

Zelluläre und biophysikalische Studien an DYRK 3:

Der N-Terminus als Schlüssel zum Verständnis dieser Protein-Kinase



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Biochem. Jonathan Wolf Müller
geboren am 29. Juli 1976 in Haldensleben

Gutachterin/Gutachter:

1. PD Dr. Peter Bayer, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
2. PD Dr. Elisabeth Schwarz, Martin-Luther-Universität
3. Prof. Dr. Christian Herrmann, Ruhr-Universität Bochum

Halle (Saale), Juli 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007288

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007288>]

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Molekulare und Strukturelle Biophysik am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund unter Anleitung von PD Dr. Peter Bayer im Zeitraum von August 2001 bis Juli 2004 angefertigt und am 23. September 2004 vor dem Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg öffentlich verteidigt.

Verzeichnis der angewandten Abkürzungen

2D	zweidimensional
aa	Aminosäure
AD, (TAD)	(Trans-)Aktivierungsdomäne
BD	DNA bindende Domäne
bp, kb	Basenpaar(e), 1000 bp
BSA	Serum-Albumin des Rindes
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CD	Circularer Dichroismus
CDK, CLK	Cyclin abhängige Protein-Kinase, CDC2 ähnliche Kinase
cDNA	<i>coding/complementary DNA</i>
CDS	<i>Code determining Sequence</i> , codierende Sequenz
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CMGC	Gruppe von Proteinkinasen einschließlich CDK, MAPK, GSK3 und CLK
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAPI	4'-6-Diamidine-2-Phenylindol
DEAE	Diethyl-Amino-Ethyl
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	1, 4-Dithio-DL-threitol, Cleland Reagenz razemisch
DYRK (3)	<i>Dual specificity tYrosine phosphorylation Regulated Kinase</i> (3)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EPO(R)	Erythropoietin (-Rezeptor)
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FCS	Fötale Serum des Kalbes
FKHR	Transkriptionsfaktor <i>Forkhead in Rhabdomyosarcoma</i>
FOXO	<i>Forkhead</i> -Proteine der O-Gruppe
Gdm-Cl	Guanidinium-Hydrochlorid
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSH/GSSG	L-Glutathion, reduziert/oxidiert
GSK3	Glycogen-Synthase Kinase 3
HIPK	<i>Homeodomain Interacting Protein Kinase</i>
HPLC, (RP-)HPLC	(Umkehrphasen-)Hochdruck-Flüssigchromatographie
IMAC	Affinitäts-Chromatographie an immobilisierten Metallionen
IPTG	Isopropyl- β -D-1-Thiogalaktopyranosid
JAK(2)	Janus-Tyrosinkinase (2)
<i>kd</i>	Mutante mit katalytisch inaktiver Kinase-Domäne (<i>kinase dead</i>)
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase
LB	Luria-Bertani-Medium

LiAc	Lithium-Acetat
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEK	<u>MAPK</u> - und <u>ERK</u> -Kinase
MNB	<i>Minibrain Kinase in D. melanogaster</i>
M _w	Molekulargewicht
NES	Kern-Exportsignal
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Signal zum Kern-Import
nt	Nucleotid(e)
OD ₍₆₀₀₎	optische Dichte (bei 600 nm)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3-K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKA	Protein-Kinase A bzw. cAMP-abhängige Protein-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF-Membran	Membran aus Polyvinyliden-Difluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SCF/c-kit	Stammzellen-Faktor/SCF-Rezeptor
SD	synthetisches Minimalmedium
SD/WAHLX	SD ohne Tryptophan (W), Adenin (A), Histidin (H) und Leucin (L), aber mit X- α -Gal (X)
SD/WL	SD ohne Tryptophan (W) und Leucin (L)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2/SH3	<i>SRC Homology Domain 2/3</i>
STAT (5A)	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5A</i>
TAE	Tris, Acetat, EDTA
TBS(-T)	mit Tris gepufferte Salzlösung (mit Tween-20)
TCA	Trichlor-Essigsäure
TEV	Protease aus <i>Tobacco Etch Virus</i>
TFA	Trifluor-Essigsäure
TM	Transmembran-Domäne
TNT	Transkriptions- und Translationssystem
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
<i>wt</i>	Wildtyp
X- α -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- α -D-galactopyranosid
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid
Y2H	Yeast Two-Hybrid
YPD(A)	Hefeextrakt/Pepton/Dextrose-Medium (mit Adenosin)

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS DER ANGEWANDTEN ABKÜRZUNGEN	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
<u>1</u>	<u>1</u>
EINLEITUNG	
1.1	1
PROTEIN-KINASEN UND DIE UNTERFAMILIE DER DYRKs	
1.2	2
DIE KINASE-FAMILIE DER DYRK-PROTEINE	
1.2.1	3
AKTIVIERUNG DER DYRKs DURCH AUTOPHOSPHORYLIERUNG	
1.2.2	5
SUBSTRATE VON DYRK-ENZYMEN	
1.3	6
VERTRETER DER DYRK-FAMILIE VON PROTEIN-KINASEN	
1.3.1	6
DIE FUNKTION VON YAK1P, YAKA UND POM1P	
1.3.2	7
DYRK-KINASEN IN <i>C. ELEGANS</i> UND <i>D. MELANOGASTER</i>	
1.3.3	9
DIE KINASE DYRK 1A	
1.3.4	10
WEITERE DYRK-PROTEINE IN SÄUGETIEREN	
1.4	11
LOKALISIERUNG VON DYRK-PROTEINEN UND ERK-KINASEN	
1.4.1	11
CYTOSOLISCHE UND KERN-LOKALISIERTE DYRKs	
1.4.2	13
DIE DYNAMISCHE LOKALISIERUNG DER MAP-KINASE ERK2	
1.5	14
DIE KINASE DYRK 3	
1.5.1	15
DIE ENTWICKLUNG VON ROTEN BLUTZELLEN	
1.5.2	16
DIE KINASE DYRK 3 SPIELT EINE BESONDERE ROLLE IN ERYTHROIDEN VORLÄUFERN	
1.5.3	17
DIE ISOFORMEN VON DYRK 3 UNTERSCHIEDEN SICH IN DEN ERSTEN AMINOSÄUREN DES N-TERMINUS	
1.5.4	18
DIE DOMÄNEN VON DYRK 3	
1.6	20
ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	
<u>2</u>	<u>21</u>
MATERIAL UND METHODEN	
2.1	21
MATERIALIEN	
2.1.1	21
CHEMIKALIEN, ENZYME, ANTIKÖRPER UND <i>KITS</i>	
2.1.2	22
MOLEKULARBIOLOGISCHE MATERIALIEN	
2.1.3	23
PUFFER, GELE UND LÖSUNGEN	
2.1.4	24
NÄHRMEDIEN	
2.2	25
METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE	
2.2.1	25
TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> MIT PLASMID-DNA	
2.2.2	26
PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i>	
2.2.3	26
RESTRIKTIONSENZYMATISCHE SPALTUNG VON DNA	
2.2.4	26
LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	
2.2.5	27
REINIGUNG, ANALYSE UND SEQUENZIERUNG VON DNA	
2.3	28
POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	
2.3.1	28
AMPLIFIZIERUNG VON DNA MITTELS POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	

2.3.2	ZIELGERICHTETE MUTAGENESE MIT <i>Dpn</i> I-SELEKTION (QUICKCHANGE)	29
2.3.3	PCR-MUTAGENESE MIT MEGAPRIMER	29
2.4	ZELLBIOLOGIE, TRANSFEKTION UND MIKROSKOPIE	30
2.4.1	ZELLKULTUR VERSCHIEDENER ZELLINIEN	30
2.4.2	TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT PLASMID-DNA	30
2.4.3	FÄRBUNG UND EINBETTUNG DER ZELLEN	31
2.4.4	FLUORESCENZ-MIKROSKOPIE	32
2.5	STABILE TRANSFEKTION VON CHO-ZELLEN	33
2.5.1	DAS FLP-IN-SYSTEM	33
2.5.2	<i>LACZ</i> -FÄRBUNG VON FLP-IN-CHO-ZELLEN	35
2.5.3	NACHWEIS DES TRANSGENS IN GENOMISCHER DNA	35
2.6	ARBEITEN MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	36
2.6.1	TRANSFORMATION VON <i>S. CEREVISIAE</i> MIT REKOMBINANTER DNA	36
2.6.2	DAS HEFE-SYSTEM MATCHMAKER3	36
2.6.3	<i>YEAST TWO-HYBRID SCREENS</i> VON cDNA-BIBLIOTHEKEN	37
2.6.4	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS <i>S. CEREVISIAE</i>	37
2.6.5	PROTEIN-EXTRAKT AUS <i>S. CEREVISIAE</i> FÜR <i>WESTERN BLOT</i>	37
2.6.6	PHÄNOTYPISCHE ANALYSE DER ERHALTENEN KLONE	38
2.7	BIOINFORMATISCHE METHODEN	38
2.8	HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG VON PROTEINEN	39
2.8.1	EXPRESSION VON cMYC-DYRK 3-S IM TNT-SYSTEM	39
2.8.2	EXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	40
2.8.3	ZELLAUFSCHLUSS UND IMAC	40
2.8.4	WEITERE CHROMATOGRAPHIE-SCHRITTE	41
2.9	PROTEINCHEMISCHE PROTOKOLLE	41
2.9.1	LIMITIERTE PROTEOLYSE MIT TRYPSIN BZW. PAPAIN	41
2.9.2	FÄLLUNG VON PROTEINEN	42
2.9.3	FRAKTIONIERUNG VON SÄUGETIER-ZELLEXTRAKTEN	42
2.9.4	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	42
2.9.5	<i>WESTERN BLOT</i> MIT SÄUGETIER-ZELLEXTRAKTEN	43
2.9.6	ANALYSE VON SÄUGETIER-ZELLEXTRAKTEN IN 2D-GELEN	43
2.10	METHODEN DER PROTEIN-ANALYTIK	44
2.10.1	UV/VIS-SPEKTROSKOPIE	44
2.10.2	MESSUNG DES DICHOISMUS VON CIRCULAR POLARISIERTEM LICHT (CD)	44
2.10.3	TRYPSIN-VERDAU FÜR MALDI- <i>FINGERPRINTING</i>	44
2.10.4	MALDI-TOF	45
2.10.5	N-TERMINALE PROTEIN-SEQUENZIERUNG NACH EDMAN	45
2.11	KERN-SPINRESONANZ (NMR)	46
2.11.1	EINDIMENSIONALE ¹ H-NMR	46
2.11.2	MARKIERUNG VON PROTEINEN MIT STABILEN ISOTOPEN	46
2.11.3	¹⁵ N-HSQC-NMR-SPEKTROSKOPIE	46

3	<u>ERGEBNISSE</u>	47
3.1	DIE LOKALISIERUNG VON DYRK 3 IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN	47
3.1.1	DATENBANK-ANALYSE DER EXPRESSION VON DYRK 3 UND AUSWAHL DES ZELL-SYSTEMS	47
3.1.2	DYRK 3 ALS FUSION MIT DsRED	48
3.1.3	FLAG-DYRK 3-L IST IN HEK-293-ZELLEN VOM ZELLKERN AUSGESCHLOSSEN	50
3.1.4	KLONIERUNG VON DYRK 3-FUSIONEN MIT C-TERMINALEM GFP	51
3.1.5	DYRK 3 MIT C-TERMINALEM GFP IST IN HEK-293-ZELLEN VOM KERN AUSGESCHLOSSEN	52
3.1.6	GFP-FUSIONEN VON DYRK 3 SIND IN HEP-G2-ZELLEN VOM KERN AUSGESCHLOSSEN	54
3.1.7	FRAGMENTE VON DYRK 3 ALS GFP-FUSIONEN	55
3.2	DIE KINASE DYRK 3 IN EUKARYONTISCHEN EXPRESSIONSSYSTEMEN	58
3.2.1	ANALYSE VON DYRK 3 MITTELS 2D-GELELEKTROPHORESE	58
3.2.2	<i>IN VITRO</i> -EXPRESSION VON DYRK 3	61
3.2.3	HUMANE DYRK 3-L IN STABIL TRANSFIZIERTEN FLP-IN-CHO-ZELLEN	63
3.3	DER N-TERMINUS DER KINASE DYRK 3 INTERAGIERT MIT STAT 5	67
3.3.1	SUCHE NACH INTERAKTIONSPARTNERN VON DYRK 3	67
3.3.2	DYRK 3 INTERAGIERT MIT STAT 5A IM HEFE-SYSTEM	69
3.3.3	DIE KINASE-AKTIVITÄT VON DYRK 3 IST FÜR DIE INTERAKTION MIT STAT 5A NICHT ERFORDERLICH	71
3.3.4	DER DYRK 3-N-TERMINUS IST AUSREICHEND FÜR DIE WECHSELWIRKUNG MIT STAT 5A	72
3.4	DER N-TERMINUS VON DYRK 3 BESITZT NUR WENIG SEKUNDÄRSTRUKTUR IN LÖSUNG	75
3.4.1	DER N-TERMINUS DER HUMANEN DYRK 3 NEIGT ZUR AGGREGATION	75
3.4.2	SEQUENZVERGLEICH DES DYRK 3-N-TERMINUS AUS VERSCHIEDENEN SÄUGETIER-SPEZIES	76
3.4.3	KLONIERUNG UND EXPRESSION VOM MAUS-DYRK 3-L ₂₇₋₁₈₃	78
3.4.4	IM CD ZEIGT MAUS-DYRK 3-L ₂₇₋₁₈₃ EINEN GERINGEN ANTEIL AN SEKUNDÄRSTRUKTUR	81
3.4.5	DIE LIMITIERTE PROTEOLYSE VON MAUS-DYRK 3-L ₂₇₋₁₈₃ ERGIBT KLEINERE FRAGMENTE	82
3.4.6	NMR-ANALYSE VON MAUS-DYRK 3-L ₂₇₋₁₈₃	84
3.4.7	WEITERE N-TERMINALE FRAGMENTE VON DYRK 3	85
4	<u>DISKUSSION</u>	86
4.1	DIE LOKALISIERUNG VON DYRK 3 IN SÄUGETIER-ZELLEN	86
4.1.1	DER N-TERMINUS VON DYRK 3 ENTHÄLT EINE MUTMAßLICHE BINDUNGSSTELLE FÜR EIN CYTOSOLISCHES ANKERPROTEIN	86
4.1.2	<i>SHUTTLING</i> UND VERANKERUNG VON PROTEINEN	87
4.1.3	EIN NEUER MECHANISMUS DER REGULATION VON DYRK 3	88
4.2	EXPRESSION DER KINASE DYRK 3 IN EUKARYONTISCHEN ZELLEN	89
4.2.1	EXPRESSIONSLEVEL VON DYRK 3	89

4.2.2	DIE STABILISIERUNG VON DYRK 3	91
4.3	ÜBER DIE WECHSELWIRKUNG VON DYRK 3 MIT MÖGLICHEN SUBSTRATEN	92
4.3.1	DIE PHOSPHORYLIERUNG VON STAT 5A AN SERIN-RESTEN BEEINFLUSST DESSEN AKTIVITÄT ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR	92
4.3.2	DYRK 3 UND STAT 5A	94
4.4	STRUKTUR UND FUNKTION DES DYRK 3-N-TERMINUS	95
4.4.1	UNGEORDNETE PROTEINE UND STRUKTURINDUKTION	95
4.4.2	BINDUNGSMOTIVE INNERHALB DES N-TERMINUS	96
4.5	EXPERIMENTELLER AUSBLICK	97
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>99</u>
<u>6</u>	<u>SUMMARY</u>	<u>101</u>
<u>7</u>	<u>REFERENZEN</u>	<u>103</u>
<u>8</u>	<u>ANHANG</u>	<u>118</u>
8.1	PLASMIDE, VEKTOREN UND OLIGONUCLEOTIDE	118
8.2	DIE VERWENDETEN BAKTERIEN- UND HEFE-STÄMME	124
8.3	ANGABEN ZU DEN <i>YEAST TWO-HYBRID SCREENS</i>	124
	LEBENSLAUF	126
	ERKLÄRUNG	128
	DANK	129

1 Einleitung

1.1 Protein-Kinasen und die Unterfamilie der DYRKs

Protein-Kinasen stellen eine der größten Gen-Familien im humanen Genom dar (Kostich et al., 2002). Ursprüngliche Schätzungen beliefen sich auf bis zu 1000 Gene im menschlichen Genom (Cohen, 2000). Nach vollständiger Sequenzierung des humanen Genoms wurde diese Zahl nun auf 518 Gene korrigiert (Manning et al., 2002b). Aufgrund der Ähnlichkeit in der Kinase-Domäne können diese in Stammbäumen dargestellt werden - sowohl innerhalb einer Spezies (**Abb. 1.1**) als auch Spezies-übergreifend (Manning et al., 2002a). Dabei können Familien und Unter-Familien von Protein-Kinasen definiert werden. Häufig ähneln sich Vertreter einzelner Kinase-Familien nicht nur in ihrer Aminosäure-Sequenz, sondern besitzen auch ähnliche funktionelle Eigenschaften (Plowman et al., 1999).

