godsel et al. 2010; Hatzfeld et al. 2000; Hofmann et al. 2006; Koetsier et al. 2014; Mertens et al. 2001; Sklyarova et al. 2008; Wolf et al. 2010). Por tanto, sería posible que las PKPs estuviesen utilizando la plasticidad ofrecida por la falta de estructura secundaria para interaccionar con muchas proteínas diferentes, adquiriendo la estructura secundaria adecuada a cada una de ellas tras la interacción.

Las interacciones de proteínas desordenadas son mediadas frecuentemente por regiones pequeñas, de incluso menos de 10 residuos (Dunker et al. 2008). Por tanto, nos preguntamos si la interacción de DP en el dominio cabeza de PKP1a estaría mediada también por una secuencia corta. Los resultados obtenidos mediante la utilización combinada de nuestras tres metodologías, sugiere que la región 98-116 de PKP1 es crítica para la interacción con DP. Es decir, la interacción de DP en PKP1a parece estar mediada por una región de ~10 residuos. Pensando en el rol de PKP1 en los DMS, en donde tiene que interactuar con diversas proteínas simultáneamente para establecer asociaciones laterales, es plausible un modelo en donde pequeñas regiones localizadas de interacción para diferentes proteínas se organicen en tándem a lo largo del dominio cabeza. Esta organización proporcionaría una superficie de interacción múltiple lo que favorecería la formación de complejos multi-proteína. Por desgracia, los lugares precisos de interacción de otras proteínas que interactúan con PKP1a no han sido definidos todavía.

Identificación de las regiones determinantes de la localización nuclear de PKP1a

Desde hace tiempo se conoce que las PKPs además de formar parte de los DMS, se localizan en el núcleo (Bonné et al. 1999; Mertens et al. 1996; Schmidt et al. 1997). Esta localización es independiente de la formación de DMS (Hatzfeld et al. 2014) y aunque se han descrito ciertas relaciones de las PKPs con el núcleo (Hatzfeld et al. 2014) la función de estas proteínas en este compartimento es todavía especulativa.

Conocer qué dominios de PKP1 participan en la localización nuclear de esta proteína puede ofrecer indicios sobre los procesos que gobiernan su distribución subcelular y con ello, sus funciones fuera de los desmosomas. Para identificar dichas regiones utilizamos transfecciones transitorias en células COS-7 combinadas con microscopía confocal de una amplia colección de mutantes de delección del N-terminal de PKP1a etiquetados con CFP. En células COS, PKP1a (región 1-726) tiene una localización exclusivamente nuclear. Los mutantes de delección que empiezan antes del residuo 116, muestran la misma localización que la proteína completa. Sin embargo, el mutante que comprende la región 121-726, aunque sigue teniendo una presencia prominente en el núcleo, también se encuentra en el citoplasma. Esta deslocalización nuclear se hace todavía más evidente en fragmentos cortados más allá del residuo 133. Por tanto, parece que el segmento 110-132, y probablemente la región 133-150, juegan un papel importante en la localización nuclear de PKP1.

Curiosamente, la región identificada como necesaria para la interacción con DP (residuos ~98-116) precede a la región identificada como determinante de la localización nuclear. Esto concuerda con los resultados en los que DP es co-importada al núcleo por la interacción con PKP1a. Así, en un supuesto modelo de las regiones importantes situadas en el dominio cabeza de PKP1 (Figura 12), PKP1 interaccionaría con DP por la región ~98-116, mientras que una proteína nuclear desconocida se uniría a PKP1a por la región ~110-150. Estos sitios de unión no son mutuamente excluyentes. Hoy en día no se conoce ninguna proteína nuclear que interaccione con PKP1a. Por tanto, también es posible que la localización nuclear de PKP1a no esté mediada por la interacción con otra proteína sino que depende de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (Deribe et al. 2010; Hunter 2010). En relación con esto, el sitio identificado como determinante de la localización nuclear de PKP1a coincide con un punto caliente de fosforilación (region ~118-121) (<http://www.phosphosite.org>). En cualquier caso, es necesaria más investigación para poder determinar cuál o cuáles son los factores determinantes de la localización nuclear de PKP1a.

