

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Lokalisierung von DYRK 3 in Säugetier-Zellen

Die intrazelluläre Lokalisierung ist ein wichtiges Merkmal der DYRK-Proteine (siehe **Einleitung 1.4**). Da jedoch die Lokalisierung von DYRK 3 widersprüchlich in der Literatur beschrieben war, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Eigenschaft von DYRK 3 näher untersucht. Hierfür wurden Säugetier-Zellen mit verschiedenen Fusionen von DYRK 3 transfiziert und durch Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

#### 4.1.1 Der N-Terminus von DYRK 3 enthält eine mutmaßliche Bindungsstelle für ein cytosolisches Ankerprotein

DYRK 3 befindet sich mit N-terminalem GFP in HEK-293-, LLC-PK1- und COS-7-Zellen sowohl im Kern als auch im Cytosol. Einzig in HEP-G2-Zellen wird dieses Konstrukt vom Kern ausgeschlossen. Überdies konnte durch Zellfraktionierung und *Western Blot* GFP-DYRK 3-S sowohl im Cytosol als auch im Kern von HEK-293-Zellen nachgewiesen werden. Die Lokalisierung von DYRK 3 in Kern und Cytosol kann wegen eines Molekulargewichts von mehr als 65 kDa - der Größe von DYRK 3 ohne jegliche Fusionen - nicht mit passiver Diffusion durch die Kernpore erklärt werden. Einzig Proteine kleiner als 50 kDa gelangen durch einfache Diffusion in den Kern. Da jedoch eine GFP-Fusion von DYRK 3-S trotz eines Molekulargewichts von 91,4 kDa in den Zellkern vordringen kann, muss dieses Protein so mit Komponenten des Kernporen-Komplexes oder der Transportmaschinerie interagieren können, dass es in den Kern gelangen kann. Somit sind die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die ersten Hinweise für das Hin- und Herwandern (*Shuttling*) einer Kinase der DYRK-Familie zwischen Kern und Cytoplasma von Säugetier-Zellen.

Mit einer kleinen N-terminalen Fusion (*FLAG-Tag*) sowie mit C-terminalem GFP wird DYRK 3 in HEP-G2- und HEK-293-Zellen vom Zellkern ausgeschlossen. Nach Deletion des N-terminalen Teils ist jedoch die Kinase-Domäne mit C-terminalem GFP in HEK-293-Zellen erneut sowohl im

Cytoplasma als auch im Zellkern zu finden. Eine GFP-Fusion des N-terminalen Teils allein sollte mit 45,8 kDa wieder durch passive Diffusion in den Kern gelangen können. Diese Lokalisierung ist auch bei einem Teil von HEK-293-Zellen zu beobachten. In anderen HEK-293-Zellen sowie in LLC-PK1-Zellen befindet sich dieses Protein jedoch wieder ausschließlich im Cytoplasma. Falls ein cytosolisches Ankerprotein für das Zurückhalten von DYRK 3 im Cytoplasma verantwortlich ist, sollte dieses also im N-terminalen Teil von DYRK 3 binden. Somit konnte die für die cytosolische Verankerung notwendige Bindungsstelle innerhalb der Sequenz von DYRK 3 auf den N-terminalen Teil begrenzt werden.

Im Unterschied zu DYRK 1A enthält DYRK 3 kein klassisches, zweiteiliges NLS (Becker et al., 1998). Jedoch ist im N-Terminus von DYRK 3-S laut PSORT ([www.psort.org](http://www.psort.org)) mit der Sequenz <sup>153</sup>PNAKKRH<sup>159</sup> ein mutmaßliches Kern-Lokalisierungssignal (NLS) des Typs par7 vorhanden (Horton und Nakai, 1997; Nakai und Horton, 1999). Dies ist das einzige Sortier-Signal, das mit PSORT in der Primär-Sequenz von DYRK 3 zu finden ist. Da sich jedoch eine Fusion von DYRK 3-S<sub>1-163</sub> mit C-terminalem GFP im Cytoplasma von HEK-293- und LLC-PK1-Zellen befindet, wirkt das oben beschriebene Motiv zumindest im hier untersuchten Kontext nicht als NLS. Überdies gelangt ein DYRK 3-Konstrukt auch ohne N-Terminus und ohne dieses mutmaßliche NLS als GFP-Fusion in den Kern. Somit scheint die Sequenz von Pro153 bis His159 für die subzelluläre Sortierung von DYRK 3-S ohne Bedeutung zu sein.