Eine der großen Gruppen von Protein-Kinasen ist die so genannte CMGC-Gruppe. Hierzu gehören die namensgebenden Protein-Kinasen CDK, MAPK, GSK3 und CLK (Hunter und Plowman, 1997). Neben der Gruppe der HIPK-

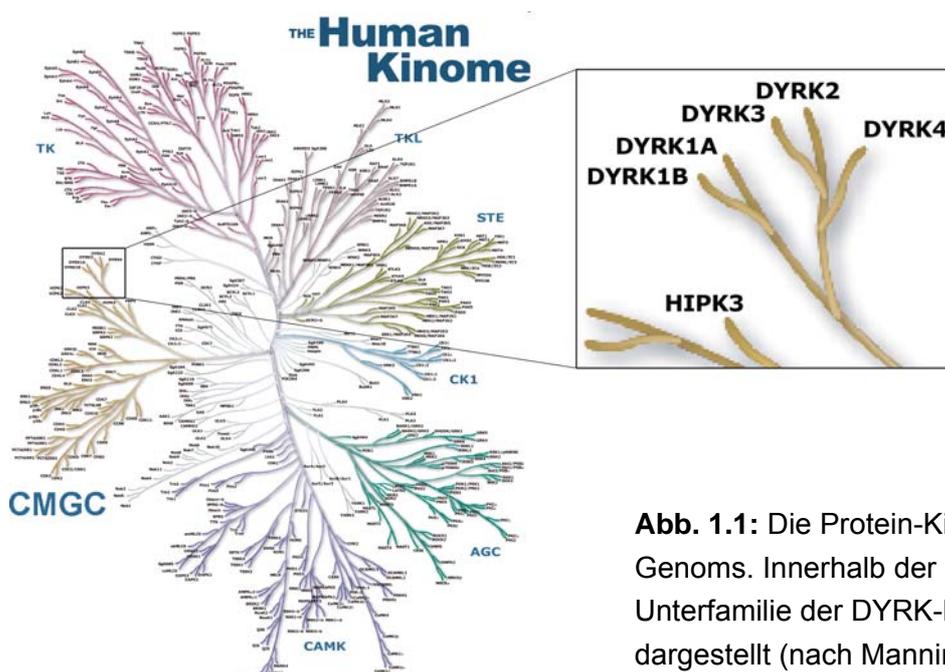


Abb. 1.1: Die Protein-Kinasen des humanen Genoms. Innerhalb der CMGC-Gruppe ist die Unterfamilie der DYRK-Kinasen vergrößert dargestellt (nach Manning et al., 2002).

Proteine (Engelhardt et al., 2003) sind die *Dual specificity tyrosine Regulated Kinases* bzw. DYRKs (siehe **Abb.1.1**) eine neuere Unterfamilie dieser Gruppe (Miyata und Nishida, 1999). Im menschlichen Genom konnten insgesamt fünf Gene von Vertretern dieser Gruppe identifiziert werden. Im Jahre 1996 wurde von mehreren Gruppen gleichzeitig der erste menschliche Vertreter DYRK 1A entdeckt, der mutmaßlich für die mit Down-Syndrom assoziierte geistige Fehlentwicklung verantwortlich ist (Chen und Antonarakis, 1997; Kentrup et al., 1996; Shindoh et al., 1996; Song et al., 1997; Guimera et al., 1996). Diesem bis heute am Intensivsten erforschten DYRK-Protein folgten DYRK 1B, DYRK 2, DYRK 3 und DYRK 4 (Leder et al., 1999; Becker et al., 1998; Lord et al., 2000; Xia et al., 1998). Durch alternative mRNA-Prozessierung existieren von jedem dieser Proteine verschiedene Isoformen.

DYRK-Proteine sind in allen bisher untersuchten Eukaryonten zu finden. Sie sind nach Studien in Hefe (Yak1p), *Drosophila* (MNB) und Maus an so fundamentalen Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus, der Zellteilung und dem Übergang von der Vermehrung zur Differenzierung beteiligt (Bähler und Pringle, 1998; Souza et al., 1998). In höheren Eukaryonten spielen sie zudem eine Rolle bei der Entwicklung des Gehirns (Becker und Joost, 1999).

1.2 Die Kinase-Familie der DYRK-Proteine

Die einzelnen Vertreter der DYRK-Familie von Protein-Kinasen ähneln sich innerhalb der Kinase-Domäne und einer kurzen N-terminalen Erweiterung (*DYRK Homology Box*), besitzen jedoch individuelle N- und C-terminale Domänen (Becker und Joost, 1999). Zudem zeigen sie einige für diese Gruppe von Kinasen spezifische Merkmale (Becker et al., 1998), die im Folgenden beschrieben werden. Die dabei verwendete Einteilung der Kinase-Domäne entspricht der klassischen Einteilung in zwölf Subdomänen (Hanks und Quinn, 1991; Hanks und Hunter, 1995).

C-terminal zur Subdomäne VII zeigen DYRK-Proteine ein SSC-Motiv, das nicht in anderen Kinasen vorkommt. Innerhalb der Subdomänen VIB und VII finden sich die DYRK-typischen Motive HCDLKPEN und YXYIQSRFYR(S/A)PE. Das letztere Motiv enthält das Doppel-Tyrosin-Motiv YxY, das an dieser Stelle dem von MAP-Kinasen bekannten TxY-Motiv in der Aktivierungsschleife entspricht (Miyata und Nishida, 1999). Diese Merkmale der DYRK-Proteine sind schematisch in **Abb. 1.2** dargestellt. Dort ist auch ein

für alle Kinasen essentielles Lysin in Subdomäne II gekennzeichnet. Diese Aminosäure ist an der ATP-Bindung beteiligt (Hanks et al., 1988; Ullrich und Schlessinger, 1990).

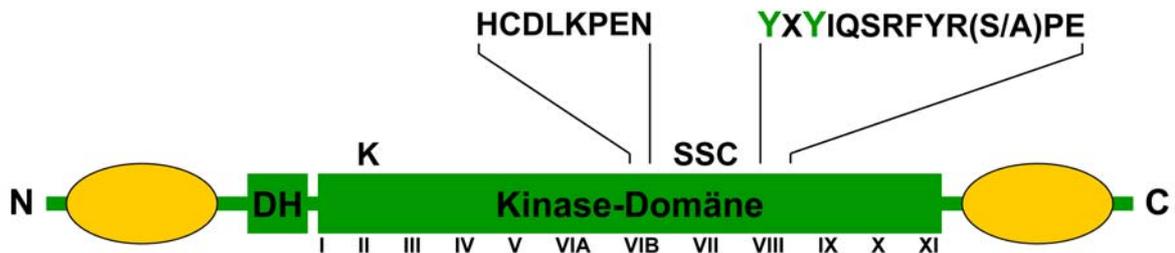


Abb. 1.2: Schematische Darstellung einer DYRK-Kinase. DH, *DYRK Homology Box*; K, für ATP-Bindung essentieller Lysin-Rest; gelbes Oval, individuelle N- und C-terminale Erweiterungen. Innerhalb der DYRK-Familie konservierte Reste sind oberhalb der entsprechenden Subdomäne zu sehen, einschließlich des YxY-Motivs in der Aktivierungsschleife. Die Einteilung der Kinase-Domäne in zwölf Subdomänen erfolgte nach Hanks und Quinn (1991).

1.2.1 Aktivierung der DYRKs durch Autophosphorylierung

Dual specificity tyrosine Regulated Kinases (DYRKs) sind eine Gruppe von Enzymen, die sich selbst sowohl an Serin/Threonin- als auch an Tyrosin-Seitenketten phosphorylieren. Für exogene Substrate konnte bisher jedoch einzig die Phosphorylierung an Serin/Threonin-Resten gezeigt werden (Becker und Joost, 1999). Die Phosphorylierung des YxY-Motivs der Aktivierungsschleife ist essentiell für die katalytische Aktivität der DYRK-Proteine. Meist steht hier x für ein Threonin, nur bei DYRK1 ist Glutamin und bei MNB Histidin zu finden (Becker et al., 1998).

In *E. coli* exprimierte DYRK 1A ist an Tyrosinen phosphoryliert (Kentrup et al., 1996). Dabei ist Tyr321 des DYRK 1A-Motivs ³¹⁹YQY³²¹ in einem Struktur-Modell (Himpel et al., 2001) in ähnlicher Position wie Tyr185 in der Kristallstruktur der aktivierten MAP-Kinase ERK2 (Canagarajah et al., 1997, PDB-Code 2ERK). Sowohl ERK2 als auch das Modell von DYRK 1A sind in **Abb. 1.3** dargestellt (nach Himpel et al., 2001). In Übereinstimmung mit diesem Modell führt der Einzelaustausch Tyr321Phe ebenso wie die Doppelmutation Tyr319Phe, Tyr321Phe zum Verlust der Kinase-Aktivität (Kentrup et al., 1996; Himpel et al., 2001). DYRK 1A Tyr319Phe hingegen zeigt fast die Aktivität des Wildtyps. Die Kartierung der phosphorylierten Aminosäuren

von in *E. coli* exprimierter DYRK 1A durch MS/MS ergab zudem, dass im Wildtyp-Protein Tyr321, nicht jedoch Tyr319 einen Phosphat-Rest trägt (Himpel et al., 2001). Diese Studien zeigten überdies auch die Phosphorylierung von Seitenketten innerhalb des N-Terminus von DYRK 1A. Weitere Untersuchungen zur Funktion einzelner Aminosäuren innerhalb der Aktivierungsschleife deuteten neben Tyr321 auch auf eine kritische Rolle von Gln323 bei der Aktivierung der DYRK-Kinasen hin (Wiechmann et al., 2003). An dieser Position ist sonst in Kinasen kaum ein Glutamin zu finden.

Die Sequenz der Aktivierungsschleife zeigt zwischen den einzelnen Vertretern der DYRK-Familie ein hohes Maß an Übereinstimmung (Becker und Joost, 1999; Becker et al., 1998). Neben DYRK 1A wurde die entscheidende Rolle des zweiten Tyrosins auch bei Maus-DYRK 3 beschrieben (Li et al., 2002). Funktionelle Analysen bestätigten ferner bei humaner DYRK 1B, Yak1p aus der Bäckerhefe, Pom1p aus der Spaltheife und dDYRK 2 aus *Drosophila* die Bedeutung des YxY-Motivs (Lee et al., 2000; Kassis et al., 2000; Bähler und Nurse, 2001; Lochhead et al., 2003).

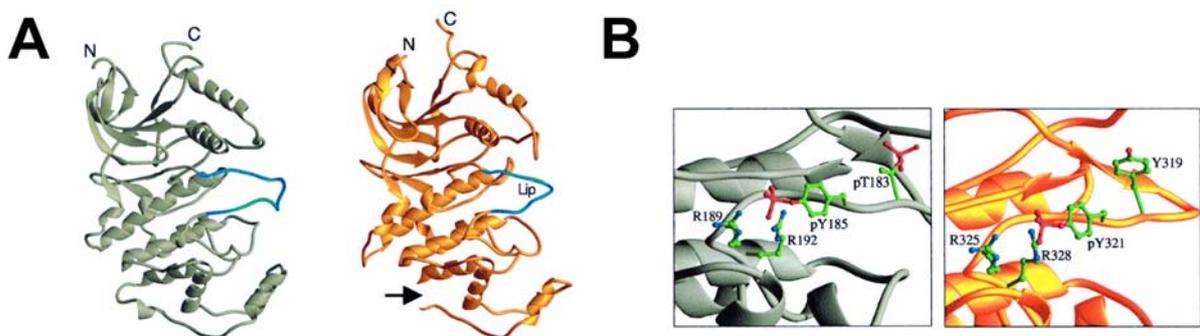


Abb. 1.3: **A**, Struktur der phosphorylierten ERK2 (links) und das Modell von DYRK1A (rechts). Dieses Modell umfasst die DYRK1A-Sequenz von Asp138 bis Arg526. Die Aktivierungsschleife (*Lip*) ist bei beiden Strukturen blau hervorgehoben. Eine nur in DYRK1A vorhandene Insertion von 21 Aminosäuren wurde nicht moduliert (Pfeil). **B**, Die Aktivierungsschleife von ERK2 und DYRK1A und umgebende Strukturen. Tyr185 in ERK2 sowie Tyr321 in DYRK1A sind phosphoryliert. Abbildung nach Himpel et al. (2001).

Die Aktivierung der DYRK-Proteine durch Phosphorylierung ähnelt dem Aktivierungsmechanismus der MAP-Kinasen (Canagarajah et al., 1997). Im Gegensatz zu MAPKs ist die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife bei DYRK-Kinasen jedoch von deren eigener Kinase-Aktivität abhängig (Himpel et al., 2001; Li et al., 2002). Somit benötigen DYRK-Proteine keine

übergeordneten Kinasen zur Aktivierung wie in der MAP-Kinase-Kaskade, stattdessen zeigen DYRKs die außergewöhnliche Eigenschaft einer Autoaktivierung. Welche Rolle diese Eigenschaft allerdings bei der Regulation der DYRKs spielt, ist bisher jedoch ungeklärt.

1.2.2 Substrate von DYRK-Enzymen

Die Autophosphorylierung an Tyrosin-Seitenketten in der Aktivierungsschleife ist essentiell für die Aktivität der DYRK-Proteine. Exogene Substrate werden von diesen Kinasen hingegen nur an Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert. DYRK-Enzyme können Histon H3, teils Histon H2B sowie MBP (basisches Myelinprotein) *in vitro* phosphorylieren (Becker et al., 1998; Kentrup et al., 1996; Lord et al., 2000).

Nach *in vitro*-Studien mit Peptid-Arrays ist DYRK 1A eine Arginin-abhängige Ser/Thr-Kinase, die die Motive Rx(S/T)P oder Rxx(S/T)P phosphoryliert (Himpel et al., 2000). Die anderen Vertreter der DYRK-Familie von Protein-Kinasen zeigen in der Primärsequenz ihrer Substrate eine sehr ähnliche Spezifität (Kassis et al., 2000; Moriya et al., 2001; Woods et al., 2001b; Woods et al., 2001c; Wang et al., 2003). Ein Arginin-Rest in Position -2 oder -3 relativ zum phosphorylierten Ser/Thr ist für eine Phosphorylierung durch die DYRKs essentiell, diese Aminosäure kann nicht einmal durch Lysin ersetzt werden. Im Gegensatz dazu kann das Prolin in +1 Position durchaus durch ein Valin ersetzt werden (Campbell und Proud, 2002).

Das von DYRK-Proteinen phosphorylierte Sequenz-Motiv wurde durch *in vitro*-Versuche mit Peptiden definiert. Auch bei der Phosphorylierung von globulären Proteinen zeigen verschiedene DYRK-Kinasen sehr ähnliche Substratspezifität. Sowohl DYRK 1A als auch DYRK 2 phosphorylierten das mit Mikrotubuli assoziierte Protein tau sowie den eukaryontischen Translations-Initiationsfaktor eIF2B_{epsilon} (Woods et al., 2001b). Beide Enzyme können auch STAT 3 phosphorylieren (Matsuo et al., 2001).

Wenn sich aber die einzelnen DYRK-Kinasen in ihrer Substratspezifität nur geringfügig unterscheiden, muss die gezielte Phosphorylierung von bestimmten Substraten durch andere Mechanismen sichergestellt werden. Spezifität kann hier durch Unterschiede in der Gewebsverteilung ihrer Expression, durch unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung oder durch andere bisher noch nicht bekannte Mechanismen entstehen.

1.3 Vertreter der DYRK-Familie von Protein-Kinasen

DYRK-Proteine wurden bisher in allen bisher untersuchten Eukaryonten gefunden. Sie spielen eine Rolle bei so zentralen Entwicklungsprozessen wie Zellteilung, Zellzyklus, Differenzierung und Neurogenese. Basierend auf der hohen Sequenz-Ähnlichkeit innerhalb der Kinase-Domäne ist ein Stammbaum der DYRK-Gruppe von Protein-Kinasen in **Abb. 1.4** dargestellt (nach Raich et al., 2003). Im Folgenden werden Vertreter der DYRK-Familie von Protein-Kinasen in verschiedenen Organismen vorgestellt.

1.3.1 Die Funktion von Yak1p, YakA und Pom1p

Yak1p aus Bäckerhefe

Die Kinase Yak1p aus Bäckerhefe ist ein Gegenspieler des Ras/PKA-Signalweges und ein Inhibitor des Zellwachstums (Garrett et al., 1991; Garrett und Broach, 1989). Yak1p wird von PKA durch die Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 negativ reguliert (Smith et al., 1998), umgekehrt beeinflusst jedoch Yap1p die Lokalisierung der regulatorischen PKA-

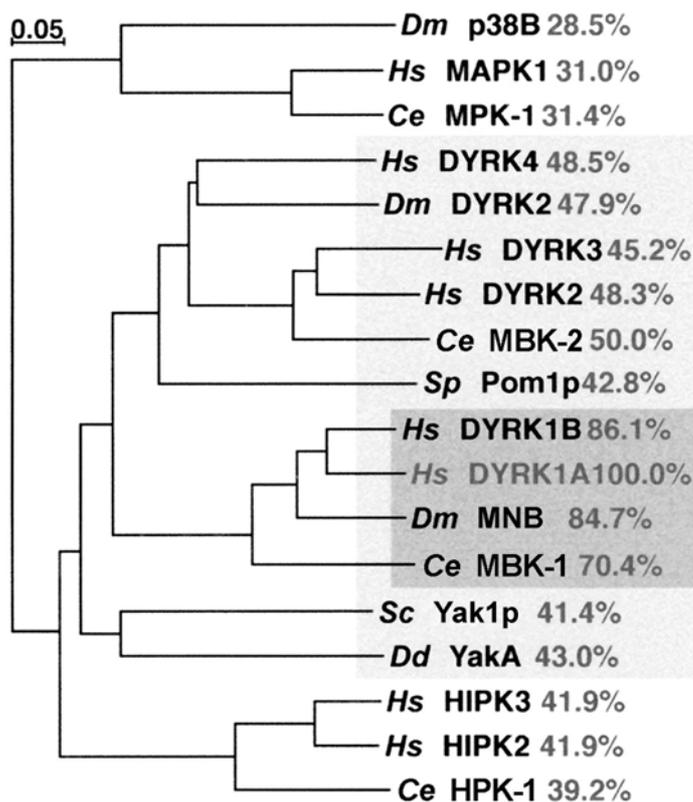


Abb. 1.4: DYRK-Kinasen in verschiedenen Spezies.

Ce, Nematode *C. elegans*;

Dd, Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*.

Dm, Fruchtfliege;

Hs, Mensch;

Sc, Bäckerhefe *S. cerevisiae*;

Sp, Spaltheife *S. pombe*;

(nach Raich et al., 2003)

Untereinheit Bcy1 durch Phosphorylierung im N-Terminus (Griffioen et al., 2001). Überdies vermittelt Yak1p bei Glucose-Mangel durch Phosphorylierung von Pop2p einen G1-Arrest des Zellzyklus (Moriya et al., 2001).

