

## Abstract:

Atypical protein kinase C (aPKC) is a Serine/Threonine kinase that through its central role in cell polarity signaling controls a range of cellular processes such as cell fate, migration and adhesive junction dynamics. Next to its role in polarity processes this kinase has also been implicated in various other pathways, such as tyrosine kinase and hedgehog signaling, apoptosis and metabolic and innate immune regulation. Together with Par3 and Par6 aPKC forms the polarity regulating Par/aPKC-complex. Mammals harbor two isoforms of aPKC, aPKC $\lambda$  and aPKC $\zeta$ , which share 72% identity. Although *in vitro* data suggest redundant functions of the two isoforms, *in vivo* inactivation experiments indicate not only overlapping but also specific functions for aPKC $\lambda$  and aPKC $\zeta$ . Thus far, downstream targets of aPKC were mostly identified based on a PKC substrate consensus sequence present in a potential candidate protein. The goal of this thesis was to determine aPKC isoform specific and overlapping functions by characterizing interaction partners and downstream substrates using unbiased proteomic approaches. Furthermore this thesis addressed how loss of either aPKC would affect overall protein expression and phosphorylation status. To address these aims, Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture (SILAC) was established for primary mouse keratinocyte and combined with phosphopeptide enrichment. Furthermore, immunoprecipitation (IP) for endogenous aPKC $\lambda$  or for exogenous GFP-tagged aPKC $\lambda$  or aPKC $\zeta$  was done and combined with mass spectrometry to identify overlapping and unique interaction partners for these isoforms. In depth analysis identified more than 100 significant interactors in each of these IPs and conditions. Furthermore, phospho-SILAC identified over 5900 phosphosites with only 183 significantly changed upon loss of aPKC $\lambda$ , of which 86 containing a PKC substrate consensus sequence. Loss of aPKC $\zeta$  resulted in 1797 significantly altered phosphosites with 886 sites containing a PKC substrate consensus sequence of which 29 were similar to those altered upon loss of aPKC $\lambda$ . Thus, together more than 900 potential targets of aPKC were identified. Bio-informatic analysis and integration of these large scale interaction and phospho-proteome data revealed a central role for both aPKC isoforms in epidermal barrier formation. Importantly, this analysis suggests that aPKC $\lambda$  and aPKC $\zeta$  exhibit opposing effects on the formation of the *stratum corneum*, which was further supported by TEWL measurements on different aPKC knockout mice. Moreover, these data suggest a novel role for both aPKC isoforms in the regulation of desmosomes, intercellular junctions essential for epidermal integrity and differentiation. Comparison of the phospho-proteomes also suggests that the two aPKCs have opposing functions in regulation of Map kinase signaling. Finally, quantitative analysis of the aPKC interactome suggests that the Par3/aPKC and Lgl/aPKC polarity complexes have a different composition and stoichiometry than previously published. Taken together, these unbiased proteomic approaches identified crucial and isoform specific functions of aPKC in murine keratinocytes.

## Zusammenfassung:

Die atypische Protein kinase C (aPKC) ist eine S/T Kinase, die durch ihre zentrale Rolle bei Zellpolaritätssignalen eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellschicksale, Zellmigration und die Dynamic adhäsiver Zellverbindungen kontrolliert. Neben ihrer Rolle in Polaritätsprozessen ist diese kinase ebenso involviert in viele andere Vorgänge, wie Rezeptortyrosinkinase- und Hedgehog- Signalen, Apoptose und Regulation von Metabolismus und angeborener Immunabwehr. aPKC bildet mit Par6 und Par3 den Polarität regulierenden Par/aPKC-Komplex. Säugetiere haben zwei Isoformen von aPKC, aPKC $\lambda$  und aPKC $\zeta$ , die zu 72%

identisch sind. Obwohl *in vitro* Daten redundante Funktionen andeuten, implizieren *in vivo* Geninaktivierungsexperimente nicht nur überlappende sondern auch spezifische Funktionen von aPKC $\lambda$  und aPKC $\zeta$ . Bisher wurden Ziele von aPKC auf PKC-Substrat Sequenzen basierend, die in mutmaßlichen Kandidatenproteinen vorhanden waren. Ziel dieser Arbeit war es, die isoformspezifischen und überlappenden Funktionen von aPKC zu bestimmen, indem Interaktionspartner und Substrate mit Proteommethoden charakterisiert werden. Desweiteren sollte in dieser Arbeit geklärt werden, wie der Verlust von aPKC die allgemeine Proteinexpression und -phosphorylierung beeinflusst. Um dies zu tun, wurde stabiles Isotopenlabeling durch Aminosäuren in der Zellkultur (eng. SILAC) für primäre Mauskeratinozyten etabliert und mit Phosphopeptidanreicherungen kombiniert. Weiterhin wurden Immunpräzipitationen (IP) für endogenes aPKC $\lambda$  oder für exogenes, GFP-markiertes aPKC $\lambda$  oder aPKC $\zeta$  durchgeführt und mit Massenspektrometrie kombiniert, um überlappende und spezifische Interaktionspartner für diese Isoformen zu identifizieren. Tiefgehende Analysen identifizierten über 100 signifikante Interaktoren in allen IPs und Konditionen. Weiterhin wurden über 5900 Phosphorylierungsstellen identifiziert, von denen nur 183 signifikant geändert waren nach Verlust von aPKC $\lambda$ , von welchen 86 eine PKC-Substrat Sequenz enthielten. Verlust von aPKC $\zeta$  resultierte in 1797 signifikant geänderten Phosphorylierungsstellen, von denen 886 eine PKC-Substrat Sequenz enthielten, darunter 29 die ähnlich reguliert waren wie nach Verlust von aPKC $\lambda$ . Folglich, wurden zusammen mehr als 900 potentielle Ziele von aPKC identifiziert. Bioinformatische Analysen und Integration dieser großformatigen Interaktions- und Phosphoproteomdaten enthüllten eine zentrale Rolle für beide aPKC Isoformen in der epidermalen Barrierebildung. Insbesondere deutet diese Analyse darauf hin, dass aPKC $\lambda$  und aPKC $\zeta$  gegensätzliche Effekte auf die Bildung des *Stratum corneum* haben, was weiterhin durch TEWL-Messungen an verschiedenen aPKC-deletierten Mäusen unterstützt wurde. Weiterhin deuten diese Daten eine neue Rolle von aPKC Isoformen in der Regulation interzellulärer Verbindungen, den Desmosomen, an, welche essenziell sind für epidermale Integrität und Differenzierung. Ein Vergleich der Phosphoproteome deutet ebenfalls an, dass beide aPKCs eine gegensätzliche Rolle im Map-kinase Signalweg ausüben. Schließlich ergab eine quantitative Analyse des aPKC $\lambda$  Interaktoms, dass der Par3/aPKC und der Lgl/aPKC Polaritätskomplex unterschiedliche Zusammensetzungen und Stöchiometrien haben, als bisher angenommen. Zusammenfassend haben diese proteombasierten Verfahren wichtige und isoform spezifische Funktionen von aPKC in Mauskeratinozyten identifiziert.