Das Hin- und Herwandern von DYRK 3 zwischen Kern und Cytoplasma sowie die cytosolische Verankerung des Proteins werden im Folgenden mit dem Transport anderer Proteine zwischen Zellkern und Cytoplasma verglichen.

#### **4.1.2 *Shuttling* und Verankerung von Proteinen**

Um vom Cytosol in den Kern zu gelangen, muss ein Protein die Kernpore passieren. Der Kernporen-Komplex (NPC) ist mit etwa 125 MDa ein riesiger Proteinkomplex mit bemerkenswerten Eigenschaften. Proteine kleiner als 50 kDa oder bis zu einem Durchmesser von 9 nm können durch Diffusion zwischen Cytoplasma und Kern hin und her wandern. Größere Proteine müssen im Komplex mit Import- und Exportfaktoren aktiv durch die Kernpore transportiert werden. Der aktive Protein-Transport ist von Ran

abhängig, einem kleinen GTP-bindenden Protein aus der Ras-Familie. In der Nähe von DNA liegt Ran durch die Aktivität des Chromatin-gebundenen GEFs (*Guanosine Nucleotide Exchange Factor*) RCC1 GTP-gebunden vor, im Cytosol wird Ran durch Ran-GAP deaktiviert, einem GTPase aktivierenden Protein (Dasso, 2002; Komeili und O'Shea, 2001; Kuersten et al., 2001). Sortier-Signale werden durch Bindung an hoch konservierte Import- und Export-Faktoren (Importin-alpha und -beta bzw. Karyopherin-1 und 2 sowie Exportin 1/CRM 1) erkannt und bewirken so den Import bzw. Export bestimmter Proteine.

Von STAT-Transkriptionsfaktoren (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) war schon lange bekannt, dass sie nach Aktivierung und Dimerisierung in den Kern transportiert werden (Horvath, 2000; Kisseleva et al., 2002). Diese Proteine besitzen kein klassisches Kern-Lokalisierungssignal (NLS). Es wird vermutet, dass hier erst durch Dimerisierung ein funktionales NLS entsteht. Neuere Studien zeigten allerdings, dass STAT-Monomere auch im Ruhe-Zustand permanent zwischen Kern und Cytosol hin- und hertransportiert werden (Meyer et al., 2002a; Zeng et al., 2002; Meyer et al., 2002b; McBride und Reich, 2003). Erst nach Cytokin-Stimulation und dem aktiven Kern-Import des STAT-Dimers werden diese Transkriptionsfaktoren jedoch im Kern angereichert, nun binden sie DNA und induzieren die Transkription von Ziel-Genen.

Die dynamische Lokalisierung der MAP-Kinase ERK2 wurde bereits in der Einleitung (**Abschnitt 1.4.2**) geschildert. Darüber hinaus ist die cytosolische Verankerung der einzelnen Komponenten einer MAP-Kinase-Kaskade in funktionalen Einheiten für eine effiziente Signalübertragung von entscheidender Bedeutung (Johnson, 2002; Karandikar und Cobb, 1999; Yoshioka, 2004).

### 4.1.3 Ein neuer Mechanismus der Regulation von DYRK 3

DYRK-Proteine aktivieren sich durch Autophosphorylierung innerhalb der Aktivierungsschleife (siehe **Einleitung 1.2.1**). Somit können sie nicht analog den MAPKs durch übergeordnete Kinasen aktiviert werden, sondern müssen sie auf anderem Wege reguliert werden. Wenn DYRK 3 durch bislang unbekannte Faktoren im Cytoplasma verankert wird, sonst jedoch zwischen Cytosol und Zellkern hin und her wandert, ist dies ein möglicher Regulierungsmechanismus.

Verschiedene Proteine werden durch Beeinflussung ihrer Lokalisierung innerhalb der Zelle reguliert. So bindet das Protein PEA-15, ein kleines cytosolisches Protein mit *Death Effector*-Domäne, an ERK2 und verhindert den Kern-Import dieser MAP-Kinase (Whitehurst et al., 2004). Die Caspase-7 wird nach einem apoptotischen Stimulus im Zellkern angereichert, im Ruhezustand verhindert jedoch die Pro-Domäne einen vorzeitigen Kern-Import dieser Protease. Erst wenn die Pro-Domäne durch andere aktivierte Caspasen abgespalten wird, kann Caspase-7 in den Kern gelangen und zum Prozess der Apoptose durch Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase beitragen (Yaoita, 2002).