YakA aus Dictyostelium

Das Protein YakA aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* spielt eine Rolle beim Übergang vom Wachstum zur Differenzierung (Souza et al., 1999). YakA vermittelt die durch Nährstoff-Mangel induzierte Differenzierung und einen PKA-abhängigen Arrest des Zellzyklus (Souza et al., 1998) und hat somit eine ähnliche Funktion wie Yak1p. Auch in die Regulation des PKA-abhängigen Zellzyklus-Arrests durch oxidativen, nitrosylierenden oder Hitze-Stress ist YakA involviert (Taminato et al., 2002). Überdies reguliert diese Kinase G-Protein-gekoppelte Signale bei der Differenzierung (van Es et al., 2001).

Pom1p aus der Spaltheife

Die Zellen der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* wachsen polarisiert entlang einer einzigen Achse (Chang und Peter, 2003). Die Kinase Pom1p übermittelt hier Positionsinformationen für das polarisierte Wachstum und auch für eine gerichtete Zellteilung durch Interaktion sowohl mit dem Aktin- als auch mit dem Cytoskelett aus Mikrotubuli (Bähler und Pringle, 1998). Die Aktivität von Pom1p ist abhängig vom Zellzyklus reguliert und essentiell für die zelluläre Symmetrie während Wachstum und Zellteilung (Bähler und Nurse, 2001). Gemeinsam mit anderen Proteinen (Tea1p und Tea3p) trägt Pom1p zur Markierung der Zellenden als Orte des Zellwachstums und der Terminierung des Mikrotubulus-Wachstums bei (Niccoli et al., 2003). Zudem ist dieses Protein beim Pheromon-induzierten Übergang vom vegetativen zum *Shmoo*-ähnlichen Wachstum involviert (Niccoli und Nurse, 2002).

1.3.2 DYRK-Kinasen in *C. elegans* und *D. melanogaster*

In Bäcker- und Spaltheife sowie in *Dictyostelium* existiert jeweils nur ein Vertreter der DYRK-Familie von Protein-Kinasen. Im Gegensatz dazu sind in Nematoden, Arthropoden und Vertebraten mehrere Gene für Kinasen der DYRK-Familie vorhanden.

MBK-1 und MBK-2 in *C. elegans*

Im Genom von *C. elegans* wurden zwei Vertreter der DYRK-Familie beschrieben, zudem ist in Nematoden eine Kinase vorhanden, die der nahe verwandten Gruppe der HIPKs (*Homeodomain interacting Protein Kinases*) angehört (Raich et al., 2003). Eine Deletion von MBK-1 verursacht keine sichtbaren Defekte. Die Überexpression dieser Kinase führt jedoch dosis-abhängig zu Verhaltensdefekten bei der Chemotaxis durch die Beeinträchtigung von olfaktorischen Neuronen (Raich et al., 2003). Somit spielt diese Kinase eine ähnliche Rolle wie MNB aus der Fruchtfliege oder DYRK1A in Säugetieren.

Die Kinase MBK-2 ist in *C. elegans* am Übergang vom Ei zum Embryo beteiligt (Pellettieri et al., 2003). Dieser Übergang erfordert den gezielten Abbau von maternalen Proteinen; Transkriptionsprozesse spielen hier keine Rolle. Im Ein-Zell-Embryo ist MBK-2 für die Inaktivierung des maternalen MEI-1/Katanin verantwortlich, das Mikrotubuli in der meiotischen Spindel beeinflusst (Pang et al., 2004; Pellettieri et al., 2003; Quintin et al., 2003), möglicherweise durch direkte Phosphorylierung. Zudem spielt das Protein eine Rolle bei der Vollendung der ersten Zellteilung des Embryos (Pellettieri et al., 2003), da in MBK-2-Mutanten die erste mitotische Spindel nicht korrekt platziert wird (Pang et al., 2004).

Bei der asymmetrischen ersten Zellteilung werden Komponenten der Keimbahn ungleich auf die beiden Tochterzellen verteilt. Dabei entstehen zwei Tochterzellen, die sich sowohl in Größe als auch in ihrem Entwicklungspotential unterscheiden (Saffman und Lasko, 1999). In MBK-2-Mutanten werden unabhängig von der An- oder Abwesenheit von MEI-1 einige cytoplasmatische Komponenten nicht korrekt in der Zelle verteilt (Quintin et al., 2003; Pang et al., 2004). Der Mechanismus, durch den MBK-2 die Lokalisierung anderer Proteine beeinflusst, ist noch völlig unbekannt.

MNB und dDYRK2 in *D. melanogaster*

MNB aus der Fruchtfliege spielt eine Rolle bei Vermehrung und Differenzierung bestimmter neuronaler Zelltypen während der postembryonalen Neurogenese (Tejedor et al., 1995). *Minibrain*-Mutanten zeigen eine verminderte Größe des Gehirns wegen der reduzierten Anzahl von Neuronen. Dieses Protein ist also notwendig für die Vermehrung und/oder Differenzierung von bestimmten neuronalen Zelltypen während der postembryonalen Neuronalentwicklung.

Vor kurzem wurde ein neuer Vertreter der DYRK-Familie in *Drosophila* beschrieben. dDYRK2 ist ein cytosolisches Protein (Lochhead et al., 2003) und mutmaßlich das Produkt des *Smell-impaired* Gens *smi35A*, das bereits bekannt war (Anholt et al., 1996). dDYRK2 zeigt die in den **Abschnitten 1.2** und **1.2.1** beschriebenen Merkmale der DYRK-Familie und ist infolgedessen der zweite Vertreter dieser Gruppe von Protein-Kinasen in der Fruchtfliege. Die Aktivität dieses Enzyms wurde in allen Stadien der Fliegen-Entwicklung detektiert, erhöht war diese während der Embryogenese und der Verpuppung (Lochhead et al., 2003).

1.3.3 Die Kinase DYRK 1A

Das Protein DYRK 1A ist der bestuntersuchte Vertreter der DYRK-Familie, da es mutmaßlich für die geistige Fehlentwicklung beim Down-Syndrom verantwortlich ist (Guimera et al., 1996; Smith et al., 1997; Kentrup et al., 2000; Altafaj et al., 2001). Das menschliche DYRK 1A-Gen befindet sich in der für das Down-Syndrom kritischen Region auf Chromosom 21 (Kentrup et al., 1996; Shindoh et al., 1996; Song et al., 1996). Die homologen Gene aus Ratte, Maus, Haushuhn und Fruchtfliege sind kloniert und charakterisiert worden (Kentrup et al., 1996; Hammerle et al., 2003b; Tejedor et al., 1995). Diese und weitere Studien deuten auf eine regulierende Rolle von DYRK 1A bei der Entwicklung des Gehirns hin (Hammerle et al., 2003a).

Transgene Mäuse mit einer zusätzlichen Kopie des DYRK 1A-Gens in einem 180 kb umfassenden YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) zeigen Lern- und Gedächtnis-Defekte (Smith et al., 1997). Bei der Überexpression der cDNA von DYRK 1A zeigen transgene Mäuse eine verlangsamte neuromotorische Entwicklung sowie kognitive Defekte (Altafaj et al., 2001). Wegen dieser Befunde wurde DYRK1A für neurologische Defekte beim Down Syndrom verantwortlich gemacht.

Homozygote DYRK 1A^{-/-} Mäuse zeigten schwere Entwicklungsdefekte und starben in einem frühen Embryonalstadium. Heterozygote DYRK 1A^{+/-} Mäuse wiesen in bestimmten Gehirn-Regionen eine verringerte Anzahl an Neuronen auf (Fotaki et al., 2002). Dieser Phänotyp ähnelt den *Minibrain*-Mutanten bei *Drosophila*, bei denen das Gen *Mnb* inaktiviert ist (Tejedor et al., 1995). Folglich spielen DYRK 1A, MNB und MBK-1 eine ähnliche Rolle bei regulatorischen Prozessen innerhalb des Gehirns und während der Neuronalentwicklung. Auch im Gehirn von Patienten mit Down-Syndrom ist

DYRK 1A überexprimiert. Die Analyse der Gewebe-Verteilung ergab hier Zelltyp- und Gehirnstruktur-abhängige Muster in Expression und Verteilung von DYRK1A (Wegiel et al., 2004).

Wie der Phänotyp von DYRK 1A auf molekularer Ebene verursacht wird, ist noch immer nicht verstanden (Funakoshi et al., 2003). DYRK1A kann den Transkriptionsfaktor FKHR an Ser329 phosphorylieren. Beide Proteine colokalisieren zudem in *Speckles* im Zellkern (Woods et al., 2001c). In Reporter-Gen-Assays beeinflusst DYRK1A, teils auch ohne Kinase-Aktivität den eine FKHR-Bindungsstelle enthaltenden Promotor des Enzyms Glucose-6-Phosphatase (Groote-Bidlingmaier et al., 2003). Wahrscheinlich kann entweder durch die von bFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) stimulierte Phosphorylierung von CREB in einer neuronalen Zelllinie (Yang et al., 2001) oder durch die Phosphorylierung von Dynamin 1 (Chen-Hwang et al., 2002) der von DYRK1A verursachte Phänotyp erklärt werden. Aber auch für Promotoren mit einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor GLI1 wurde eine Co-Aktivierung durch DYRK1A beschrieben (Mao et al., 2002). Möglicherweise beeinflusst DYRK1A an verschiedenen Promotoren die Transkription durch Wechselwirkung mit dem *Chromatin Remodeling Factor* Arip4 (Sitz et al., 2004). Da jedoch andere Studien auf eine Rolle von DYRK1A beim RNA-*Splicing* hinweisen (Alvarez et al., 2003; De Graaf et al., 2004), kann der beobachtete Effekt eines Co-Aktivators der Transkription auch auf Ebene der RNA-Prozessierung entstehen.

1.3.4 Weitere DYRK-Proteine in Säugetieren

DYRK 1B

Die Aminosäure-Sequenz von DYRK 1B ist innerhalb der katalytischen Domäne zu 85% identisch mit jener von DYRK1A, jedoch zeigen beide Enzyme in ihrem über 500 Aminosäuren großen C-Terminus keinerlei Ähnlichkeit (Leder et al., 1999). Die durch mRNA-*Splicing* erzeugten Isoformen werden gewebsspezifisch exprimiert und zeigen unterschiedlichen katalytische Aktivität (Leder et al., 2003). Die Transkription von DYRK1B wird während der Muskel-Differenzierung durch Rho induziert (Deng et al., 2003). Die Überexpression von DYRK1B in einer Colon-Zelllinie bewirkt einen schnelleren Abbau von Regulatoren des Zellzyklus (Ewton et al., 2003). Hier wird Cyclin D1 durch Thr288-Phosphorylierung destabilisiert (Zou et al., 2004), gleichzeitig wird der CDK-Inhibitor p27^{KIP1} in G0 durch DYRK1B

stabilisiert (Deng et al., 2004). Dadurch wirkt DYRK1B in diesen Zellen anti-apoptotisch (Lee et al., 2000).

DYRK1B ist der erste Vertreter der DYRK-Familie von Protein-Kinasen, für den Regulatoren beschrieben worden sind. Diese Kinase wird durch das MET-Adapter-Protein RanBP-M inhibiert (Zou et al., 2003) und durch p38-MAPK gebunden (Lim et al., 2002b). Durch MKK3 wird die Funktion von DYRK 1B als Co-Aktivator von HNF1alpha stimuliert (Lim et al., 2002a).

DYRK 2, DYRK 3 und DYRK 4

Die Kinasen DYRK 2, DYRK 3 und DYRK 4 wurden gleichzeitig kloniert (Becker et al., 1998). Im Gegensatz zu DYRK 1A und 1B enthalten diese Proteine in ihrer Aminosäure-Sequenz kein klassisches NLS. DYRK 2 und DYRK 3 können neben Histon H3 und MBP auch das Histon H2B *in vitro* phosphorylieren (Becker et al., 1998; Lord et al., 2000). DYRK 2 zeigt eine sehr ähnliche Substratspezifität wie DYRK 1A (siehe **Abschnitt 1.2.2**). DYRK 2 spielt eine Rolle in Adenokarzinomen der Speiseröhre und der Lunge, wo das DYRK 2-Gen amplifiziert und überexprimiert (Miller et al., 2003; Koon et al., 2004). DYRK 3 wird in **Abschnitt 1.5** beschrieben. DYRK 4 ist bisher nicht weiter charakterisiert worden.

1.4 Lokalisierung von DYRK-Proteinen und ERK-Kinasen

Die Lokalisierung eines Proteins ist ein wichtiger Indikator für die Funktion innerhalb der Zelle (Dalbey und von Heijne, 2002). So wurde in den letzten Jahren mit der systematischen Lokalisierung aller Proteine in Hefe begonnen (Huh und et al., 2003; Kumar et al., 2002). Aufgrund der verschiedenen Lokalisierung innerhalb der Zelle können die DYRK-Proteine in zwei Untergruppen eingeteilt werden.

1.4.1 Cytosolische und Kern-lokalisierte DYRKs

Eine Gemeinsamkeit von DYRK 1A und DYRK 1B aus Säugetieren, MBK-1 aus *C. elegans* und MNB aus der Fruchtfliege ist ein mutmaßliches zweiteiliges Kern-Lokalisierungssignal (NLS) innerhalb des N-Terminus dieser Proteine. Zudem zeigen sie auch in der Kinase-Domäne eine stärkere Ähnlichkeit zueinander als zu den verbleibenden DYRK-Proteinen (siehe Stammbaum in **Abb. 1.4**). DYRK 2, 3 und 4 aus Mensch und Maus, *S. pombe* Pom1p, *C. elegans*

MBK-2 und dDYRK 2 aus der Fruchtfliege zeigen ebenfalls zueinander höhere Ähnlichkeit auf Sequenzebene, besitzen aber kein klassisches NLS.

Folglich erscheint eine Einteilung in Kern-lokalisierte und cytosolische DYRKs sinnvoll (Lochhead et al., 2003). In der Tat wurden DYRK1A und 1B in COS-7-Zellen im Zellkern detektiert (Becker et al., 1998; Leder et al., 1999), wohingegen sich DYRK 2, Pom1p, MBK-2 und dDYRK 2 im Cytoplasma befinden (Becker et al., 1998; Bähler und Pringle, 1998; Raich et al., 2003; Lochhead et al., 2003). GFP-Fusionen von DYRK 1A und DYRK 2 in COS-7-Zellen in **Abb. 1.5** machen diesen Unterschied deutlich (nach Becker et al., 1998).

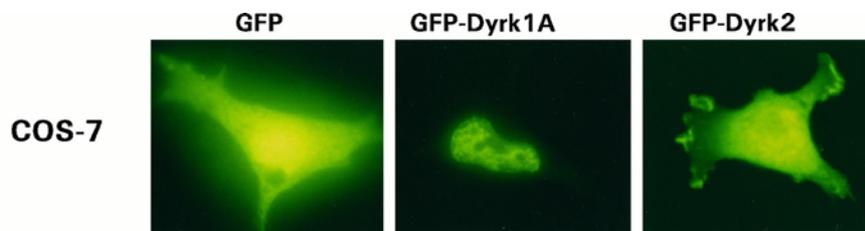


Abb. 1.5: Lokalisierung von DYRK 1A und DYRK 2 fusioniert an GFP (aus Becker et al. 1998).

Zumindest einige der Vertreter in der DYRK-Untergruppe mit zweiteiligem NLS haben auch eine ähnliche Funktion. MBK-1 aus *C. elegans*, MNB aus der Fruchtfliege und DYRK 1A in Säugetieren verursachen allesamt bei Überexpression neuronale Defekte, die jenen beim Down Syndrom ähneln (siehe **Abschnitt 1.3**). Zudem sind sie innerhalb des Zellkerns in diskreten Substrukturen lokalisiert, so genannten *Speckles* (Becker et al., 1998; Raich et al., 2003). Erste Studien weisen bei DYRK 1A auf eine Rolle beim RNA-*Splicing* hin (Alvarez et al., 2003; De Graaf et al., 2004).

Eine Beschreibung der Gruppe von cytosolischen DYRK-Proteinen ist wesentlich schwieriger. Diese Gruppe ist heterogener, der Grad der Sequenz-Ähnlichkeit ist niedriger. Zu dieser Gruppe zählt das für den Wurm essentielle Protein MBK-2 (Pang et al., 2004; Pellettieri et al., 2003; Quintin et al., 2003; Raich et al., 2003) sowie die bei einigen Krebs-Arten amplifizierte und überexprimierte Kinase DYRK 2 (Miller et al., 2003). Über die biologische Funktion weiterer Vertreter dieser Gruppe ist wenig bekannt.

Eine Zuordnung des in dieser Arbeit untersuchten Proteins DYRK 3 (siehe auch **Abschnitt 1.5**) zu einer der beiden Gruppen erweist sich als schwierig. Diese Kinase besitzt in ihrer Aminosäure-Sequenz kein klassisches NLS wie Vertreter der Kern-lokalisierten DYRKs und wurde deshalb bereits in einigen Veröffentlichungen im Cytosol vermutet, ohne dies jedoch experimentell zu bestätigen (Becker et al., 1998; van Es et al., 2001; Campbell und Proud, 2002; Leder et al., 2003). Nur eine einzige Studie beschäftigte sich experimentell mit dieser Fragestellung. Dort wurde DYRK 3 - in jener Arbeit als REDK bezeichnet - überraschenderweise im Kern-Extrakt bestimmter Zelllinien detektiert (Lord et al., 2000). Somit ist die Lokalisierung von DYRK 3 noch nicht abschließend geklärt.

Bisher wurde die Lokalisierung der DYRK-Proteine statisch und unveränderlich dargestellt. Dass aber die Lokalisierung eines Proteins von mehr als nur dem Vorhandensein eines Kern-Lokalisierungssignals abhängig ist, soll am Beispiel der ERK-Proteine veranschaulicht werden. Je nach Aktivierungszustand wandern diese Proteine zwischen Zellkern und Cytosol hin und her.