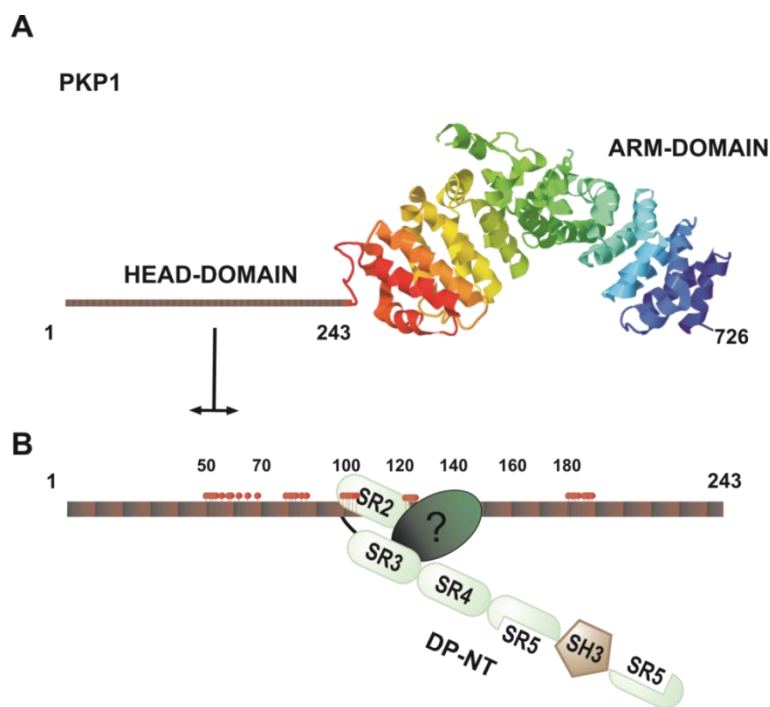


Figura 12. Regiones importantes en el dominio cabeza de PKP1a. **A)** Representación esquemática de PKP1a. El dominio cabeza está representado por una barra alargada dividida en 24 unidades de 10 residuos cada una. Cada unidad está representada por un rectángulo. El dominio ARM está representado por la estructura cristalográfica (entrada del PDB 1xm9). **B)** Detalle del dominio cabeza de PKP1a. Los números encima de la secuencia indican las regiones más importantes dentro de este dominio: i) Sitio de interacción de DP, región ~98-116; ii) Secuencia de localización nuclear. La proteína nuclear no caracterizada (?) que podría estar reclutando a PKP1a al núcleo interacciona por la región ~110-150; iii)

Los puntos calientes de fosforilación están indicados mediante marcas rojas (<http://www.phosphosite.org>). Curiosamente, uno de ellos coincide con la zona de interacción de DP, mientras que el siguiente con la zona implicada en la localización nuclear de PKP1a.

Estructura de la mitad C-terminal del PD de DP

DP se sabe que forma dímeros paralelos mediados por interacciones coiled-coil en su dominio central. Nuestras construcciones de la mitad C-terminal de DP tiene una pequeña región del dominio central de homo-dimerización por lo que ensayamos su capacidad para homo-asociar. Los estudios de homo-asociación con en células COS-1 indicaron que el fragmento DP-CT es un dímero en los lisados celulares. Sin embargo, el análisis por SAXS de este mismo fragmento indicó que *in vitro* este fragmento se encuentra en forma monomérica. Las diferencias encontradas entre ambas condiciones probablemente se deba a que la formación del dímero de DP necesite de proteínas adaptadoras que están presentes en las células de mamífero pero no cuando se trabaja con proteínas purificadas. Otra posibilidad podría ser la necesidad de modificaciones post-traduccionales en DP que, en bacterias no suceden.

Para poder estudiar la forma dimérica de DP, estabilizamos el dímero mediante la fusión a GCN4. Esta construcción (DP-CT-GCN4) sí que es un dímero en solución. La organización estructural de DP-CT-GCN4 se parece además a la que tiene esta misma región de plectina en su estructura cristalográfica, en la que los dos protómeros forman un dímero paralelo mediante el establecimiento de contactos entre ellos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