Die Familie von 14-3-3-Proteinen ist dafür bekannt, die Lokalisierung von Proteinen zu beeinflussen (Ferl et al., 2002; Muslin und Xing, 2004). FOXO-Transkriptionsfaktoren gehören zu den zahlreichen Proteinen, die von 14-3-3s gebunden werden (van der Heide et al., 2004). Hier hat die mehrfache Phosphorylierung durch AKT/Protein-Kinase B die Bindung von 14-3-3 an das FOXO-Protein, dessen Export aus dem Kern und cytoplasmatische Verankerung zur Folge. Ob DYRK 3-S in dem Serin-reichen Bereich von Ser77 bis Ser113 (zwölf Serin- und drei Threonin-Seitenketten innerhalb von 37 Aminosäuren) eine Bindungsstelle für ein 14-3-3-Protein besitzt, ist eine spannende Fragestellung für weiterführende Studien.

Die gezielte Beeinflussung der subzellulären Lokalisierung ist also ein möglicher Mechanismus der Regulierung von Proteinen, der bisher bei keiner DYRK-Kinase in multi-zellulären Organismen beschrieben worden ist. Einzig das Protein Yak1p aus Hefe scheint seine Lokalisierung abhängig von der Glucose-Konzentration zu verändern (Moriya et al., 2001).

## **4.2 Expression der Kinase DYRK 3 in eukaryontischen Zellen**

### **4.2.1 Expressionslevel von DYRK 3**

Bei der Expression von DYRK 3-Fusionen in den Zelllinien COS-7, LLC-PK1, HEP-G2 und HEK-293 sowie in Flp-In-CHO-Zellen wurden DYRK 3-L-GFP und DYRK 3-S-GFP in geringeren Mengen gebildet als isoliertes GFP, DYRK 3-S<sub>1-163</sub>-GFP oder DYRK 3-S<sub>164-568</sub>-GFP. Dies spiegelte sich in den längeren Integrationszeiten der AxioCam-Farbkamera am Fluoreszenz-Mikroskop wider (20 bis 40 sec im Vergleich zu sonst 1 bis 10 sec). Trotz des

sehr intensiven Signals der Positiv-Kontrolle GFP war zudem bei dem ohnehin schwachen Signal von GFP-DYRK 3-S im *Western Blot* die Detektion von DYRK 3 mit C-terminalem GFP nicht möglich. Überdies war in stabil mit FLAG-DYRK 3-L transfizierten Flp-In-CHO-Zellen keine Expression des Transgens detektierbar. Deshalb sollen hier Faktoren diskutiert werden, die unter Umständen die Expression von DYRK 3-Fusionsproteinen beeinflusst haben.

Die Expression von Immunglobulinen und des Wachstumshormons des Hausschweins in eukaryontischen Zellen konnte durch Einfügen eines künstlichen Introns in die jeweilige cDNA gesteigert werden (Furebring et al., 1997; Li et al., 2003). Somit kann schlicht die Größe der Intron-losen cDNA für das niedrige Expressionsniveau von DYRK 3-S/L-GFP verantwortlich sein. Angesichts der guten Expressionsraten anderer Proteine (GFP-SGLT-1 sowie TPST-1-GFP) unter den hier angewandten Bedingungen und der wenigstens mäßigen Expression von GFP-DYRK 3-S ist jedoch bei DYRK 3-S/L-GFP ein einfacher Größen-Effekt unwahrscheinlich.

Die beiden Isoformen S und L von DYRK 3 unterscheiden sich in den ersten 26 Aminosäuren (siehe **1.5.3**). DYRK 3-L enthält in diesem Bereich vier selten genutzte Codons (Becker et al., 1998). Keine der ersten sechs Aminosäuren von DYRK 3-S wird im Gegensatz dazu von einem Triplett codiert, das einen geringeren Anteil als 0,8% aller Codons humaner Proteinsequenzen einnimmt (Gustafsson et al., 2004). Seltene Codons, besonders am Beginn einer codierenden Sequenz, können die Translation beeinflussen, jedoch nicht allein durch die Verfügbarkeit der entsprechenden tRNAs, sondern auch durch Beeinflussung von mRNA-Stabilität und -Sekundärstruktur (Griswold et al., 2003; Wu et al., 2004; Zhao et al., 2003).