1.4.2 Die dynamische Lokalisierung der MAP-Kinase ERK2

Die Kinasen der ERK-Familie sind eine Untergruppe der in allen eukaryontischen Zellen vorhandenen MAP-Kinasen (Widmann et al., 1999). Als Antwort auf extrazelluläre Stimuli wandert die MAP-Kinase ERK2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*, auch p42-MAPK) vom Cytoplasma in den Zellkern. Die MAP-Kinase-Kinase MEK1 enthält ein Kern-Exportsignal und verankert ERK2 im Cytoplasma (Fukuda et al., 1997; Furuno et al., 2001). Für die Dissoziation des Komplexes aus ERK2 und MEK1 muss ERK2 in der Aktivierungsschleife phosphoryliert werden (Adachi et al., 1999; Wolf et al., 2001) (siehe auch **Abschnitt 1.2.1**). Die aktivierte ERK2 wird als Homodimer durch aktiven Transport in den Kern transportiert (Adachi et al., 1999; Cobb und Goldsmith, 2000). ERK2 besitzt kein klassisches Kern-Lokalisierungssignal in der Primärsequenz. Es wird vermutet, dass durch die Dimerisierung ein funktionales NLS entsteht. Im Kern wird ERK2 durch Dephosphorylierung inaktiviert und Exportin 1/CRM-1-abhängig wieder ins Cytosol exportiert (Adachi et al., 2000).

Parallel zum aktiven Kern-Transport der aktivierten Kinase ERK2 existiert ein zweiter Mechanismus. Das ERK2-Monomer gelangt durch passiven Transport durch die Kernpore in den Zellkern (Adachi et al., 1999). Dieser

passive Transport ist von einem Sequenz-Motiv zwischen Arg299 und Gln313 innerhalb der ERK2-Kinase-Domäne abhängig (Shibayama et al., 2002). Der Import von ERK2 in den Kern erfordert weder Energie noch Transport-Faktoren wie Importin-alpha und -beta (Whitehurst et al., 2002). Somit gelangt ERK2 durch einen Prozess der erleichterten Diffusion in den Kern. Dieser Import schließt mutmaßlich die direkte Interaktion von ERK2 mit Proteinen aus dem Kernporen-Komplex mit ein.

Weitere Ankerproteine für ERK2 sind die MAPK-Phosphatase MKP3 (Brunet et al., 1999; Farooq et al., 2001), der cytosolische Teil der Tyrosin-Phosphatase PTP-SL (Zuniga et al., 1999) und die Tyrosin-Phosphatase HePTP (Pettiford und Herbst, 2003; Zuniga et al., 1999). Diese Ankerproteine binden ERK2 auf unterschiedliche Weise (Shibayama et al., 2002). Während MKP3 und PTP-SL den C-terminalen Teil der Kinase-Domäne binden, ist die Bindungsstelle für MEK1 im N-Terminus von ERK2 zu finden (Eblen et al., 2001).

Die Lokalisierung von ERK2 wird also von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Verschiedene Proteine können diese Kinase im Cytoplasma verankern. Überdies kann ERK2 durch direkte Interaktion mit Komponenten des Kernporen-Komplexes zwischen Cytosol und Zellkern hin und her wandern. Schließlich wird das Homodimer der aktivierten Kinase ERK2 aktiv in den Kern transportiert, obwohl kein klassisches NLS in der Aminosäure-Sequenz dieser MAP-Kinase vorhanden ist.

1.5 Die Kinase DYRK 3

DYRK 3 (auch *Regulatory ErythroID Kinase*, REDK) ist ein weiterer Vertreter der DYRK-Familie von Protein-Kinasen. DYRK 3 wird vornehmlich in Hoden, fötaler Leber und Knochenmark exprimiert (Becker et al., 1998; Lord et al., 2000). Verschiedene mRNA-Spezies sowie Isoenzyme wurden von DYRK 3 beschrieben (siehe auch **Abschnitt 1.5.3**). Wie DYRK 2 phosphoryliert diese Kinase die Histone H3 und H2b sowie MBP, das basische Myelinprotein.

Das Protein DYRK 3 spielt eine Rolle bei der Regulation der Erythropoiese (Lord et al., 2000; Geiger et al., 2001). Wird die Expression von DYRK 3 in frühen Vorläufern der roten Blutzellen vermindert, so erhöht sich nachfolgend die Anzahl später Vorläufer (CFU-E) der Erythrocyten. DYRK 3

ist also in die Regulation von Wachstum und Entwicklung dieser Zellen eingebunden. Im Folgenden wird der Prozess der Erythropoese beschrieben und anschließend bisher vorhandene Erkenntnisse über DYRK 3 zusammengefasst.

1.5.1 Die Entwicklung von roten Blutzellen

Erythrocyten werden in der fötalen Leber, später im Mark der großen Hohlknochen gebildet und sind für den Sauerstoff-Transport im Blut zuständig (Schiebler, 1996). Da sie jedoch nur eine Lebensdauer von 120 Tagen aufweisen, müssen parallel ständig neue rote Blutzellen gebildet werden. Dieser Entwicklungsprozess, auch als Erythropoese bezeichnet, wird durch verschiedene Cytokine reguliert (Fisher, 2003).

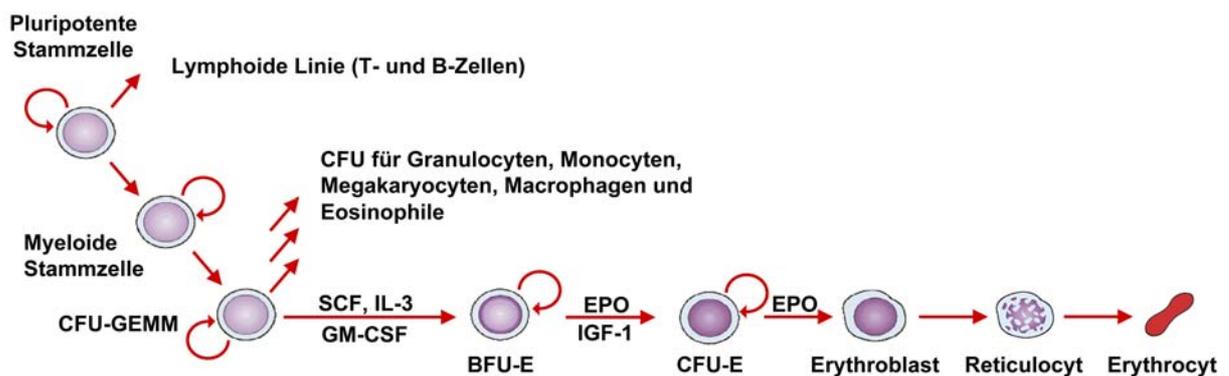


Abb. 1.6: Schema der Erythropoese. Ab dem Stadium der CFU-GEMM sind die Cytokine aufgeführt, die die weitere Entwicklung in der erythroiden Linie bewirken. Erklärungen der Abkürzungen im Text. (Abb. nach Fisher, 2003)

In **Abb. 1.6** ist die Entwicklung von der pluripotenten hämatopoietischen Stammzelle zum reifen Erythrocyt dargestellt. Die Wachstumsfaktoren, die in verschiedenen Stadien der Erythropoese eine Rolle spielen, sind *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF), Interleukin (IL)-6, Stammzell-Faktor (SCF), IL-1, IL-3, IL-4, IL-9, IL-11, GM-CSF, *Insulin Growth Factor-1* (IGF-1) und Erythropoietin (EPO) (Fisher, 2003). SCF, IL-1, IL-3, IL-6 und IL-11 verursachen die Differenzierung der pluripotenten Stammzelle zur *Colony Forming Unit-Granulocyt, Erythroid, Monocyt, Megakaryocyt* (GFU-GEMM) und weiter in die einzelnen Linien. Die CFU-GEMM bildet neben der erythroiden Linie auch CFUs für Vorläufer der Granulozyten, Monozyten, Megakaryocyten, Makrophagen und Eosinophilen. Ab dem Stadium der

CFU-GEMM sind in **Abb. 1.6** die Cytokine dargestellt, die für die weitere Differenzierung zum Erythrozyten verantwortlich sind.

Innerhalb der Erythropoese ist EPO für die terminale Differenzierung der CFU-Erythroid (CFU-E) zum reifen Erythrocyten über die Zwischenstufen des Erythroblasten und des Reticulocyten verantwortlich (Tilbrook und Klinken, 1999). In Kombination mit anderen Cytokinen (SCF, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-9 und IGF-1) bewirkt EPO Proliferation und Reifung vom Stadium der *Burst Forming Unit*-Erythroid (BFU-E) und CFU-E zum Erythroblasten vornehmlich als anti-apoptotischer Faktor (Wojchowski et al., 1999). Nach Stimulation der erythroiden Vorläufer-Zellen mit EPO, SCF und anderen Cytokinen beginnt eine komplizierte Signalübertragung, bei der JAK2/STAT5A/B, PI3-Kinase, aber auch MAP-Kinasen eine Rolle spielen (Wojchowski et al., 1999). Diese führt sowohl auf Transkriptionsebene (Cantor und Orkin, 2002) als auch durch Regulation der Translation von bestimmten mRNAs zu einer Änderung der Gen-Expression und zur Differenzierung zu Erythrocyten.

1.5.2 Die Kinase DYRK 3 spielt eine besondere Rolle in erythroiden Vorläufern

Innerhalb des hämatopoietischen Systems wird DYRK 3 nur in Zellen der erythroiden Linie exprimiert (Lord et al., 2000; Geiger et al., 2001). In Knochenmark-Zellen, die mit EPO und SCF stimuliert werden, ist eine Zunahme der DYRK 3-mRNA zu beobachten (Lord et al., 2000). Wenn die Expression von DYRK 3 durch *Antisense*-Oligonucleotide (Geiger et al., 2001; Lord et al., 2000) gehemmt wird, dann erhöht sich die Zahl der BFU-E, später auch jene der CFU-E. Granulocytische und monocytische Vorläufer (CFU-GM) der Maus zeigten keine Induktion der DYRK 3-Expression und wurden auch nicht in ihrer Entwicklung durch *Antisense*-Oligonucleotide gegen DYRK 3 beeinflusst (Geiger et al., 2001). Dass bereits BFU-E in ihrer Proliferation durch DYRK 3 beeinflusst werden, deutet auf einen Effekt dieser Kinase in einem frühen Stadium der erythroiden Entwicklung hin. Dies scheint sich auch bei Studien mit embryonalen Stammzellen zu bestätigen, bei denen DYRK 3 durch homologe Rekombination ausgeschaltet ist (Roach et al., 2003).

Als Linien-spezifischer Negativ-Regulator der Erythropoese ist DYRK 3 ein viel versprechendes Zielmolekül für niedermolekulare Inhibitoren zur

Behandlung von Anämien, die chronische Krankheiten oder die Chemotherapie gegen Krebs mit sich bringen. DYRK 3-Inhibierung durch *Antisense*-Oligonucleotide führte nicht nur bei normaler, sondern auch bei erniedrigter EPO-Konzentration zur vermehrten Proliferation von erythroiden Vorläufern. Damit könnte DYRK 3 auch ein Zielmolekül für einen niedermolekularen EPO-Agonisten bzw. EPO-Modulatoren sein.

Wie DYRK 3 allerdings auf molekularer Ebene wirkt, ist noch nicht geklärt. Eine erste Studie deutet auf die Stimulation von CREB-abhängiger Gen-Expression durch DYRK 3 hin, jedoch ohne das *cAMP Response Element Binding Protein* (CREB) direkt zu phosphorylieren (Li et al., 2002). Darüber hinaus scheint diese Kinase auch außerhalb der erythroiden Linie eine Rolle zu spielen. So setzt die in Testes beschriebene Expression von DYRK 3 erst mit Beginn der Spermatogenese ein. Eventuell spielt DYRK 3 hier eine mit MBK-2 (**Abschnitt 1.3.2**) vergleichbare Rolle bei der Spermatogenese (Kleene, 2001). Zudem erfolgte die Klonierung einzelner Isoformen ebenfalls aus nicht-erythroiden Geweben. Ob die einzelnen Isoformen von DYRK 3 unterschiedliche Funktionen haben, ist ebenso ungeklärt.

1.5.3 Die Isoformen von DYRK 3 unterscheiden sich in den ersten Aminosäuren des N-Terminus

Nach der ersten Beschreibung einer cDNA für DYRK 3 (Becker et al., 1998) wurde in darauf folgenden Studien eine sehr ähnliche cDNA kloniert (Lord et al., 2000). Diese codiert jedoch durch die Insertion einer einzigen weiteren Base ein um 35 Aminosäuren längeres Protein (DYRK 3-L). Lord et al. detektierten zudem eine durch mRNA-*Splicing* entstandene Isoform, die sich von DYRK 3-L in den ersten Aminosäuren unterscheidet. Die unterschiedlichen N-terminalen Aminosäuren der DYRK 3-Isoformen sind in **Abb. 1.7** dargestellt. Ein polyklonaler Antikörper, der gegen die ersten 16 Aminosäuren von DYRK 3-L gerichtet ist (unterstrichen in **Abb. 1.7**), erkennt

	1	10	20	30	40	50
DYRK 3-L	<u>MG</u> TARGPGRK	DAGPPG	AGLPPQ	RR^L	GDGVYD	TFMMIDETKCPPCSNVL
DYRK 3-S			MK	WKEK^L	GDGVYD	TFMMIDETKCPPCSNVL
DYRK 3					MM	IDETKCPPCSNVL

Abb. 1.7: Die Isoformen der humanen DYRK 3 unterscheiden sich nur innerhalb der ersten N-terminalen Aminosäuren. ^ markiert eine Exon-Grenze in DYRK 3-L und DYRK 3-S.

in HeLa-Zellextrakten eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 70 kDa (Abgent.com). Folglich wird DYRK 3-L vom ersten Start-Codon aus translatiert. In der vorliegenden Arbeit wurde DYRK 3 in Säugetier-Zellen immer mit den N-terminalen Aminosäuren der Isoformen L und S verwendet.

1.5.4 Die Domänen von DYRK 3

Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenz der humanen DYRK-Proteine DYRK 1A und DYRK 2 mit der DYRK 3-Sequenz zeigt, dass sich die einzelnen DYRK-Proteine hauptsächlich in der Kinase-Domäne und der DH-Box ähneln (**Abb. 1.8**). Innerhalb der Kinase-Domäne besitzen DYRK 2 und DYRK 3 79,0% identische (bzw. 91,1% ähnliche) Aminosäuren. Der Anteil an identischen bzw. ähnlichen Aminosäuren ist zu DYRK 1A mit 42,4% (66,6%) weit geringer, was jedoch bereits vom Stammbaum der DYRK-Proteine zu erwarten war (vergleiche **Abb. 1.4**). Innerhalb der DH-Box sind nur die in **Abb. 3.20** markierten Reste zwischen DYRK 3 und DYRK 1A erhalten,

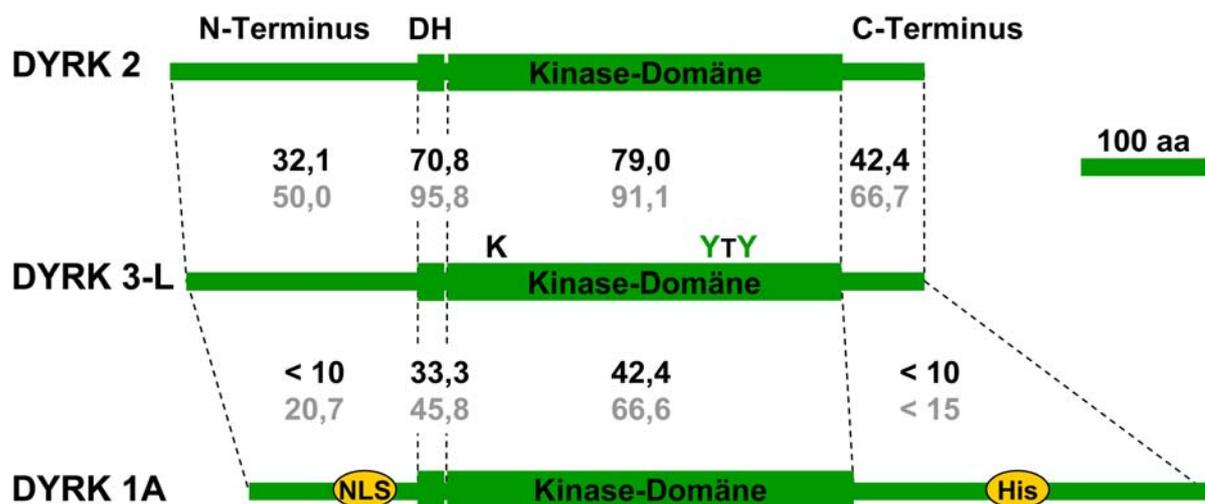


Abb. 1.8: Sequenzvergleich der humanen DYRK-Proteine DYRK 2 und DYRK 1A mit DYRK 3. Angaben sind Identität und Ähnlichkeit (grau) laut ClustalW, bezogen auf DYRK 3 in %. Domänen-Grenzen aus SMART und nach Becker et al. (1998) waren bei DYRK 2 Met1-Gly197, Pro198-Arg221, Tyr222-Ile535, Arg536-Ser601; bei DYRK 3-L Met1-Gly184, Pro185-Arg208, Tyr209-Ile522, Ser523-Ser588; bei DYRK 1A Met1-Lys134, Val135-Arg158, Tyr159-Phe479, Lys480-Ser763. Bei DYRK 1A ist zudem das Kern-Lokalisierungssignal (NLS) im N-Terminus sowie 13 aufeinander folgende His-Reste (His607-His619) markiert. DH, DYRK Homology Box; K, konserviertes Lysin; YTY, Aktivierungsschleife von DYRK 3.

deshalb ist dort ein überraschend geringer Anteil an identischen Aminosäuren zu finden. Die hohe Übereinstimmung der Kinase-Domäne auf Ebene der Aminosäure-Sequenz spiegelt sich auch in der ähnlichen Spezifität gegenüber der Primärsequenz von Substrat-Peptiden wieder (**Abschnitt 1.2.2**).