1. La mitad N-terminal del dominio plakina de desmoplakina interacciona con el dominio cabeza de PKP1a. Esta interacción es independiente de la formación de desmosomas.
2. El dominio SR2 de desmoplakina es necesario y suficiente para mediar la interacción con PKP1a. El dominio SR3 contribuye secundariamente a esta interacción.
3. La región central del dominio cabeza de plakophilina 1a, residuos 98-116, es crítica para la interacción con desmoplakina. Dentro de este dominio, los residuos 104-116 forman un dominio de interacción crucial.
4. Los determinantes principales de la localización subcelular de PKP1a y PKP2a se encuentran situados en el dominio cabeza de ambas proteínas.
5. PKP1a se localiza de manera prominente en el núcleo tanto de células que forman desmosomas, como de células que no lo hacen. El segmento 116-132 del dominio cabeza de esta proteína está implicado en el reconocimiento de dicha localización, aunque esos residuos por sí solos no son suficientes para retener a PKP1a en el núcleo.
6. La localización nuclear de PKP1a requiere la contribución de varias regiones del dominio cabeza. En presencia de regiones por delante y/o atrás del segmento 116-132, esta región es dispensable para la localización nuclear de PKP1a.
7. La región N-terminal de desmoplakina, residuos 61-164, tiene un alto contenido en estructura secundaria en hélice- α que, probablemente, se organiza formando un dominio tipo SR no canónico.
8. El dominio SR2 de desmoplakina se sitúa aparentemente adyacente al SR3 y, probablemente, establece contactos laterales con él.
9. La mitad C-terminal del dominio plakina, residuos 660-1056, forma una estructura monomérica alargada en solución. Dicha organización es compatible con una estructura que consiste en un array de tres SR (SR7-SR9).
10. La dimerización de la mitad C-terminal del dominio plakina de desmoplakina mediante un coiled-coil que imita al dominio de dimerización de la proteína, resulta en un dímero con una ordenación paralela de sus protómeros con posibles contactos laterales entre ellos.

Referencias

- Al-Jassar, C. et al., 2013. Mechanistic basis of desmosome-targeted diseases. *J Mol Biol*, 425(21), pp.4006–22.
- Al-Jassar, C. et al., 2011. The nonlinear structure of the desmoplakin plakin domain and the effects of cardiomyopathy-linked mutations. *J Mol Biol*, 411(5), pp.1049–61.
- Alonso-García, N. et al., 2009. Structure of the Calx-beta domain of the integrin beta4 subunit: insights into function and cation-independent stability. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 65(Pt 8), pp.858–71.
- Bikle, D.D., Xie, Z. & Lu, C.-L., 2013. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 7(4), pp.461–472.
- Bonné, S. et al., 2003. Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol*, 161(2), pp.403–16.
- Bonné, S. et al., 1999. Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci*, 112(Pt 1), pp.2265–76.
- Bornslaeger, E.A. et al., 2001. Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *J Cell Sci*, 114(4), pp.727–738.
- Bouameur, J.-E., Favre, B. & Borradori, L., 2014. Plakins, a Versatile Family of Cytolinkers: Roles in Skin Integrity and in Human Diseases. *J Invest Dermatol*, 134, pp.885–894.
- Boukamp, P. et al., 1988. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, 106(3), pp.761–771.
- Cabral, R.M. et al., 2010. Identification and characterization of DSPIa, a novel isoform of human desmoplakin. *Cell Tissue Res*, 341(1), pp.121–9.
- Calkins, C.C. et al., 2003. The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *J Biol Chem*, 278(3), pp.1774–83.
- Carnahan, R.H. et al., 2010. The molecular evolution of the p120-catenin subfamily and its functional associations. *PLoS one*, 5(12), p.e15747.
- Chen, X. et al., 2002. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, 277(12), pp.10512–22.
- Chiariello, M., Marinissen, M.J. & Gutkind, J.S., 2000. Multiple Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways Connect the Cot Oncoprotein to the c-jun Promoter and to Cellular Transformation. *Mol Cell Biol*, 20(5), pp.1747–1758.
- Chitaev, N.A. & Troyanovsky, S.M., 1997. Direct Ca²⁺-dependent Heterophilic Interaction between Desmosomal Cadherins, Desmoglein and Desmocollin, Contributes to Cell–Cell Adhesion. *J Cell Biol*, 138(1), pp.193–201.
- Choi, H.-J. & Weis, W.I., 2011. Crystal structure of a rigid four-spectrin-repeat fragment of the human desmoplakin plakin domain. *J Mol Biol*, 409(5), pp.800–12.
- Choi, H.-J. & Weis, W.I., 2005. Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol*, 346(1), pp.367–76.
- Cole, C., Barber, J.D. & Barton, G.J., 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), pp.W197–201.
- Delmar, M. & McKenna, W.J., 2010. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res*, 107(6), pp.700–14.