Sollten Eigenschaften des N-Terminus die Expression von DYRK 3 beeinflussen, so sollte ebenfalls DYRK 3-S<sub>1-163</sub>-GFP, also der isolierte N-terminale Teil von DYRK 3-S, nur in geringen Mengen exprimiert werden. Der Intensität der Fluoreszenz (bzw. der benötigten Integrationszeit während der Aufnahme) zufolge wird dieses Fusionsprotein mit der zu DYRK 3-S-GFP identischen 5'-Region jedoch besser exprimiert. Eventuell ist also die Expression von DYRK 3 in seiner vollen Länge problematisch für einige Zellen, was auch die fehlende Expression von FLAG-DYRK 3-L in Flp-In-CHO-Zellen erklären könnte.

Zur weiteren Analyse des Verbleibs von DYRK 3 in der Zelle wäre die Bestimmung der mRNA-Menge durch *Northern Blot* bzw. RT-PCR erforderlich. Überdies müsste die Quantifizierung der Protein-Menge verbessert werden, da einzig das Fluoreszenz-Signal keinen zuverlässigen Indikator für die Menge an gebildetem Protein darstellt. *In vitro*-Expression (**Abschnitt 3.2.2**) sowie vorangegangene Studien (Li et al., 2002) deuteten an, dass DYRK 3 empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau ist. Folglich könnte die Quantifizierung der Protein-Menge in An- und Abwesenheit eines Proteasom-Inhibitors wie MG132 (Rock et al., 1994) auch Auskunft über den Mechanismus des Abbaus von DYRK 3 geben.

#### 4.2.2 Die Stabilisierung von DYRK 3

Das niedrige Expressionsniveau von DYRK 3-GFP sowie die fehlende Expression von FLAG-DYRK 3-L in Flp-In-CHO-Zellen kann mit toxischen Effekten der Kinase auf diese Zellen erklärt werden. Wenn DYRK 3 ein Inhibitor der Proliferation ist, sollte die Aktivität dieses Proteins in sich teilenden Zellen sorgfältig reguliert sein. Dies kann wie in der Einleitung (**Abschnitt 1.5.2**) beschrieben durch die begrenzte Expression in bestimmten Entwicklungsstadien ausgewählter Zellen geschehen. Überdies wurden in dieser Arbeit Hinweise gefunden, dass auch die Lokalisierung von DYRK 3 Zelltyp-spezifisch reguliert werden kann (**Abschnitt 3.1**).

Eine weitere Regulationsebene kann die Protein-Stabilität sein. DYRK 3 neigte als Fusion mit DsRed2 sowie mit N-terminalem cMyc-Epitop zur Aggregation. Zudem war das Protein in dieser und in einer vorangegangenen Studie empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau. Die Transkription der DYRK 3-mRNA ist keineswegs auf erythroide Zellen beschränkt (siehe **Abschnitt 3.1.1**), jedoch könnte ein nur in diesen Zellen exprimiertes Protein DYRK 3 stabilisieren und vor Aggregation und Abbau bewahren. Somit wäre gewährleistet, dass das DYRK 3-Protein außer in seinen Ziel-Zellen nur in geringen Mengen oder gar nicht exprimiert wird.

Für die *in vitro*-Translation von DYRK 3 stand zum damaligen Zeitpunkt nur das auf Weizenkeim-Extrakt basierende TNT-System zur Verfügung. Vor dem Hintergrund von denkbaren Zelltyp-spezifischen Stabilisatoren ist die erneute Expression von DYRK 3 in einem auf Reticulocyten-Lysat basierenden System von Interesse.

Ein Stabilisator von Proteinen in eukaryontischen Zellen ist HSP 90. Dieses Chaperon ist für die korrekte Expression von manchen Kinasen (z. B. Src und Raf) und anderen Proteinen essentiell (Richter und Buchner, 2001). So führt die Inhibition von HSP 90 durch Geldanamycin in *Drosophila*-SL2-Zellen gleichzeitig zum Verlust der Aktivität der POLO-Kinase, einer bei der Zellteilung beteiligten Kinase (de Cárcer et al., 2001). Da jedoch HSP 90 in jeder eukaryontischen Zelle vorkommt, kann dieses Chaperon nicht für die vermutete Zelltyp-spezifische Stabilisierung von DYRK 3 verantwortlich sein. Bei der weiteren Suche nach Interaktionspartnern ist somit auch die Identifikation eines mutmaßlichen Stabilisators von DYRK 3 zu erwarten.