Bei Co-Transfektion mit einem Reporter-Gen, das ein *cAMP Response Element* (CRE) 5' zum Luciferase-Gen enthält, stimuliert DYRK 3 die CREB-abhängige Transkription (Li et al., 2002). Zur Stimulation des CRE-Luciferase-Reporters ist zudem nicht nur eine katalytisch inaktive Mutante von DYRK 3, sondern auch einzig der 65 Aminosäuren umfassende C-Terminus in der Lage. Obwohl dieser Teil von DYRK 3 keine für AKAPs typische amphipathische Helix aufweist (Colledge und Scott, 1999; Feliciello et al., 2001), könnte er die Transkription des CRE-Luciferase-Reporter-Gens analog einem *A-Kinase Anchor Protein* (AKAP) beeinflussen.

Der ausgedehnte N-Terminus von DYRK 3 (184 Aminosäuren bei DYRK 3-L) enthält bloß 32,1% identische Aminosäuren im Vergleich zu DYRK 2; die Ähnlichkeit zu DYRK 1A ist in diesem Bereich nur noch marginal. Laut Li et al. (2002) soll die Kinase-Domäne nach Deletion des N-Terminus nicht merklich in ihrer katalytischen Aktivität beeinflusst werden, dies wurde jedoch nicht anhand von Daten belegt. Eine BLAST-Suche nach homologen Proteinen oder Einträgen in der Domänen-Datenbank SMART lieferte keine Hinweise auf die Funktion dieses Teils von DYRK 3. Somit ist der N-Terminus von DYRK 3 ein Protein-Fragment ohne bekannte Funktion.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Als Inhibitor der Entwicklung von roten Blutzellen ist die Kinase DYRK 3 ein mögliches Zielmolekül für einen Agonisten des Erythropoietins. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Wirkungsweise von DYRK 3 auf molekularer Ebene untersucht werden.

Innerhalb der stark kompartimentierten eukaryontischen Zelle ist die Lokalisierung eines Proteins von entscheidender Wichtigkeit für dessen Funktion. Über die subzelluläre Lokalisierung von DYRK 3 jedoch existieren in der Literatur bisher nur widersprüchliche Angaben. Darum sollte die Lokalisierung des Proteins in zellulären Studien untersucht werden. Die Analyse von ektoisch exprimiertem DYRK 3-Protein sollte zudem auch ermöglichen, den Einfluss der einzelnen Domänen auf die Lokalisierung von DYRK 3 zu bestimmen.

Weder Substrate noch Regulatoren der DYRK 3-Kinase sind bislang beschrieben worden. Da diese aber essentiell für das Verständnis von DYRK 3 sind, sollten mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid* Systems neue Wechselwirkungspartner gefunden werden. Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion sollte der Beitrag der einzelnen Domänen von DYRK 3 näher untersucht werden.

Vorangegangene Studien charakterisierten die Kinase-Domäne sowie den C-terminalen Bereich von DYRK 3. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuteten aber auf eine funktionale Rolle des N-Terminus hin. Dementsprechend sollte dieser bisher gänzlich vernachlässigte Bereich des DYRK 3-Proteins biophysikalisch untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien im Reinheitsgrad „zur Analyse“ von den Firmen Merck Eurolab (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis (Heidelberg) sowie Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma NEB (Frankfurt am Main) wurden verwendet. DNA-Fragmente wurden in der PCR entweder durch *Taq*-DNA-Polymerase (5 Einheiten/ μ l) von Diagonal (Münster) oder *Cloned Pfu*-DNA-Polymerase (2,5 Einheiten/ μ l) von Stratagene (Amsterdam, NL) amplifiziert. T4-DNA-Ligase (400 U/ μ l) sowie alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) stammten von NEB (Frankfurt am Main). Die verwendeten Antikörper sind in **Tab. 2.1** aufgelistet.

Als Größenstandards für die SDS-PAGE wurden Mark12, SeeBlue®-Plus2 sowie MagicMark von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Größen von DNA-Fragmenten wurden im Agarose-Gel durch Vergleich mit der 100 bp- bzw. 1 kb-DNA-Leiter (NEB, Frankfurt am Main) abgeschätzt.

In doppelsträngige DNA wurden Punktmutationen mit Hilfe des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (Amsterdam, NL) eingeführt. Aus *E. coli* wurde Plasmid-DNA mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit oder dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit isoliert (Qiagen, Hilden). Aus Gelen wurde DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits isoliert (Qiagen, Hilden). Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit dem BigDye™ Terminator Kit von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Bei Bedarf wurden PCR-Produkte mit Hilfe des TOPO-TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) subkloniert. Zur *in vitro*-Expression von Proteinen wurde das TNT-System der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Säugetier-Zellen wurden auf die Aktivität der β -Galactosidase mit dem β -Gal Staining Kit (Invitrogen, Karlsruhe) getestet.

Tab. 2.1: Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Antikörper (Ab)	Epitop, Verwendung, Hersteller
anti-FLAG	monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop (DYKDDDDK), 1:500 bis 1:1500 für Immunfärbung, 1:200 bis 1:500 für <i>Western Blot</i> , Stratagene (Amsterdam, NL)
anti-GFP	monoklonaler Antikörper JL-8 aus Maus gegen einen Teil des GFPs, 1:1000 für <i>Western Blot</i> , BD Clontech (Heidelberg)
anti-His6	aus Maus, Dianova (Hamburg)
anti-DYRK 3-L-ND ₁₋₁₆	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die ersten 16 Aminosäuren der humanen DYRK 3-L (MGGTARGPGRKDAGPP), 1 : 100 bis 1 : 500 für <i>Western Blot</i> und Immunfluoreszenz, Abgent Europe (Basel, Schweiz)
anti-HA	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das Epitop YPYDVPDYA des Hämagglutinins
anti-cMyc (9E10)	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen EEQKLISEEDL des humanen cMyc-Proteins, 1:100 bis 1:200 für <i>Western Blot</i> , sowohl von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) als auch von BD Clontech (Heidelberg)
anti-Maus	polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG, HRP-konjugiert, sekundärer Antikörper für <i>Western Blot</i> (1 : 1000), Amersham Bioscience (Freiburg)
anti-Maus	polyklonaler Antikörper aus Esel gegen Maus-IgG, Cy3-konjugiert, sekundärer Antikörper für Immunfluoreszenz (1 : 200), Dianova (Hamburg)
anti-Kaninchen	polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert, sekundärer Antikörper für <i>Western Blot</i> (1 : 1000), Amersham Bioscience (Freiburg)
anti-Kaninchen	polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG, Cy5-konjugiert, sekundärer Antikörper für Immunfluoreszenz (1 : 200), Dianova (Hamburg)

HRP, Meerrettich-Peroxidase.

2.1.2 Molekularbiologische Materialien

Die codierende Sequenz der untersuchten Proteine wurde den in **Tab. 8.1** aufgeführten cDNAs entnommen. Vektoren sind in **Tab. 8.2** zu finden. Die in dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Plasmide sind in den **Tabellen 8.3 bis 8.5** des Anhangs aufgelistet. Oligonucleotid-Synthesen wurden bei Firma MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Die Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide ist in den **Tabellen 8.6 und 8.7** des Anhangs wiedergegeben. Die für Klonierzwecke sowie für Protein-Expression verwendeten Stämme von *E. coli* sind in den **Tabellen 8.8 und 8.9** genannt.

2.1.3 Puffer, Gele und Lösungen

Agarose-Gel: 0,8 bis 1,5% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid

Cracking-Puffer (Hefe): 8 M Harnstoff, 5% (w/v) SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 0,4 mg/ml Bromphenolblau, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol, 12 mg/ml Complete™, 1 mM PMSF, 1 mM NaF

DNA-Probenpuffer (6 x): 40% (w/v) Saccharose, 0,25% Bromphenolblau oder 0,5% Orange G (bei Fragmenten kleiner als 1 kb)

PBG: 0,2% Gelatine (Sigma) bei 50 °C in PBS lösen und abkühlen lassen, anschließend 0,5% BSA-Fraktion V dazugeben; Lagerung bei -20 °C

PBS: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄, 0,2 g/l KH₂PO₄, pH 7,4

PEG/LiAc: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 M Lithium-Acetat (LiAc), 40% PEG 4000

Ponceau S-Lösung: 0,2 - 2% in 3% TCA

SDS-PAGE-Laufpuffer (10 x): 250 mM Tris-HCl pH 8,3, 1% (w/v) SDS, 1,87 M Glycerin

SDS-PAGE-Sammelgel (6%): 1 ml Rotiphorese (30%, v/v), 1,25 ml Sammelgelpuffer, 2,75 ml H₂O, 20 µl TEMED, 20 µl 10% (w/v) APS

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer (4 x): 500 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS

SDS-PAGE-Trenngel (10%): 5 ml Rotiphorese (30%, v/v), 3,8 ml SDS-PAGE-Trenngelpuffer, 6,2 ml H₂O, 120 µl TEMED, 120 µl 10% (w/v) APS

SDS-PAGE-Trenngelpuffer (4 x): 3 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS

SDS-Proteinprobenpuffer (2 x): 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin, mit oder ohne 100 mM DTT

Proteinprobenpuffer für Schaeffer-Gele (5 x): 0,6 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 3,2 ml 80% Glycerin, 2 ml 10% SDS, 0,5 ml β-Mercaptoethanol, 0,25% Bromphenolblau (w/v), bis 10 ml H₂O

Schaegger-Trenngel (15%): 5,7 ml Rotiphorese (40%, v/v), 3,8 ml SDS-PAGE-Trenngelpuffer, 5,5 ml H₂O, 120 µl TEMED, 120 µl 10% (w/v) APS

Schaegger-Sammelgel (6%): 1 ml Rotiphorese (30%, v/v), 1,25 ml SDS-PAGE-Trenngelpuffer (!), 2,75 ml H₂O, 20 µl TEMED, 20 µl 10% (w/v) APS

Schaegger-Anoden-Puffer (10 x): 1 M Tris-HCl, pH 8,9

Schaegger-Kathoden-Puffer (10 x): 1 M Tris-HCl, 1 M Tricine, 1% SDS, pH 8,25

Spurenelement-Lösung 10 x SL4: 500 mg EDTA, 200 mg Fe(II)SO₄ x 7 H₂O, auf 90 ml mit bidest. H₂O auffüllen; jeweils frisch ansetzen, da Fe(II) zu Fe(III) oxidiert

Spurenelement-Lösung SL6: 100 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, 30 mg MnCl₂, 300 mg H₃BO₃, 200 mg CoCl₂ x 6 H₂O, 10 mg CuCl₂ x 2 H₂O, 20 mg NiCl₂ x 6 H₂O, 30 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O, auf 1000 ml mit bidest. H₂O auffüllen, steril filtrieren und bei 4 °C lagern

Stammlösungen für Antibiotika und IPTG: 100 mg/ml Ampicillin, 50 mg/ml Kanamycin, 25 mg/ml Zeocin™, 1 M IPTG; Gebrauch jeweils 1 : 1000

TAE-Puffer (50 x): 2 M Tris-HCl, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8,5

TBE-Puffer (10 x): 890 mM Tris-HCl, 890 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3

TBS-T: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1% Tween 20

TE/LiAc: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M Lithium-Acetat

TE: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

Transferpuffer für Western Blot: 20 mM Tris-HCl, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,05% SDS, pH 8,3

2.1.4 Nährmedien

Die Nährmedien wurden, falls erforderlich, 20 min bei 121 °C und 30 bar autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porendurchmesser) und dem abgekühlten Medium zugesetzt. Für Agarplatten wurden die Medien mit 1,5% Agar versetzt.

2xYT: 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l H₂O, pH 7,0

LB-Medium: 10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, mit NaOH pH 7,0 einstellen

M9-Minimal-Medium, Angaben für 1 L: 7.5 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 0.25 g MgSO₄, 0.014 g CaCl₂, autoklavieren, für die Expression komplettieren mit 10 g Glucose (außer bei Markierung mit ¹³C), 100 mg/l Ampicillin (bzw. 50 mg/l Kanamycin), 0,7 bis 1,2 g ¹⁵NH₄Cl, 0,9 ml 10 x SL4, 1 ml SL6

SD-Medium: 0,67% Stickstoff-Base Bacto-Hefe, pH 5,8, 2% Glucose; entsprechend den Selektionsbedingungen supplementiert mit: 20 mg/l Adenin, 20 mg/l Arginin, 20 mg/l Histidin, 30 mg/l Isoleucin, 100 mg/l Leucin, 30 mg/l Lysin, 20 mg/l Methionin, 50 mg/l Phenylalanin, 200 mg/l Threonin, 20 mg/l Tryptophan, 30 mg/l Tyrosin, 20 mg/l Uracil, 150 mg/l Valin

SOC-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 3,6 g Glucose, ad 1 l H₂O, pH 7,0

YPD(A)-Medium: 1% (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, 2% (w/v) Glucose, (30 mg/l Adenin), HCl ad pH 5,8

2.2 Methoden der Molekularbiologie

2.2.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Elektro-Transformation erfolgte bei kommerziellen Zellen nach den Angaben des Herstellers. Die verwendeten Stämme von *E. coli* sind in **Tab. 8.8** und **8.9** aufgeführt. Diese wurden in sterilen 1 mm Küvetten an einem Gene Pulser Elektroporator (Bio-Rad, München) bei 1,8 kV, 800 Ω, und 25 μF mit 1 bis 5 μl DNA-Lösung transformiert.

Chemisch kompetente Zellen wurden wie folgt zubereitet. Eine Suspensionskultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes (LB Medium, 50 ml, 37 °C) wurde in der logarithmischen Wachstumsphase pelletiert (3000 x g, 5 bis 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in einem halben Volumen steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) wurde in 1/10 Volumen steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin aufgenommen, aliquotiert (je 100 μl).

Nach dem Einfrieren in flüssigem N₂ erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Die chemische Transformation dieser Zellen erfolgte nach Maniatis (Sambrook und Russel, 2001).

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit verschiedenen *Kits* der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und der anschließenden Stufen-Elution von Anionenaustausch-Säulen aus einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterien-Klons. Für Sequenzierung oder Transformation von *E. coli* und Hefe wurden Vektoren und klonierte Konstrukte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit gereinigt. Zur Transfektion von Säugetier-Zellen wurde ausschließlich mit dem *Endofree Plasmid Maxi Kit* gereinigte Plasmid-DNA verwendet um die Transfektionseffizienz durch bakterielle Endotoxine nicht zu beeinträchtigen.

2.2.3 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Zur Spaltung von DNA wurden ausschließlich Restriktionsendonucleasen der Firma NEB (Frankfurt am Main) in den mitgelieferten Puffern verwendet. Zwischen 2,5 und 20 Einheiten Enzym wurden eingesetzt, um 0,1 bis 1 µg DNA zu verdauen. Dabei betrug das Volumen der zugegebenen Enzym-Stammlösung maximal 10% des Reaktionsvolumens, um Sternaktivität der Enzyme durch mehr als 5% Glycerin nicht zu begünstigen. Zu jedem Ansatz wurde BSA gegeben, bei Inkubationen mit zwei Enzymen wurden die Puffer-Empfehlungen von NEB für Doppelverdau befolgt. Plasmid-DNA wurde in der Regel 1 h bei 37 °C inkubiert, bei PCR-Produkten erfolgte die Inkubation über Nacht. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug bei Kontrollverdau 15 µl und bei Reaktionsansätzen für präparative Zwecke 30 bis 50 µl. Um die Wahrscheinlichkeit einer Religation zu senken, wurde geschnittene Vektor-DNA gegebenenfalls nach Zugabe von 10 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) bei 37 °C für 1 h dephosphoryliert. Je nach Verwendung wurde der Restriktionsansatz entweder durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert oder durch Enzym-Entfernung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt.

2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt am Main) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der 20 µl

Ligationsansatz enthielt Vektor und Insert im Verhältnis 1 : 3, 200 U Enzym in 1 x Reaktionspuffer. Optional wurde der Ansatz zusätzlich mit 1 mM ATP (pH 7) versetzt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 16 °C über Nacht oder für 72 h bei 4 °C. Parallel zu jeder Ligation wurde eine Religationskontrolle ohne Insert angesetzt. Zwischen 2 und 10 µl dieses Ansatzes wurde für die Transformation von *E. coli* nach **2.2.1** verwendet.

Bei PCR-Produkten, die nur in sehr geringen Mengen entstanden oder wegen eines zu kurzen Überhangs nicht richtig geschnitten wurden, erfolgte nach dem Anhängen eines zusätzlichen Adenosins an den 3'-Enden die Klonierung in den durch Topoisomerase I aktivierten Vektor pCR2.1 (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Nach Sequenzierung dieses Konstruktes wurde das Insert aus pCR2.1 ausgeschnitten und in den gewünschten Vektor umklontiert.

2.2.5 Reinigung, Analyse und Sequenzierung von DNA

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Restriktionsansätzen oder PCRs und zur Reinigung von DNA wurde der Reaktionsansatz in einer horizontalen DNA Sub-Cell™ Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad, München) aufgetrennt (Sambrook und Russel, 2001). Nach Versetzen der Probe mit DNA-Probenpuffer erfolgte die Trennung von DNA-Fragmenten in 0,8 bis 1,5%igen Agarose-Gelen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer (50 x TAE: 2 M Tris (Base), 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8,5) bei einer Spannung zwischen 80 und 120 V für 30 bis 60 min. Die Auswertung des Gels erfolgte an einem Gel Doc 1000 System (Bio-Rad, München).

Elution von DNA aus Agarose-Gelen und Konzentrationsbestimmung

Bei einem präparativen Ansatz wurde eine DNA-Bande der gewünschten Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten. Daraus wurde die DNA mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eluiert. Schließlich wurde die DNA in 30 µl 1 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst.

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) an einem GeneQuant-Photometer (Amersham Bioscience) bestimmt. Eine A_{260} von 1,0 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook und Russel, 2001). Nur DNA-Präparationen mit einem Verhältnis A_{260}/A_{280} zwischen 1,6 und 2,0 wurden weiter verwendet.

DNA-Sequenzierung und Ethanol-fällung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs nach dem Einbau von Didesoxyribonucleotiden (Sanger et al., 1977) mit dem BigDye™ Terminator Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 4 µl Sequenzier-Mix wurden mit 300 nmol Plasmid-DNA und 5 pmol Primer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl versetzt. Dieser Ansatz wurde folgendem PCR-Programm unterworfen: 94 °C 1 min, (94 °C 15 sec, T_A 30 sec, 60 °C 4 min)₂₅, Pause bei 4 °C. Die Anlagerungstemperatur T_A richtete sich dabei nach der Schmelztemperatur des verwendeten Primers.