- Deribe, Y.L., Pawson, T. & Dikic, I., 2010. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol*, 17(6), pp.666–72.
- DuBridge, R.B. et al., 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, 7(1), pp.379–87.
- Dunker, A.K. et al., 2008. Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 18(6), pp.756–64.
- Fasman, G.D. ed., 1996. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Springer, New York.
- Finn, R.D., Clements, J. & Eddy, S.R., 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res*, 39(Web Server issue), pp.W29–37.
- Franke, W.W. et al., 2006. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur J Cell Biol*, 85(2), pp.69–82.
- Gallicano, G.I. et al., 2009. Desmoplakin Is Required Early in Development for Assembly of Desmosomes and Cytoskeletal Linkage. *J Cell Biol*, 143(7), pp.2009–2022.
- Gallicano, G.I., Bauer, C. & Fuchs, E., 2001. Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature. *Development*, 128(6), pp.929–941.
- Garrod, D. & Chidgey, M., 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), pp.572–87.
- Garrod, D.R. et al., 2005. Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci*, 118(Pt 24), pp.5743–54.
- Gluzman, Y., 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23(1), pp.175–82.
- Greenfield, N.J., 2007. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc*, 1(6), pp.2527–35.
- Harmon, R. & Green, K., 2013. Structural and functional diversity of desmosomes. *Cell Commun Adhes*, 20(6), pp.171–187.
- Hatzfeld, M., 2003. Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *J Cell Sci*, 116(7), pp.1219–1233.
- Hatzfeld, M., 1999. The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol*, 186, pp.179–224.
- Hatzfeld, M. et al., 2000. The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol*, 149(1), pp.209–222.
- Hatzfeld, M., Wolf, A. & Keil, R., 2014. Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. *Cell Commun Adhes*, 21(1), pp.25–42.
- Hofmann, I. et al., 2006. Identification of the Junctional Plaque Protein Plakophilin 3 in Cytoplasmic Particles Containing RNA-binding Proteins and the Recruitment of Plakophilins 1 and 3 to Stress Granules. *Mol Biol Cell*, 17(3), pp.1388–1398.
- Hofmann, I., Mertens, C., et al., 2000. Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci*, 113(Pt 1), pp.2471–83.

- Hofmann, I., Mücke, N., et al., 2000. Physical characterization of plakophilin 1 reconstituted with and without zinc. *Eur J Biochem*, 267(14), pp.4381–9.
- Hornbeck, P. V. et al., 2004. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics*, 4(6), pp.1551–61.
- Huber, A.H., Nelson, W.J. & Weis, W.I., 1997. Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of beta-Catenin. *Cell*, 90(5), pp.871–882.
- Hunter, T., 2010. Tyrosine phosphorylation : thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol*, 21(2), pp.140–146.
- Ishida-Yamamoto, A. & Igawa, S., 2014. Genetic skin diseases related to desmosomes and corneodesmosomes. *J Dermatol Sci*, 74(2), pp.99–105.
- Jefferson, J.J. et al., 2007. Structural Analysis of the Plakin Domain of Bullous Pemphigoid Antigen1 (BPAG1) Suggests that Plakins are Members of the Spectrin Superfamily. *J Mol Biol*, 366(1), pp.244–57.
- Keefess, E.J.O., Ericksonb, H.P. & Bennett, V., 1989. Desmoplakin I and desmoplakin II. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 264(14), pp.8310–8.
- Keil, R., Schulz, J. & Hatzfeld, M., 2013. p0071/PKP4, a multifunctional protein coordinating cell adhesion with cytoskeletal organization. *Biol Chem*, 394(8), pp.1005–17.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 1751(2), pp.119–39.
- Kimura, T.E., Merritt, A.J. & Garrod, D.R., 2007. Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *J Invest Dermatol*, 127(4), pp.775–81.
- Kimutai, L.K. et al., 2002. Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol*, 119(5), pp.1128–36.
- Koch, M.H.J., Vachette, P. & Svergun, D.I., 2003. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys*, 36(2), pp.147–227.
- Kouklis, P., Hutton, E. & Fuchs, E., 1994. Making a Connection: Direct Binding between Keratin Intermediate Filaments and Desmosomal Proteins. *J Cell Biol*, 127(4), pp.1049–60.
- Kowalczyk, A.P. et al., 1997. The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Cell Biol*, 139(3), pp.773–784.
- Kowalczyk, A.P. et al., 1999. The Head Domain of Plakophilin-1 Binds to Desmoplakin and Enhances Its Recruitment to Desmosomes. Implications for Cutaneous Disease. *J Biol Chem*, 274(26), pp.18145–18148.
- Kowalczyk, A.P. & Green, K.J., 2013. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116, pp.95–118.
- Kozak, M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), pp.283–92.
- Lai Cheong, J.E., Wessagowit, V. & McGrath, J. a, 2005. Molecular abnormalities of the desmosomal protein desmoplakin in human disease. *Clin Exp Dermatol*, 30(3), pp.261–6.
- Lechler, T. & Fuchs, E., 2007. Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *J Cell Biol*, 176(2), pp.147–54.