### **4.3 Über die Wechselwirkung von DYRK 3 mit möglichen Substraten**

Dem klassischen Modell der JAK/STAT-Signalübertragung entsprechend (Horvath, 2000; Kisseleva et al., 2002) kann STAT 5A nach der Phosphorylierung von Tyrosin-Resten mittels seiner SH2-Domänen dimerisieren und in den Kern wandern (O'Shea et al., 2002). STAT 5A ist in die Signalübertragung nach der Stimulierung der Zelle durch verschiedene Cytokine involviert, unter anderem Prolactin, das Wachstumshormon und EPO bewirken eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors. Zunächst soll hier der Einfluss von Serin-Phosphorylierung auf STAT 5A beschrieben werden, anschließend wird die Wechselwirkung zwischen der Kinase DYRK 3 und STAT 5A diskutiert.

#### **4.3.1 Die Phosphorylierung von STAT 5A an Serin-Resten beeinflusst dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor**

Neben der Phosphorylierung an dem in allen STAT-Proteinen konservierten Tyrosin enthalten die meisten STATs in Säugetieren ein weiteres Phosphorylierungsmotiv innerhalb der Transaktivierungsdomäne (TAD) (Decker und Kovarik, 2000). Serin-Phosphorylierung an dieser Stelle ist für STAT1 und STAT3 essentiell, um einen durch Interferon induzierten voll funktionsfähigen Aktivator der Transkription zu bilden (zusammengefasst in Decker und Kovarik, 2000). Auch für STAT4, STAT5 und STAT6 wurde Serin-Phosphorylierung nachgewiesen (Visconti et al., 2000; Kirken et al., 1997; Pesu et al., 2000; Wick und Berton, 2000). Kinasen, die für die Serin-

Phosphorylierung von Ser727 in STAT3 verantwortlich sein können, sind *Extracellular Signal Regulated kinase 1* (ERK1/p44-MAPK), *Homeodomain Interacting Protein Kinase 2* (HIPK2), aber auch DYRK 1A und DYRK 2 (Matsuo et al., 2001).

Sowohl STAT 5A als auch STAT 5B werden in Prolactin-stimulierten Zellen an einem konservierten Serin phosphoryliert (Ser725 in STAT 5A and Ser730 in STAT 5B). Dieses in ein PSP-Motiv eingebettete Serin entspricht der Phosphorylierungsstelle im PS<sup>727</sup>MP-Motiv in STAT1 und 3 (Yamashita et al., 1998). Darüber hinaus wurde bei STAT 5A neben der Phosphorylierung an Tyr694 und Ser725 auch Phospho-Ser779 detektiert (Beuvink et al., 2000; Pircher et al., 1999; Reddy et al., 2000). Die MAP-Kinase ERK ist ein Kandidat für die Serin-Phosphorylierung von STAT5 (Pircher et al., 1999), nicht jedoch die anti-apoptotische Kinase Pim-1 (Paukku, 2003).

Im Gegensatz zu STAT1 und STAT3, die die Phosphorylierung an Ser727 zur Aktivität benötigen, ist bei STAT5 die Rolle der Serin-Phosphorylierung schwieriger zu beschreiben. Die Phosphorylierung von STAT 5A an Serin-Resten hat keinen Effekt bei der durch STAT 5A vermittelten Signalübertragung des Interleukins-2 (IL-2) (Xue et al., 2002). Zunächst wurde auch bei der Signalübertragung des Prolactins (PRL) kein Unterschied eines STAT5-Reportergens bei der Expression von STAT5-Serin-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp detektiert (Yamashita et al., 1998; Beuvink et al., 2000). Später jedoch wurde ein inhibitorischer Effekt für die Phosphorylierung an Serinen auf die Aktivität von STAT5 als Transkriptionsfaktor beschrieben (Yamashita et al., 2001). Die inhibitorische Serin-Phosphorylierung nach PRL-Stimulierung kann bei STAT 5A durch gleichzeitige Stimulierung von Glucocorticoid-Rezeptoren umgekehrt werden (Yamashita et al., 2001). STAT 5A-Ser-725Ala-Mutanten zeigen in PRL-aktivierten Zellen eine verzögerte Tyrosin-Dephosphorylierung und binden eine längere Zeit an DNA (Beuvink et al., 2000). Hier scheint die Serin-Phosphorylierung von STAT 5A die Dauer des übertragenen Signals zu beeinflussen. Im Zusammenhang der Signalübertragung des Wachstumshormons wurde ein inhibitorischer Effekt der Serin-Phosphorylierung für STAT 5A und 5B beschrieben, dieser war jedoch vom Promotor-Kontext abhängig (Park et al., 2001).