Die Reaktionsprodukte wurden nach Zugabe von 2 µl 125 mM EDTA (pH 8,0) und 2 µl frischem 3 M Na-Acetat (pH 4,6) mit 50 µl absolutem Ethanol gefällt (ca. 70% Endkonzentration). Nach einer Inkubation bei 25 °C für 15 min wurde der Ansatz bei >12000 x g und 4 °C für mindestens 10 min pelletiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet einmal mit 70% EtOH gewaschen. Auftrennung und Analyse des luftgetrockneten Sequenzier-Ansatzes erfolgte an einem 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, San Jose, CA, USA). Gegebenenfalls erfolgte eine DNA-Sequenzierung auch extern bei MWG Biotech (Ebersberg).

2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.1 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte nach Mullis (Mullis und Faloona, 1987) in 500 µl-PCR-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) in einem T3 Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen). Zur Einführung von Schnittstellen wurden Primer mit Erkennungssequenz des gewünschten Restriktionsenzym und 5'-Überhang verwendet. PCR-Fragmente für spätere Klonierung wurden nur mit Polymerasen mit *Proof Reading*-Aktivität erzeugt. Zu 1 x Reaktionspuffer wurden zwischen 0,1 und 1 µg DNA-Matrix, je 25 pmol der beiden Primer, 50 bis 100 pmol jedes dNTPs sowie 1 bis 2,5 Einheiten *Cloned Pfu* (Stratagene, Amsterdam, NL) gegeben. Bei Bedarf wurde die Magnesium-Konzentration zwischen 1 und 4 mM variiert. Das Gesamt-Volumen betrug 50 µl. Dieser Ansatz wurde folgendem PCR-Programm unterworfen: 94 °C 1 min, (94 °C 45 sec, T_A 45 sec, 72 °C t_E)₂₅, Pause bei 4 °C. Die Anlagerungstemperatur T_A wurde je nach Schmelztemperatur des Primers zwischen 45 und 65 °C variiert, bei suboptimaler Anlagerung der

Primer wurden dem Programm drei Zyklen mit niedrigerer Anlagerungstemperatur vorgeschaltet. Die Dauer der Elongation (t_E) richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Dabei wurde für die *Pfu*-DNA-Polymerase eine Synthese-Geschwindigkeit von 1 kb/min angenommen. Die Produkte einer PCR wurden in jedem Fall durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Analytische PCRs zur Kontrolle auf Vorhandensein eines Inserts sind in **Abschnitt 2.5.3** beschrieben. Wenn zur Klonierung verwendete Schnittstellen auch in der Sequenz des Inserts vorhanden waren, wurden diese nach **2.3.2** oder **2.3.4** entfernt. Alternativ dazu wurden zwei parallele PCRs durchgeführt, deren PCR-Produkte nach Denaturierung und erneuter Anlagerung direkt DNA-Fragmente mit überhängenden Enden lieferten (Zeng, 1998).

2.3.2 Zielgerichtete Mutagenese mit *Dpn* I-Selektion (QuickChange)

Zur Einführung von Punktmutationen in doppelsträngige DNA wurde das QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, NL) verwendet. Die Primer mit der gewünschten Mutation enthielten auf der 3'-Seite der Mutation mindestens 15 nt, auf 5'-Seite genügten 12 nt. Sowohl die Mutagenese-PCR als auch der Verdau der parentalen DNA mit *Dpn* I erfolgten nach den Angaben des Herstellers. 2 bis 5 μ l des Ansatzes wurden für die Transformation von *E. coli* XL10 Gold verwendet. Gewöhnlich wurde die Plasmid-DNA von drei bis fünf Klonen durch DNA-Sequenzierung auf das Vorhandensein der Mutation hin überprüft.

2.3.3 PCR-Mutagenese mit Megaprimer

Auch durch zwei aufeinander folgende PCRs wurden Mutationen zielgerichtet in doppelsträngige DNA eingeführt. Diese Technik wurde bei Inserts angewandt, die ohnehin durch PCR subkloniert werden sollten. Hierfür wurde ein interner Primer entworfen, der die Mutation und sowohl 5' als auch 3' zur Mutation mindestens 12 weitere Basen enthielt. Mit diesem und dem entgegen gerichteten Außenprimer wurde in einer ersten PCR ein Megaprimer mit der gewünschten Mutation erzeugt. Nach Gel-Reinigung wurde dieser zusammen mit dem zweiten äußeren Primer in einer weiteren PCR verwendet, um das gesamte Fragment einschließlich Mutation zu amplifizieren. Anschließend erfolgte die Klonierung des PCR-Produkts wie in **Abschnitt 2.2** beschrieben. Mit dieser Methode ist es überdies möglich, Sequenzen von verschiedenen Matrizen zu fusionieren.

2.4 Zellbiologie, Transfektion und Mikroskopie

2.4.1 Zellkultur verschiedener Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien und entsprechenden Kulturbedingungen sind in **Tab. 2.2** aufgeführt. Nach Erreichen von 70 bis 80%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

Tab. 2.2: Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Name	Beschreibung; Medium (Herkunft)
COS-7	Nieren-Zelllinie aus <i>Cercopithecus aethiops</i> , transformiert durch einen replikationsdefizienten SV-40; Medium: Dulbecco's MEM + 10% FBS, 1% L-Glutamin, 37 °C, 5% CO ₂ (ECACC)
Flp-In™ CHO	stabil mit pOG44 transfizierte CHO-K1-Zelllinie aus dem Ovar des chinesischen Hamsters; Medium: Ham's F12 Medium (PAN Biotech, Aldenbach), 10% FBS, 2 mM L-Glutamin, Selektion des Wildtyps: 100 µg/ml Zeocin™, Selektion nach der Transfektion: 600 µg/ml Hygromycin, 37 °C, 5% CO ₂ (Invitrogen, Karlsruhe)
HEK-293	Zelllinie von humaner embryonaler Niere, transformiert durch Adenovirus Typ 5; Medium: Eagle's MEM, 10% FBS, 1% Aminosäure-Mix, 37 °C, 5% CO ₂ (ATCC)
HEP-G2	Karzinom aus humaner Leber; RPMI 1640 + 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 37 °C, 5% CO ₂ (Tumorbank, DKFZ Heidelberg)
LLC-PK1	Nierenepithel aus <i>Sus scrofa</i> ; DMEM + 5% FBS, 1% L-Glutamin, 1% Aminosäure-Mix, 1% Natrium-Pyruvat, 0.1% β-Mercaptoethanol
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie; Medium: RPMI 1640 + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, 37 °C, 5% CO ₂ (DSMZ)

ATCC, American Tissue Culture Collection, USA
 DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig
 ECACC, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK

2.4.2 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA

1×10^5 bis 3×10^5 Zellen wurden auf sterile Glasplättchen ausgebracht, die in 6- oder 12-Loch-Platten (Falcon) mit Poly-L-Lysin beschichtet waren (10 min bei RT, 0,1% Poly-L-Lysin, Sigma). Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit der gewünschten Plasmid-DNA nach der Lipofectamin-Methode transfiziert. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Bearbeitung weitere 20 bis 53 h inkubiert. Die Transfektionseffizienz wurde durch parallele Transfektion von *lacZ* bestimmt. Da bei Testtransfektionen kein Unterschied in der Transfektionseffizienz bei Verwendung von mit *Apa* L1 linearisierter oder ungeschnittener Plasmid-DNA feststellbar war,

wurden die Zellen in weiteren Versuchen immer mit circulärer Plasmid-DNA transfiziert.

Für die Transfektion von COS-7, LLC-PK1 und CHO-Zellen wurde SuperFect (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für HEP-G2 und HEK293 wurde dieses Protokoll nach Optimierungsversuchen abgeändert. Hier wurde das Transfektionsreagenz bei gleich bleibender DNA-Menge um 50 bis 60% reduziert. Mit Effectene (Qiagen, Hilden) wurden bei HEK-293 keine zufrieden stellenden Resultate erzielt.

2.4.3 Färbung und Einbettung der Zellen

Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden mit FLAG-DYRK 3-L transfizierte HEK-293-Zellen 10 min in 3% para-Formaldehyd in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Anfärbung von FLAG-DYRK 3-L durch Inkubation mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (1 : 1000 bis 1 : 1500 in PBG). Dieser wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS mit einem Cy3-konjugierten Antikörper gegen Maus-IgG detektiert (1 : 200 in PBG). Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Färbung der DNA mit DAPI (0,025 µg/ml Gebrauchslösung; Molecular Probes, Leiden, NL) für 5 min. Zwei weiteren Waschschritten mit PBS folgte das Einbetten in Gel/Mount™ (Biomedex, Foster City, CA, USA) sowie das Trocknen bei 4 °C über Nacht. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur und möglichst unter Ausschluss von hellem Licht durchgeführt. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Flp-In™-CHO-Zellen mit stabil integriertem Transgen wurden nach dem gleichen Protokoll angefärbt. Alternativ wurde hier auch ein Antikörper gegen die ersten 16 N-terminalen Aminosäuren der humanen DYRK 3-L verwendet (1 : 100 in PBG). In diesem Fall war der Sekundär-Antikörper ein Cy5-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper (1 : 200 in PBG). Alle verwendeten Antikörper sind in **Tabelle 2.1** aufgeführt.

Die mit fluoreszierenden Proteinen transfizierten Zellen wurden nach dem Fixieren in 3% para-Formaldehyd (in PBS) dreimal mit PBS gewaschen, dann mit DAPI gefärbt, erneut zweimal mit PBS gewaschen und direkt in Gel/Mount eingebettet.

2.4.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Aufnahme der Epi-Fluoreszenz-Bilder erfolgte an einem AxioPhot-Mikroskop mit AxioCam-Farbkamera und Axio-Vision 2-Software (Zeiss Jena) oder an einem Leica DM IRB Mikroskop mit hochauflösender Schwarz-Weiß-Digitalkamera Spot Insight QE Model 4.1 (Visitron Systems/Diagnostic Instruments USA) und Software MetaVue Version 6.1r6 (Universal Imaging), jeweils mit Plan-Neofluar-Objektiv (63 x/1,25 in Öl). Unmittelbar nach der Aufnahme erfolgte bei letzterem System innerhalb der MetaVue-Software die Konvertierung der an diesem System erzeugten 12-Bit-Bilder in 8-Bit-Grafiken, damit die Bilder von beiden Mikroskopen auf die gleiche Weise ausgewertet werden konnten.

Tab. 2.3: Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore

Name	Anregung [nm]	Emission [nm]
EGFP*	488, 498	507, 516
ECFP	436	474
EYFP	513, 520	527, 532
DsRed2**	558	583
DAPI	359	461
Cy3™ (anti-Maus)	514/552-554	566/570
Cy5™ (anti-Kaninchen)	649	666-670

* GFP-Molekül mit den Mutationen F64L und S65T für verbesserte Fluoreszenz-Eigenschaften (Cormack et al., 1996); Im Folgenden ist bei der Verwendung der Abkürzung GFP immer EGFP gemeint.

** In DsRed2 sind im Vergleich zum DsRed-Wildtyp die Mutationen V105A, I161T und S197A für beschleunigte Reifung des Fluorophors eingeführt. Angeblich verbessern die Mutationen R2A, K5E und K9T die Löslichkeit des Proteins (Clontech, Juli 2001, BD Clontech).

Die einzelnen Kanäle eines Fluoreszenz-Mehrkanal-Bildes wurden der automatischen Tonwert-Korrektur des Grafik-Programms Photoshop (in den Versionen 6.0 und 8.0/CS, Adobe Systems) unterzogen. In diesem Programm erfolgte ebenfalls die Überlagerung der Kanäle durch „Umgekehrte Multiplikation“. Von jeder Transfektion wurden zwei unabhängige Präparate an jeweils mindestens drei Bereichen analysiert.

2.5 Stabile Transfektion von CHO-Zellen

2.5.1 Das Flp-In-System

Zur Etablierung einer stabil mit dem DYRK 3-Transgen transfizierten Zelllinie wurde das Flp-In™-System benutzt. Bei diesem System ist eine Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase, einem ursprünglich auf dem 2 μ -Plasmid der Hefe codierten Enzym, stabil in die genomische Sequenz

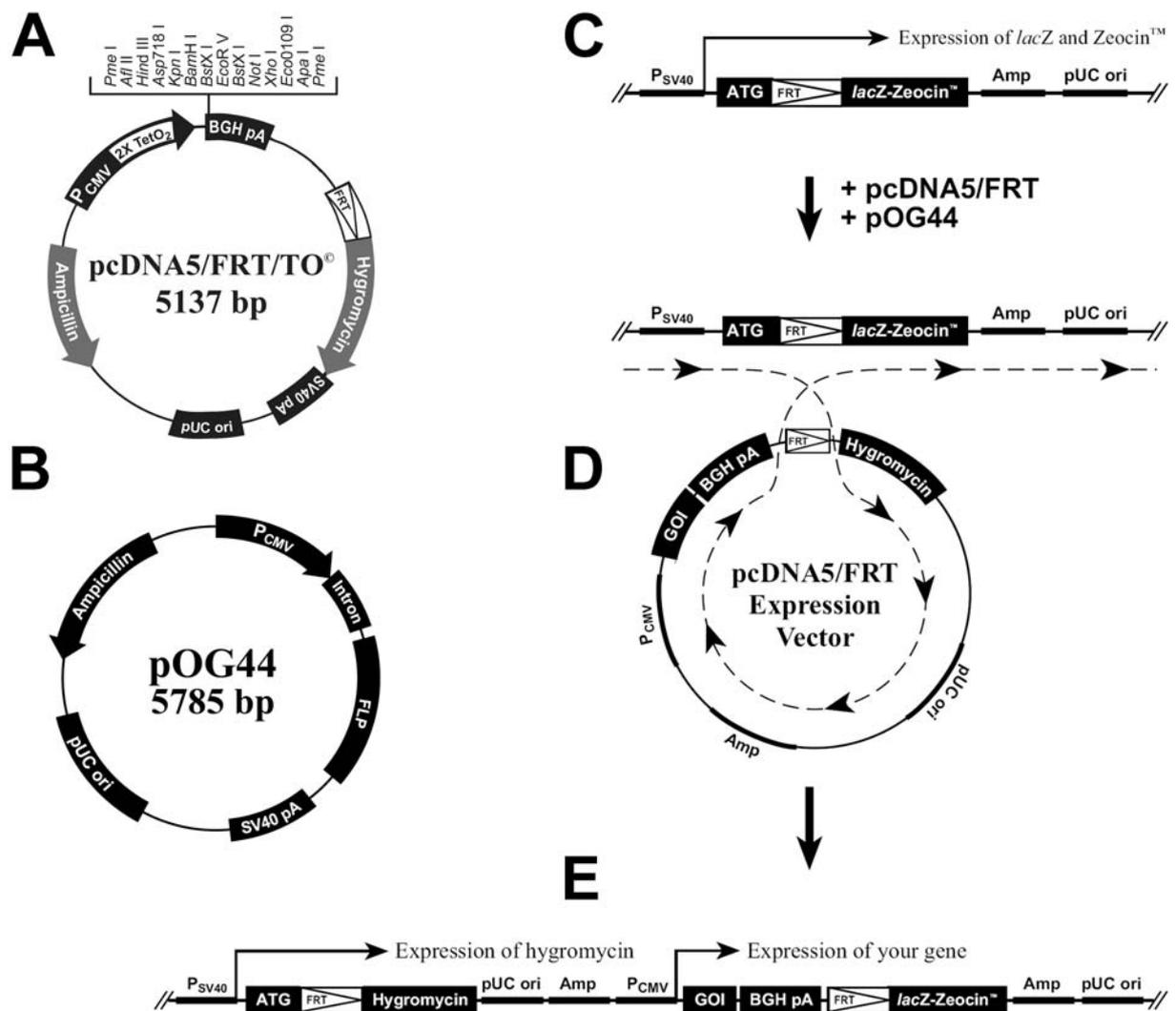


Abb. 2.1: Das Flp-In™-System. **A**, Karte des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA5/FRT/TO. **B**, Vektor-Karte des die Flp-Rekombinase codierenden Plasmids. **C**, in eine Flp-In™-Zelllinie ist Plasmid pFRT-lacZeo mit FRT-Sequenz stabil ins Genom integriert. **D**, schematische Darstellung des durch die Flp-Rekombinase katalysierten DNA-Doppelstrang-Austauschs. **E**, das stabil im Genom integrierte Konstrukt nach erfolgreicher homologer Rekombination. FRT, Flp Recombination Target (Flp-Erkennungssequenz). GOI, gewünschtes Insert, hier FLAG-DYRK 3-L. Die Abbildungen sind dem Handbuch des Flp-In™-Systems entnommen.

einer Zelllinie integriert. Diese Erkennungssequenz befindet sich direkt 3' nach dem Start-Codon innerhalb der codierenden Sequenz für ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase und einem die Zeocin-Resistenz bewirkenden Protein. Zellen des Flp-In™-Systems zeigen mit diesem Konstrukt β -Galactosidase-Aktivität und sind resistent gegen das Antibiotikum Zeocin.

Das gewünschte Transgen, hier DYRK 3 mit N-terminalem FLAG-Tag, kann nun in den eine FRT-Sequenz enthaltenden Vektor pcDNA5/FRT/TO (**Abb. 2.1.A**) kloniert werden. Gemeinsam mit dem die Flp-Rekombinase codierenden Plasmid pOG44 (**Abb. 2.1.B**) werden anschließend die oben beschriebenen Flp-In™-Zellen transfiziert (**Abb. 2.1.C**). In den Zellen, die mit beiden Plasmiden transfiziert wurden, erkennt die Flp-Rekombinase die FRT-Sequenzen im Genom und auf dem Plasmid und katalysiert zwischen diesen Stellen den DNA-Doppelstrang-Austausch (**Abb. 2.1.D**). Das Endprodukt dieser homologen Rekombination ist in **Abb. 2.1.E** dargestellt.