- Leinonen, P.T. et al., 2009. Reevaluation of the normal epidermal calcium gradient, and analysis of calcium levels and ATP receptors in Hailey-Hailey and Darier epidermis. *J Invest Dermatol*, 129(6), pp.1379–87.
- Mertens, C. et al., 2001. Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(14), pp.7795–800.
- Mertens, C., Kuhn, C. & Franke, W.W., 1996. Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol*, 135(4), pp.1009–25.
- Mertens, H.D.T. & Svergun, D.I., 2010. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol*, 172(1), pp.128–41.
- Moll, I. et al., 1997. The distribution of the desmosomal protein, plakophilin 1, in human skin and skin tumors. *Invest Dermatol.*, 108(2), pp.139–146.
- Mühmer, M. et al., 2014. An alternative promoter of the human plakophilin-3 gene controls the expression of the new isoform PKP3b. *Cell and tissue research*, 355(1), pp.143–62.
- Munoz, W. a et al., 2014. Plakophilin-3 Catenin Associates with the ETV1/ER81 Transcription Factor to Positively Modulate Gene Activity. *PloS one*, 9(1), p.e86784.
- Niessen, C.M. et al., 1996. Deficiency of the integrin beta 4 subunit in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia: consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J Cell Sci*, 109(Pt 7), pp.1695–706.
- O'Shea, E. et al., 1991. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*, 254(5031), pp.539–544.
- Ortega, E. et al., 2011. The structure of the plakin domain of plectin reveals a non-canonical SH3 domain interacting with its fourth spectrin repeat. *J Biol Chem*, 286(14), pp.12429–38.
- Pantoliano, M.W. et al., 2001. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J Biomol Screen*, 6(6), pp.429–40.
- Ranjbar, B. & Gill, P., 2009. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chem Biol Drug Des*, 74(2), pp.101–20.
- Rickelt, S., 2012. Plakophilin-2: a cell-cell adhesion plaque molecule of selective and fundamental importance in cardiac functions and tumor cell growth. *Cell Tissue Res*, 348(2), pp.281–94.
- Ruxton, G.D., 2006. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U test. *Behav Ecol*, 17(4), pp.688–690.
- Saito, M. et al., 2012. Classical and desmosomal cadherins at a glance. *J Cell Sci*, 125(Pt 11), pp.2547–52.
- Schmidt, A. et al., 1997. Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res*, 290(3), pp.481–499.
- Setzer, S. V. et al., 2004. Comparative Analysis of Armadillo Family Proteins in the Regulation of A431 Epithelial Cell Junction Assembly, Adhesion and Migration. *J Invest Dermatol*, 123(3), pp.426–433.
- Sievers, F. & Higgins, D.G., 2014. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol*, 1079, pp.105–16.
- Sklyarova, T. et al., 2008. Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol*, 128(6), pp.1375–85.

- Smith, E.A. & Fuchs, E., 1998. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol*, 141(5), pp.1229–41.
- Sobolik-Delmaire, T. et al., 2010. Plakophilin-1 localizes to the nucleus and interacts with single-stranded DNA. *J Invest Dermatol*, 130(11), pp.2638–46.
- Sonnenberg, A. & Liem, R.K.H., 2007. Plakins in development and disease. *Exp Cell Res*, 313(10), pp.2189–203.
- South, a. P., 2004. Plakophilin 1: an important stabilizer of desmosomes. *Clin Exp Dermatol*, 29(2), pp.161–7.
- South, A.P. et al., 2003. Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *J Cell Sci*, 116(Pt 16), pp.3303–14.
- Studier, F.W. & Moffatt, B. a, 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1), pp.113–30.
- Sumigray, K.D. & Lechler, T., 2012. Desmoplakin controls microvilli length but not cell adhesion or keratin organization in the intestinal epithelium. *Mol Biol Cell*, 23(5), pp.792–9.
- Tewari, R. et al., 2010. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol*, 20(8), pp.470–81.
- Vasioukhin, V. et al., 2001. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol*, 3(12), pp.1076–85.
- Wolf, A. et al., 2010. Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *J Cell Biol*, 188(4), pp.463–71.
- Yachdav, G. et al., 2014. PredictProtein-an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res*, 42(Web Server issue), pp.W337–43.
- Zhao, Q. et al., 2012. Modulated electron-multiplied fluorescence lifetime imaging microscope: all-solid-state camera for fluorescence lifetime imaging. *J Biomed Opt*, 17(12), p.126020.
- Zhou, X. et al., 2004. Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture. *J Cell Sci*, 117(Pt 15), pp.3129–40.
- Zhuang, Z. et al., 2011. Assisted peptide folding by surface pattern recognition. *Biophys J*, 100(5), pp.1306–15.