Nach Stimulation von Ba/F3-EPO-R-Zellen mit EPO wurde ebenfalls die Phosphorylierung von STAT5A und STAT5B an Serin725/730 detektiert (Haq



et al., 2002). Auch in erythroiden AS-E2-Zellen wird Ser725/730 (STAT5A/5B) EPO-abhängig phosphoryliert, hier jedoch scheint Ser779 permanent phosphoryliert zu sein (Boer et al., 2002). In welcher Art die Serin-Phosphorylierung von STAT5 das EPO-Signal moduliert, ist noch ungeklärt.

Die Phosphorylierung von STAT5 an Serin-Resten hat folglich bei unterschiedlichen Signalwegen verschiedene Funktionen. Sie kann die Dauer der transkriptionellen Aktivierung modulieren oder direkte inhibitorische Effekte auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors ausüben. Zudem kann der Effekt der Serin-Phosphorylierung vom jeweiligen Promotor abhängen (Park et al., 2001). Da STAT 5A mit Tyr694, Ser725 und Ser779 mehrere Phosphorylierungsstellen besitzt, kann an der Transaktivierungsdomäne dieses Transkriptionsfaktors die Integration verschiedener Signale erfolgen (Yamashita et al., 2001).

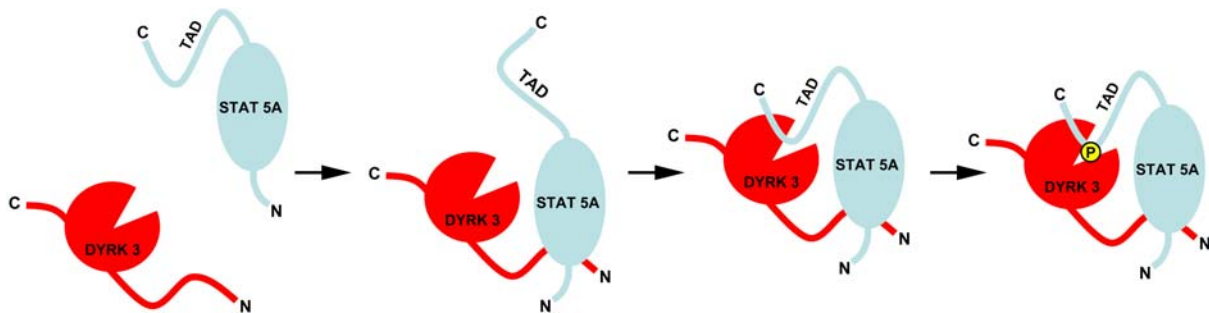
#### 4.3.2 DYRK 3 und STAT 5A

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass DYRK 3 mit STAT 5A im Hefe-System interagiert. Das N-terminale Fragment von Leu27 bis Gly184 von DYRK 3-L war für diese Interaktion ausreichend; die katalytisch aktive Kinase-Domäne von DYRK 3 war hingegen nicht für die Wechselwirkung mit STAT 5A erforderlich. Die isolierte Transaktivierungsdomäne (TAD) von STAT 5A zeigte keine Wechselwirkung mit DYRK 3, obwohl sich in dieser Sequenz mit RLS<sup>780/779P</sup> ein Motiv befindet, das von DYRK 3 phosphoryliert werden kann (Nummerierung der humanen bzw. Maus-Sequenz, siehe **Einleitung 1.2.2** zur Substratspezifität der DYRKs).

Somit ergibt sich für die Wechselwirkung von DYRK 3 und STAT 5A folgendes Modell: Der mutmaßlich für spezifische Substrat-Erkennung zuständige flexible N-Terminus von DYRK 3 bindet als Erstes einen bisher noch nicht näher eingegrenzten Bereich von STAT 5A. In einem zweiten Schritt kann die ebenfalls flexible Transaktivierungsdomäne (Wang et al., 2000) von der Kinase-Domäne von DYRK 3 erkannt, gebunden und phosphoryliert werden. Dieses Modell ist in **Abb. 4.1** dargestellt.

Auch DYRK 2 wurde im Hefe-System auf eine Wechselwirkung mit STAT 5A getestet. Diese Kinase interagierte ebenfalls mit STAT 5A. Hier werden jedoch die Reporter-Gene des Hefe-Systems wesentlich schwächer aktiviert, was auf eine schwächere Bindung hinweist. Das Protein DYRK 2 ist DYRK 3 innerhalb der Kinase-Domäne sehr ähnlich (79% Identität), im N-Terminus

unterscheiden sich diese Kinasen jedoch erheblich (nur 32,1% identisch). Somit spricht dieser Befund ebenfalls für die Rolle des DYRK 3-N-Terminus als spezifische Bindungsdomäne bei der Interaktion mit STAT 5A.



**Abb. 4.1:** Modell der Wechselwirkung zwischen DYRK 3 und STAT 5A. DYRK 3 ist in Rot dargestellt, STAT 5A in Blau. TAD, Transaktivierungsdomäne; P, Phosphat.

#### 4.4 Struktur und Funktion des DYRK 3-N-Terminus

Die in der vorliegenden Arbeit geschilderten Ergebnisse belegen den Einfluss des N-Terminus der DYRK 3-Kinase auf die Lokalisierung des Proteins sowie auf die Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor STAT 5A. Bei der biophysikalischen Analyse des N-Terminus von Maus-DYRK 3 zeigte sich das untersuchte Protein-Fragment als größtenteils flexibel mit einem geringen Anteil an Poly-Prolin-II-Helix und/oder beta-Faltblatt. Trotz des klassischen Bildes von Proteinen, in dem die räumliche Faltung unerlässlich für die Funktion ist, gibt es mittlerweile eine zunehmende Anzahl an Proteinen und Protein-Domänen, die flexibel oder ungeordnet ihre Funktion erfüllen (Wright und Dyson, 1999; Tompa, 2002).

##### 4.4.1 Ungeordnete Proteine und Strukturinduktion

Ungeordnete Proteine oder Protein-Domänen sind bei der Bindung von Liganden flexibler als globuläre Proteine. Zudem haben sie bei gleicher Anzahl von Aminosäuren eine größere Oberfläche für intermolekulare Wechselwirkungen (Gunasekaran et al., 2003). Diese beiden Eigenschaften machen sie zu geeigneten Bindungsdomänen. Häufig gehen ungeordnete

Proteine vor oder während der Erfüllung ihrer biologischen Funktion in einen stärker geordneten Zustand über (Uversky, 2002).

Der eukaryontische Translations-Initiationsfaktor eIF4E wird durch das 4E bindende Protein (4E-BP) 1 inhibiert. 4E-BP 1 ist ein völlig ungeordnetes Protein, das nach einem *Induced Fit*-Mechanismus an eIF4E bindet (Fletcher und Wagner, 1998). Auch das Pro-Peptid des Nerven-Wachstumsfaktors (NGF) ist in Lösung größtenteils unstrukturiert. Als Teil von proNGF stimuliert das Pro-Peptid die *in vitro*-Faltung der NGF-Domäne und scheint in Anwesenheit dieser Domäne strukturiert zu sein (Kliemann et al., 2004). Somit ist es auch möglich, dass im N-Terminus von DYRK 3 in Anwesenheit der Kinase-Domäne Struktur induziert wird.

Im N-Terminus von DYRK 1A wurden sowohl phosphorylierte Serin- als auch Tyrosin-Reste nachgewiesen (Himpel et al., 2001). Obwohl diese Reste nicht zwischen DYRK 1A und DYRK 3 konserviert sind, ist auch eine Phosphorylierung von Seitenketten innerhalb des Serin-reichen Bereiches des DYRK 3-N-Terminus denkbar (Ser77 bis Ser133, vergleiche **Abschnitt 4.1.3**). Diese würde jedoch wahrscheinlich nicht zur Induktion von Sekundärstruktur führen (Kipping et al., 2001), sondern eher zur Regulierung der Interaktion mit Wechselwirkungspartnern dienen.

#### 4.4.2 Bindungsmotive innerhalb des N-Terminus

Die Analyse von DYRK 3-Fragmenten mit C-terminalem GFP deutete auf ein für die cytosolische Verankerung verantwortliches Motiv innerhalb des N-Terminus (siehe **3.1.7** und **4.1.1**). Dieses kann in folgenden Studien durch die Bestimmung der Lokalisierung weiterer Deletionsmutanten von DYRK 3 genauer eingegrenzt werden.

Da im Hefe-System DYRK 3-L<sub>27-184</sub> an STAT 5A binden konnte, die Fragmente von Met1 bzw. Met64 bis Lys151 jedoch keine Wechselwirkung mit diesem Transkriptionsfaktor zeigten, kann das mit STAT 5A interagierende Motiv zwischen Lys151 und Gly184 im N-Terminus von DYRK 3 vermutet werden. Dieser Bereich enthält mehrere Tyrosin-Reste und hydrophobe Seitenketten, die bei einer Interaktion von Bedeutung sein können.

Zusammenfassend handelt es sich beim N-Terminus von DYRK 3 um eine flexible Bindungsdomäne. Diese ist für die Interaktion mit mutmaßlichen

Substraten verantwortlich. Die Protein-Kinasen der DYRK-Familie zeigen eine ähnliche Aktivität gegenüber der Primärsequenz ihrer Substrate (Campbell und Proud, 2002; Himpel et al., 2000). Hier kann durch zusätzliche Interaktion mit dem für DYRK 3 individuellen N-Terminus die spezifische Phosphorylierung von Substraten sichergestellt werden.

#### 4.5 Experimenteller Ausblick

In dieser Arbeit wurde sowohl die Lokalisierung von DYRK 3 als auch die Interaktion mit möglichen Substraten erfolgreich analysiert. Bei beiden Prozessen spielte der in Lösung flexible N-Terminus eine entscheidende Rolle. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für neue Fragestellungen, die jedoch nicht mehr Teil dieser Arbeit sind. Diese möglichen Forschungsvorhaben seien hier kurz umrissen.

Leptomycin B (LMB) ist ein spezifischer Inhibitor des Export-Rezeptors CRM1 (Kudo et al., 1999). Wenn der Export von DYRK 3 aus dem Kern von CRM1 abhängig ist, dann sollte durch Inkubation der Zellen mit LMB das Protein im Zellkern angereichert werden. Dies wäre ein zusätzlicher Beweis für das *Shuttling* von DYRK 3 zwischen Zellkern und Cytosol.

Durch die Analyse von weiteren N-terminalen Deletionsmutanten von DYRK 3 kann in weiterführenden Studien auch das für die cytosolische Verankerung verantwortliche Strukturelement eingegrenzt werden. Dabei sind besonders die für das *Shuttling* benutzten Signale von Interesse, da in der Aminosäure-Sequenz von DYRK 3 keine klassischen Sortiersignale zu finden sind. Auch die genauere Analyse der Zellspezifität der Lokalisierung ist von Interesse. Hierbei ist eventuell die Identifizierung der Proteine möglich, die die Zelltyp-abhängige Lokalisierung von DYRK 3 verursachen.

Nach der erfolgreichen Etablierung von Protokollen zur Anreicherung von DYRK 3 aus Säugetier-Zellen (entweder durch FACS oder Immunopräzipitation) kann die posttranslationale Modifizierung dieser Kinase durch zweidimensionale Gelelektrophorese sowie *Western Blot*-Analysen weiterführend untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung zwischen DYRK 3 und STAT 5A ausführlich im Hefe-System untersucht. Für weiterführende Studien steht

nun STAT 5A in einem eukaryontischen Expressionsvektor sowie eine Fusion des DYRK 3-N-Terminus mit GST bereit. Überdies ist die Analyse weiterer Wechselwirkungspartner der Kinase DYRK 3 von großem Interesse. So bleibt zu klären, ob nicht das in einem letzten *Screen* identifizierte Spectrin das gesuchte cytosolische Ankerprotein von DYRK 3 darstellt. Diese neuen Ansätze sollen zum weiteren Verständnis der Funktion der Kinase DYRK 3 auf molekularer Ebene beitragen.