Die Auswirkungen der Integration des pcDNA5/FRT/TO-Plasmides am Ort der FRT-Sequenz sind im Folgenden beschrieben (siehe auch **Abb. 2.1.E**). Die auf dem Plasmid pcDNA5/FRT/TO codierte Resistenz gegen Hygromycin befindet sich nun stromabwärts vom SV40-Promotor. Das Start-Codon, das sich dort vorher befand, bildet nun den Beginn des Leserahmens der Hygromycin-Resistenz. Die aus CMV-Promotor, dem FLAG-DYRK 3-Transgen und der Signalsequenz für die Polyadenylierung aus dem Gen des Rinder-Wachstumshormon (BGH) bestehende Expressionskassette ist nun stromaufwärts des Fusionskonstruktes aus *lacZ* und Zeocin im Genom integriert. Dieses Gen kann jetzt jedoch nicht mehr transkribiert werden, da durch die Integration SV40-Promotor und Translationsbeginn entfernt wurden (siehe oben sowie **Abb. 2.1.D** und **E**).

Diese Rekombination bewirkt, dass die Flp-In™-Zellen resistent gegen Hygromycin, allerdings nun empfindlich gegenüber Zeocin sind. Zudem sollten sie keine β -Galactosidase-Aktivität mehr zeigen und das Transgen exprimieren. Nach der Doppeltransfektion mittels SuperFect (**Abschnitt 2.4.x**) mit pOG44 sowie pcDNA5/FRT/TO mit FLAG-DYRK 3-L als Insert wurde in Ham's F12 Medium (einschließlich 10% FBS und 2 mM L-Glutamin) mit 600 μ g/ml Hygromycin auf stabile Klone selektiert. In späteren Passagen wurde die Konzentration des Antibiotikums auf 400 μ g/ml gesenkt.

2.5.2 *lacZ*-Färbung von Flp-In-CHO-Zellen

Gegen Hygromycin resistente Zellklone wurden in 24-Loch-Platten ausgebracht. In subkonfluenten Zellen wurde die Aktivität des Enzyms β -Galactosidase (*lacZ*) mit dem β -Gal *Staining Kit* (Invitrogen) nachgewiesen. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Eine makroskopische Aufnahme dieser Zellen ist in **Abb. 2.2** dargestellt. Von diesen Zellen wurden bei einer konstanten Belichtungszeit (15 msec) mikroskopische Bilder im Hellfeld aufgenommen.



Abb. 2.2: Beispiel einer *lacZ*-Färbung von verschiedenen Klonen von Flp-In™-CHO-Zellen, die mit FLAG-DYRK 3-L transfiziert worden sind.

2.5.3 Nachweis des Transgens in genomischer DNA

Zum Nachweis des Transgens in stabil transfizierten Flp-In™-Zellen wurden 2×10^5 Zellen der zu analysierenden Klone pro Vertiefung einer 12-Loch-Platte ausgebracht. Nach Erreichen der Konfluenz wurde aus diesen Zellen genomische DNA für PCR-Analysen extrahiert (Protokoll A, Seite 6.22, Sambrook und Russel, 2001 folgend).

Hierfür wurden die Zellen 1 h bei 37 °C in 400 μ l PCR-Lysepuffer inkubiert (67 mM Tris-HCl, pH 8,8, 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM β -Mercaptoethanol, 6,7 mM MgCl_2 , 6,7 μ M EDTA, 1,7 μ M SDS sowie 50 μ g/ml Proteinase K). Nach dem Transfer der durch Auf- und Abpipettieren resuspendierten Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde der Ansatz für 10 min bei 80 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Während der gesamten Aufarbeitung wurde heftiges Mischen vermieden, um das Scheren der genomischen DNA nicht zu fördern.

Nach Zugabe von 6 mM EDTA (pH 8,0) wurden 10 μ l dieser Suspension in 50 μ l 1 x Reaktionspuffer mit je 30 pmol der Primer Nr. 199 und 201, 50 pmol jedes dNTPs sowie 2,5 Einheiten Taq-Polymerase (Diagonal) versetzt. Dieser Ansatz wurde nachfolgendem PCR-Programm unterworfen: 94 °C 1 min (94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 72 °C 2 min)₃₀, Pause bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Analyse im 1%igen Agarose-Gel.

2.6 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurde nach etablierten Protokollen kultiviert (Guthrie und Fink, 1991; Rose et al., 1990). Überdies wurden die Empfehlungen des *Yeast Protocols Handbook* (BD Clontech, Heidelberg, 2001) befolgt. Das Standard-Medium war YPDA. Zur Selektion auf Auxotrophie-Marker wurde SD-Medium verwendet, das den Selektionsbedingungen entsprechend durch *Drop Out*-Zusätze (BD Clontech) und gegebenenfalls weitere Aminosäuren (Sigma) supplementiert war. Zur Kultivierung auf festen Medien wurden 2% Bacto-Agar zugesetzt. Die Kultivierung in flüssigem Medium erfolgte unter Schütteln in Erlenmeyer-Kolben. Die Temperatur für die Kultivierung von *S. cerevisiae* war 30 °C. Zur besseren Ausprägung der blauen Färbung von MEL1⁺-Kolonien wurden die Platten aber nach der Kultivierung einige Zeit bei 4 °C inkubiert. Eine Lagerung der Hefe-Stämme auf Agar-Platten war bei 4 °C für eine Dauer von bis zu zwei Monaten möglich. Für längere Lagerung wurden die Hefen in 15% (v/v) Glycerin bei -80 °C eingefroren.

2.6.1 Transformation von *S. cerevisiae* mit rekombinanter DNA

Hefezellen wurden nach der Lithium-Acetat-Methode (Schiestl und Gietz, 1989) unter Verwendung des YeastMaker™ Yeast Transformation System 2 (BD Clontech, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers transformiert (Protokoll 1). Bei einer geringen Anzahl von Transformationen wurde alternativ dazu eine weniger als zwei Wochen alte Hefe-Kolonie direkt in TE/LiAc suspendiert und für die Transformation verwendet.

2.6.2 Das Hefe-System MatchMaker3

Für *Yeast Two-Hybrid Screens* wurde das Gal4-basierende System MatchMaker3 (BD Clontech) verwendet. Als Auxotrophie-Marker stehen durch den Hefe-Stamm AH 109 *HIS3* und *ADE2* zur Verfügung. Hefe-Stämme, die interagierende Proteine enthalten, können auf Selektionsmedium ohne Histidin und ohne Adenosin wachsen. Die verwendeten cDNA-Bibliotheken waren in dem AD-Vektor pACT2 aus polyA⁺-mRNA aus fötaler Leber bzw. Knochenmark humanen Ursprungs (BD Clontech, Heidelberg). Die Knochenmark-Bibliothek war bereits in den Hefe-Stamm Y 187

prätransformiert. Beide Bibliotheken enthielten laut Hersteller-Angaben $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone.

2.6.3 Yeast Two-Hybrid Screens von cDNA-Bibliotheken

Die cDNA-Bibliothek aus fötaler Leber wurde durch chemische Transformation (*Library Scale*) nach dem MatchMaker3 *Library Transformation and Screening Protocol* in den mit dem *Bait*-Plasmid transformierten Hefe-Stamm AH-109 gebracht. Bei Verwendung der prätransformierten Bibliothek wurde der Hefe-Stamm Y 187, in den die cDNA-Bibliothek aus humanem Knochenmark transformiert war, mit dem das *Bait*-Plasmid tragenden Hefe-Stamm AH 109 gekreuzt. Dabei wurde das Protokoll aus dem Pretransformed MatchMaker Libraries User Manual (Clontech) befolgt. Beide Reaktionsansätze wurden anschließend auf SD/WHL-Platten mit 10 bis 20 mM 3-Aminotriazol ausgebracht und mindestens zwei Wochen bei 30 °C inkubiert.

2.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach einem abgewandelten Protokoll verwendet. Mit einer frischen Einzelkolonie wurden 5 ml des entsprechenden Selektiv-Mediums inokuliert. Nach Schütteln bei 30 °C für 16 bis 24 h wurden die Zellen pelletiert (5 min 5000 x g, 4 °C), in 250 µl P1-Puffer mit 0,1 mg/ml RNase A resuspendiert und in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 50 bis 100 µl Glaskugeln (Säure-behandelt, 0,5 mm Durchmesser, Sigma) wurde der Ansatz für 10 min bei 1400 rpm geschüttelt und zwischendurch mehrmals kräftig gemischt. Anschließend wurde der Ansatz einige Minuten stehen gelassen, damit die Glaskugeln sedimentieren konnten. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde der Überstand mit 250 µl P2-Lyse-Puffer versetzt und nun nach dem normalen Miniprep Kit weiter bearbeitet. 5 bis 10 µl des Eluats in 30 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) wurde für Transformation von *E. coli*, 1 bis 2 µl als *Template* für PCR verwendet.

2.6.5 Protein-Extrakt aus *S. cerevisiae* für *Western Blot*

Das gefrorene Zellpellet einer Übernachtskultur, das 10 OD-Einheiten entsprach, wurde mit 140 µl auf 60 °C vorgewärmten *Cracking*-Puffer versetzt (8 M Harnstoff, 5% (w/v) SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml Bromphenolblau, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol, 12 mg/ml

Complete™, 1 mM PMSF, 1 mM NaF). Nach Zugabe von etwa 100 mg Glasperlen (Durchmesser 0,4 bis 0,6 mm) wurde der Ansatz 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend 1 min heftig gemischt. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (5 min bei >12 000 x g und 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Nach Zugabe von weiteren 50 bis 100 µl *Cracking*-Puffer wurden aus dem Pellet durch 3 - 5-minütige Inkubation bei 100 °C, 1-minütiges heftiges Mischen und erneute Zentrifugation (5 min bei >12000 x g und 4 °C) weitere Proteine extrahiert und mit dem ersten Überstand vereint. Nach einem weiteren Denaturierungsschritt bei 100 °C für 1 bis 3 min wurden die Proben entweder sofort mittels SDS-PAGE analysiert oder bei -80 °C gelagert. Der Nachweis von Proteinen im Hefe-Extrakt erfolgte mittels *Western Blot* (**Abschnitt 2.9.4**).

2.6.6 Phänotypische Analyse der erhaltenen Klone

Die positiven Klone nach den *Two-Hybrid-Screens* wurden durch erneuten Ausstrich auf Selektionsplatten sowie durch *lacZ* Aktivitätstests auf Nylon-Filtern (nach dem *Yeast Protocols Handbook*, BD Clontech, 2001) phänotypisch charakterisiert. Dabei wurden die Marker *ADE2* und *HIS3* getrennt voneinander analysiert (auf SD/WAL- und SD/WHL-Platten, letztere mit 10 bis 20 mM 3-Aminotriazol). Ebenso wurden Kombinationen von Proteinen, deren codierende Sequenz in die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 kloniert war, auf eine Wechselwirkung im Hefe-System getestet.

2.7 Bioinformatische Methoden

Für die Suche nach verwandten Sequenzen von DYRK 3 wurde das Programm BLAST in verschiedenen Versionen verwendet (Altschul et al., 1997; Altschul und Koonin, 1998; Schaffer et al., 2001; Altschul et al., 1990). Nach EST-Sequenzen wurde mit dem Programm tBLASTn in den EST-Datenbanken von GenBank gesucht (Benson et al., 2001), zudem wurden Einträge in Unigene genutzt (LINK).

Die Exon-Grenzen der humanen DYRK 3-L sowie die Verweise auf den jeweiligen RefSeq-Eintrag wurden dem entsprechenden LocusLink-Eintrag entnommen (www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/). Angaben zur möglichen Domänen-Struktur ließen sich im SwissProt-Eintrag (Bairoch und Apweiler,

1997) und in der SMART-Datenbank finden (Letunic et al., 2004; Schultz et al., 1998). Genomische Daten wurden dem Ensemble-Genome Browser entnommen (www.ensembl.org/) und mit BLAST2 verglichen.

Vorhersagen der Sekundärstruktur von Proteinsequenzen wurde mit NPS@ (Network Protein Sequence Analysis) und den darin verwendeten Unterprogrammen getroffen (Combet et al., 2000). Für die Vorhersage von ungeordneten Bereichen kamen zudem die in PONDR vereinigten Algorithmen zur Anwendung (Li et al., 1999; Romero et al., 2001; Romero et al., 1997), der Zugang zu PONDR wurde durch *Molecular Kinetics* gewährt. Das Programm 3D-PSSM wurde zur Erkennung von Protein-Faltungsmustern angewandt (Kelley et al., 2000).

Mit SequenceMassager (attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm) sowie zahlreichen Unterprogrammen von expasy.ch/tools wurden DNA-Sequenzen bearbeitet. Sowohl Nucleotid- als auch Protein-Sequenzen wurden mit ClustalW verglichen (Thompson et al., 1994), hierfür wurde die EBI-Version verwendet (www.ebi.ac.uk/ClustalW/).

Mögliche posttranslationale Modifizierungen wurden mit den Programmen NetPhos 2.0 (Blom et al., 1999), YinOYang (Gupta et al., 2003) sowie SUMOplot™ (www.abgent.com/sumoplot) vorhergesagt.

2.8 Heterologe Expression und Reinigung von Proteinen

2.8.1 Expression von cMyc-DYRK 3-S im TNT-System

Um die Kinase DYRK 3 in einem eukaryontischen Expressionssystem darzustellen, wurden zu 25 µl Weizenkeim-Extrakt (TNT®, Promega, Madison, USA) 2 µl des Reaktionspuffers, 1 µl T7-RNA-Polymerase, 1 µl Aminosäure-Mix (1 mM aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin), 1 µl 1 mM Methionin, 1 µl RNasin und 1 µl 50-fach konzentrierter Protease-Inhibitor-Mix Complete™ (Roche) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1 µg *Template*-DNA versetzt und mit DECP-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die gekoppelte *in vitro* Transkriptions-Translations-Reaktion erfolgte für 90 min bei 30 °C. Bei der *in vitro*-Expression von codierenden Sequenzen in pGBKT7 wurde die *Template*-DNA nicht linearisiert, da dieser Vektor sowohl T7-Promotor als auch T7-Terminator

enthält. Für Untersuchungen zur Löslichkeit des Expressionsprodukts wurde die Reaktion durch Inkubation auf Eis gestoppt. Pellet und Überstand nach 10-minütiger Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C wurden anschließend mittels SDS-PAGE und *Western Blot* mit dem monoklonalen anti-cMyc-Antikörper 9E10 (1:100 bis 1:200) analysiert.

Für die spezifische Markierung des translatierten Proteins wurde dem oben beschriebenen Reaktionsansatz 35S-Methionin mit einer Gesamtaktivität zwischen 0,37 und 3,7 MBq (10 bis 100 µCi) hinzugefügt. Die Detektion erfolgte anschließend an einem GS-525 Molecular Imager® System (Bio-Rad).

2.8.2 Expression in *E. coli*

Zur heterologen Expression von Proteinen wurden die in **Tab. 8.9** aufgeführten *E. coli*-Stämme verwendet. Mit einer Übernachtskultur (37 °C, 2YT mit dem entsprechenden Antibiotikum) wurde die Hauptkultur 1 : 50 inokuliert und anschließend unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,8 erfolgte die Induktion durch 1 mM IPTG. Nach 2 bis 5 h Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen sedimentiert (5000 x g) und in einem geeigneten Puffer gewaschen. Das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation (3000 x g) wurde bei -20 °C gelagert.

2.8.3 Zellaufschluss und IMAC

Das Bakterien-Pellet (2 bis 4 g Feuchtwicht) wurde in 15 bis 40 ml Aufschlusspuffer resuspendiert (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM Imidazol, 1 mM PMSF und 1 Tablette/50 ml Complete® EDTA-frei (Roche Diagnostics, Mannheim), 2 mM β-Mercaptoethanol, 0,1% Triton X-100). Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen erfolgte durch drei- bis fünfmalige Passage der Zell-Suspension durch einen Microfluidizer (120 psi, Microfluidics, Newton, MA, USA). Zelltrümmer und Membranbestandteile wurden durch Ultrazentrifugation (1 h, 100000 x g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde durch IMAC weiter bearbeitet. Zell-Suspension, Pellet und Überstand wurden mittels SDS-PAGE überprüft.

Der Überstand wurde im *Batch*-Verfahren auf 2 bis 8 ml Ni-NTA-Sepharose gegeben, die mit 50 mM K-Phosphat, pH 7,4, 100 mM KCl, 20 mM Imidazol und 1 mM β-Mercaptoethanol äquilibriert war. Bei 80 mM Imidazol wurden erst unspezifisch bindende Proteine eluiert. Die Elution des heterolog

exprimierten Proteins erfolgte bei einer Imidazol-Konzentration oberhalb von 120 mM.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) oder durch Absorption bei 280 nm in 6 M Gdm-Cl bestimmt. Der Extinktionskoeffizient für Maus-DYRK3-L₂₇₋₁₈₃ und die Cys128Ser-Mutante dieses Fusionsproteins beträgt bei 280 nm 7680 M⁻¹ cm⁻¹. Eine Lösung mit 1 mg/ml dieses Proteins zeigt somit eine Absorption von 0,408 AU. Für NMR-Messungen wurde die Proteinkonzentration mittels Zentricon (Millipore) auf mindestens 50 µM gesteigert.

2.8.4 Weitere Chromatographie-Schritte

Die Gelfiltration erfolgte an einer Superdex 75-Säule (Amersham Bioscience) in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT bei einem Fluss von 2,5 ml/min. Fraktionen zu 2 min wurden für die spätere Analyse durch SDS-PAGE gesammelt. Die Säule wurde mit dem *Low Molecular Weight Gelfiltration Kit* der Firma Amersham Bioscience kalibriert (Ribonuclease A, 13,7 kDa, 86,2 min; Chymotrypsinogen A, 25 kDa, 75,4 min; Ovalbumin, 43 kDa, 63,2 min; Albumin, 67 kDa, 55,5 min).

Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ (C_{128S}) wurde nach der IMAC-Reinigung durch Kationenaustausch-Chromatographie weiter bearbeitet. Hierfür wurde das Protein an einem Waters HPLC-System bei 4 °C an PORUS HS-Säulenmaterial gebunden (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl in 25 mM Kalium-Phosphat (pH 6,0) eluiert. Die Fraktionen, die nach SDS-PAGE Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ (C_{128S}) enthielten, wurden vereint und gegen 25 mM Kalium-Phosphat (pH 6,0) dialysiert (200-faches Volumen, dreimaliger Pufferwechsel, 8 °C).

2.9 Proteinchemische Protokolle

2.9.1 Limitierte Proteolyse mit Trypsin bzw. Papain

In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde Maus-DYRK 3₂₇₋₁₈₃-His8 (16 µM) in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 mit steigenden Mengen an Trypsin versetzt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses an Trypsin-Inhibitor aus Soja abgestoppt. Nach Konzentrierung der Proteine durch TCA-Fällung (Abschnitt **2.9.2**) erfolgte die

Analyse des Reaktionsansatzes in einem 15% Tris-Tricin-Gel, das entweder durch Coomassie- oder Silber-Einlagerung gefärbt wurde.

Maus-DYRK 3₂₇₋₁₈₃-His8 (16 µM) in 50 mM MES, pH 6,5 wurde mit steigenden Mengen an Papain versetzt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 1 ml. Die Reaktion wurde in flüssigem Stickstoff gestoppt. Nach Konzentrierung der Proteine durch TCA-Fällung (Abschnitt **2.9.2**) erfolgte die Analyse des Reaktionsansatzes in einem 15% Tris-Tricin-Gel, das entweder durch Coomassie- oder Silber-Einlagerung gefärbt wurde.

2.9.2 Fällung von Proteinen

Zur Konzentrierung einer Proteinlösung wurde diese mit dem gleichen Volumen 72%-iger Trichlor-Essigsäure (4 °C) gemischt und für 30 min bei -20 °C gefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4 °C) sedimentiert, zweimal mit 500 µl Aceton (-20 °C) gewaschen und getrocknet. Nach Lösen in Probenpuffer erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE. Alternativ dazu erfolgte die Fällung der Proteine mit Natrium-Desoxycholat (Arnold und Ulbrich-Hofmann, 1999).

2.9.3 Fraktionierung von Säugetier-Zellextrakten

Säugetier-Zellen wurden in eine Kernfraktion und eine cytosolische Fraktion nach dem Protokoll von Wojchowski und Mitarbeitern fraktioniert (Li et al., 2002).

2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE in Tris-Glycin-Gelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Bei der Analyse von Protein-Fragmenten nach limitierter Proteolyse oder bei heterologer Expression von Proteinen mit einem Molekulargewicht von weniger als 15 kDa erfolgte die Analyse in Tris-Tricine-Gelen (Schaegger, 1994). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist unter **2.1.3** zu finden. Die SDS-PAGE wurde in einer Mighty Small II Elektrophorese-Kammer durchgeführt (Hoeffer/Amersham Bioscience, Freiburg). Als Standards dienten Mark12, SeeBlue2 und MagicMark (allesamt Invitrogen). Die Darstellung der Proteine erfolgte entweder durch Coomassie- oder Silber-Färbung.

2.9.5 Western Blot mit Säugetier-Zellextrakten

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden nach der *semi dry*-Methode (Kyshe-Anderson, 1984; Towbin et al., 1979) elektrophoretisch auf PVDF-Membranen (Millipore) übertragen. Hierfür wurden Methanol-aktivierte Membran und Gel zwischen mehrere mit Transfer-Puffer getränkte Filterpapiere (3MM, Whatman) gelegt und zwischen zwei Flächenelektroden eingespannt. Der Transfer erfolgte 75 min bei 1 mA/cm². Zur Überprüfung des Transfers wurden Proteine mit Ponceau S (0,2 - 2% in 3% TCA) angefärbt. Alternativ dazu konnten Proteine auf der Membran auch durch eine Coomassie-Färbung mit kurzen Inkubationszeiten (Färber nur 10 sec bis 1 min) sichtbar gemacht werden. Zum Absättigen von hydrophoben Bereichen wurde Bio-Magermilchpulver (0,7% Fett) der Firma Heirler Cenovis (Radolfzell) verwendet (1 h 5% (w/v) Milchpulver (MP) in TBS-T bei Raumtemperatur). Anschließend erfolgte die Dekoration der Membran mit dem entsprechenden spezifischen primären Antikörper (siehe **Tab. 2.1**; in TBS-T mit 3% MP) für 90 min bei Raumtemperatur oder bei 8 °C über Nacht. Zur Detektion des primären Antikörpers dienten Peroxidase-konjugierte anti-Kaninchen bzw. anti-Maus IgG (1 : 1000 in TBS-T mit 3% MP, 1 h bei Raumtemperatur). Vor und nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte dreimaliges Waschen mit TBS-T (je 5 min, Raumtemperatur). Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurde die Membran eine Minute in Chemilumineszenz-Lösung inkubiert. Diese wurde durch Mischen von 2,5 mM Luminol, 400 µM p-Cumarsäure, 1% (v/v) DMSO in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) und 5,4 mM H₂O₂ in 0,1 M Tris-HCl frisch zubereitet. Alternativ dazu wurde Das ECL-Kit der Firma Amersham Bioscience nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte durch Exposition von Medical X-Ray Film (FUJI, Japan).

2.9.6 Analyse von Säugetier-Zellextrakten in 2D-Gelen

Die Auftrennung von Proteingemischen nach dem isoelektrischen Punkt in der ersten und dem apparenten Molekulargewicht in der zweiten Dimension erfolgte mit dem ZOOM IPGRunner 2D-Gel-System (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden in Niedrig-Salz-Puffer resuspendiert und hypoton lysiert. Nach der Protein-Bestimmung (Bradford, 1976) wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein auf Streifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3 bis 10) aufgetragen. Zur Isoelektrischen Fokussierung wurde folgendes Stufenprogramm bei konstanter Leistung (1 W)

angewandt: 20 min 335 V, 3 mA; 15 min 750 V, 1,3 mA; 15 min 1250 V, 0,8 mA; 30 min 3335 V, 0,3 mA. Hier erfolgte die SDS-PAGE in 4-12% NuPAGE Gradienten-Gelen mit dem Standard Mark12. Anschließend wurden die Gele durch Silber-Färbung oder durch *Western Blot* mit einem Antikörper gegen GFP analysiert.

2.10 Methoden der Protein-Analytik

2.10.1 UV/Vis-Spektroskopie

Absorptionsspektren im UV/Vis-Bereich wurden von Proteinlösungen an einem Varian Cary 100 Bio UV/Vis-Spektrometer aufgenommen. Spektren des Puffers ohne Protein wurden nachträglich subtrahiert.

2.10.2 Messung des Dichroismus von circular polarisiertem Licht (CD)

CD-Spektren wurden in entgasten und filtrierten Puffern (z. B. 50 mM K-Phosphat, pH 5.0) bei 20 oder 25 °C in einer 0,5 mm Küvette an einem Jasco CD-Spektrometer aufgenommen. Aus Protein-Proben wurden zuvor Partikel durch Zentrifugation entfernt (10 min 16000 x g, 4 °C). Bei der Messung wurden folgende Geräte-Parameter verwendet: 1 nm Bandbreite, 1 sec Ansprechzeit und 1 nm Schrittweite. Für ein Spektrum wurden jeweils 10 *Scans* akkumuliert. Spektren für Puffer ohne Protein wurden ebenfalls aufgenommen und anschließend subtrahiert. Der Gehalt an verschiedenen Sekundärstruktur-Elementen wurde mit der am Gerät vorhandenen Software bestimmt (Jasco Secondary Structure Estimation 1.0). Die Elliptizität molare Elliptizität pro Aminosäure Θ [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$] wurde nach **Formel 2.1** errechnet (Schmid, 1997). Hierbei wurde das Molekulargewicht M_w in [g/mol], die Konzentration in [mg/ml] und die Weglänge in [cm] eingesetzt.

$$\Theta = \frac{\text{Elliptizität} * M_w}{10 * \text{Konz} * aa * \text{Weglänge}}$$

Formel 2.1

2.10.3 Trypsin-Verdau für MALDI-Fingerprinting

Nach Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde 2 x 10 min mit H₂O gespült. Die zu identifizierenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, zerkleinert und in Acetonitril 10 min dehydriert. Nach

Entfernung des Überstandes wurden die Gel-Stücke mit 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ für 5 min rehydriert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, anschließend erfolgte die Trocknung des Gel-Stücks in einer Speed Vac SC110 (ThermoSavant, Holbrook, NY, USA). Das getrocknete Gel wurde bei 56 °C für 45 min in 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ mit 10 mM DTT aufgeschwemmt und dann in Acetonitril (5 min) abermals dehydriert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Gel in 55 mM Jodacetamid-Lösung für 15 min im Dunkeln inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und das Gel mit 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ für 5 min gewaschen und im gleichen Volumen Acetonitril für 5 min dehydriert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Gel für 30 min in der Vakuum-Zentrifuge (s. o.) getrocknet. Die in dem so behandelten Gel-Stück enthaltenen Proteine wurden 45 min in folgender Lösung tryptisch verdaut: 0,05 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 5 mM CaCl_2 , 0,0125 mg/ml Trypsin (Roche Diagnostics, Mannheim, gelöst in 1 mM HCl). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Gel-Stück im gleichen Puffer, jedoch ohne Trypsin, über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Sedimentation der Gel-Stücke wurde der Überstand mittels MALDI-TOF analysiert.

2.10.4 MALDI-TOF

Zur Analyse eines tryptischen Verdau wurde 1 μl des peptidhaltigen Überstandes mit 1 μl gesättigter α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (in 0,1% TFA/Acetonitril 2:1) gemischt. Für Proteinlösungen wurde Sinapin-Säure als Matrix verwendet. Salzhaltige Proben wurden mit Zip-Tips (Eppendorf) gereinigt. MALDI-TOF-Spektren wurden an einem Voyager-DE Pro Gerät (PerSeptive/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) im linearen (Proteine) bzw. Reflektor-Modus (Peptide) aufgenommen und mit dem Data Explorer ausgewertet (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.10.5 N-terminale Protein-Sequenzierung nach Edman

Zum Nachweis des N-Terminus eines Proteins wurde dieses mittels SDS-PAGE gereinigt und durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Proteinbanden auf der Membran wurden mit Coomassie angefärbt und ausgeschnitten. Die N-terminale Protein-Sequenzierung durch Edman-Abbau der ausgeschnittenen Banden erfolgte bei der Firma SeqLab (Göttingen).

2.11 Kern-Spinresonanz (NMR)

2.11.1 Eindimensionale ^1H -NMR

NMR-Spektren wurden an einem Inova 600 Spektrometer (Varian, Darmstadt) bei einer Protonen-Resonanzfrequenz von 599,8 Hz und einer Temperatur von 300 K im unter **2.11.3** angegebenen Puffer aufgenommen. Dieses Spektrometer war mit abgeschirmten Z-Gradienten ausgestattet. Die Wasserunterdrückung erfolgte durch die WATERGATE-Pulsfolge (Piotto et al., 1992) oder durch *Presaturation*.

2.11.2 Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen

Zur Markierung von Proteinen mit ^{15}N -Stickstoff wurde M9-Minimal-Medium (siehe **2.1.4**) mit ^{15}N - NH_4Cl zubereitet. Dieses Medium enthielt zudem 1 mM Thiamin sowie 12 g Glucose. In einer ersten Vorkultur (10 ml) wurde der entsprechende *E. coli*-Expressionsstamm zur Adaption an das Medium 8 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Hiermit wurden 200 ml M9-Minimal-Medium inokuliert und über Nacht (37 °C, 200 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6000 x g) sedimentiert, in 1 l frischem Medium resuspendiert und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 inkubiert (37 °C, 140 rpm, Schikanenkolben). Nach Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte die Expression des Proteins bei 30 °C und 140 rpm für 4 h. Das Zellpellet nach 15 min 6000 x g wurde mit PBS gewaschen und bei -20 °C bis zur Protein-Reinigung nach **2.8.3** gelagert.

2.11.3 ^{15}N -HSQC-NMR-Spektroskopie

Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃-His8 (50 μM) in 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 6,2 wurde mit 10% $^2\text{H}_2\text{O}$ versetzt und unter den unter **2.11.1** angegebenen Bedingungen gemessen. Die Aufnahme eines ^{15}N -Gradienten-HSQC (Kay et al., 1992) erfolgte mit der entsprechenden Pulsfolge aus der Standardbibliothek der installierten Varian Datenbank.

3 Ergebnisse

3.1 Die Lokalisierung von DYRK 3 in verschiedenen Zelllinien

Die Lokalisierung von DYRK 3 in der Zelle ist ein bedeutendes Indiz für die Funktion dieses Proteins. Allerdings ist die subzelluläre Lokalisierung von DYRK 3 bisher noch ungeklärt (siehe **Einleitung 1.4**). Nach einer genauen Analyse bereits vorhandener Informationen zu DYRK 3 sollte ektopisch exprimiertes DYRK 3-Protein in verschiedenen Zellarten untersucht werden. Hierfür wurden zunächst weitere Angaben zur Expression von DYRK 3 zusammengetragen.

3.1.1 Datenbank-Analyse der Expression von DYRK 3 und Auswahl des Zell-Systems

DYRK 3 wird wie in Abschnitt **1.4** beschrieben funktionell im Knochenmark und in fötaler Leber exprimiert. Diese Gewebe sind nur schwer experimentell zugänglich, aufwändig zu kultivieren und nur schlecht molekularbiologisch zu verändern. Verschiedene DYRK 3-cDNAs wurden jedoch aus fötalem Gehirn, quergestreifter Muskulatur und Hoden kloniert (Lord et al., 2000; Becker et al., 1998). Obwohl Lord et al. DYRK 3 als für erythroide Vorläufer spezifisches Protein beschreiben, gibt es in diesen Studien auch Hinweise auf die Expression von DYRK 3 in Herz, Bauchspeicheldrüse, Lymphknoten, Milz und Thymus, wenn auch nur auf niedrigem Niveau. Deshalb sollte die Frage geklärt werden, ob DYRK 3 auch in gut charakterisierten Zelllinien analysierbar ist. Hierfür wurden weitere Daten zur Expression von DYRK 3 gesammelt und durch die Suche nach *Expressed Sequence Tags* (ESTs) ein „elektronischer *Northern Blot*“ erstellt.

Mit dem Programm BLASTN wurde in der Datenbank dbEST von NCBI nach DYRK 3-ähnlichen exprimierten Sequenzen (ESTs) menschlichen Ursprungs gesucht. Zudem wurden Angaben aus der Sekundär-Datenbank UniGene EST (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene) verwendet. Bei diesem „elektronischen *Northern Blot*“ wurden für die menschliche DYRK 3 insgesamt 67 ESTs

gefunden, die aus Thymus, Gehirn, Leber, Niere und Lunge sowie Karzinom-Zellen stammen. Mehrfach wurden ESTs aus Gehirn (5), Leber (11), Hoden (5) und Niere (2) entdeckt.

Die hier beschriebene Analyse der Expression von DYRK 3 deutet auf eine weniger linienspezifische Expression hin als bisher in der Literatur dargestellt. Deswegen war die Untersuchung der Lokalisierung von DYRK 3 in gut charakterisierten Zelllinien möglich. Für die folgenden Versuche wurden die Leber-Zelllinie HEP-G2, die Nieren-Zelllinien LLC-PK1 und HEK-293 sowie COS-7-Zellen ausgewählt. Weitere Angaben zu diesen Zellen sind in **Tab. 2.2** zu finden.

3.1.2 DYRK 3 als Fusion mit DsRed

Nachdem feststand, dass DYRK 3 in verschiedenen Zelllinien untersucht werden kann, konnte mit den Lokalisierungsstudien begonnen werden. Hierfür wurde zunächst die codierende Sequenz von humaner DYRK 3-S in den Vektor pDsRed2-C1 kloniert, der die codierende Sequenz für das rot fluoreszierende Protein DsRed aus der Koralle *Discosoma spec.* enthält (Verkhusha et al., 2001; Yarbrough et al., 2001). Bei diesem Konstrukt befindet sich DsRed N-terminal von DYRK 3.

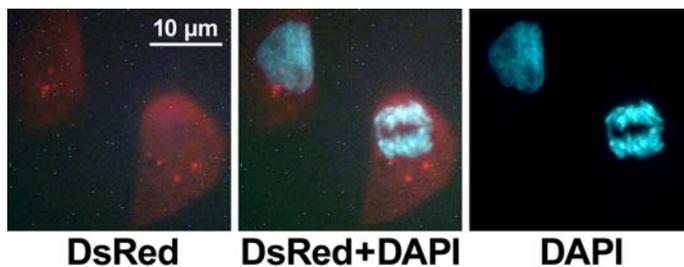


Abb. 3.1: Transfektion von LLC-PK1-Zellen mit DsRed-DYRK 3-S. Die Zellen wurden nach 24 h Expression fixiert und DAPI gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Fluoreszenz-Mikroskopie.

Vorab wurden mit diesem Plasmid die Transfektionsbedingungen von COS-7- und LLC-PK1-Zellen optimiert (siehe **Abschnitt 2.4.2**). Dem so etablierten Protokoll folgend, wurden nun LLC-PK1-Zellen mit DsRed-DYRK 3-S transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die Zellen fixiert und mit DAPI angefärbt, einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff. Anschließend wurden die Zellen durch Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. In LLC-PK1-Zellen war nur eine schwache Fluoreszenz im Rotkanal zu erkennen (**Abb. 3.1**). Diese war jedoch über die gesamte Zelle verteilt. Auch in Zellen, die sich gerade in der Mitose befanden, war keine Änderung der Lokalisierung des Fusionsproteins zu erkennen (**Abb. 3.1**, rechte Zelle).

Neben der einheitlich in der Zelle verteilten Fluoreszenz waren in mit DsRed-DYRK 3-S transfizierten LLC-PK1-Zellen auch Bereiche konzentrierter Fluoreszenz zu erkennen. Diese befinden sich in **Abb. 3.1** in beiden Zellen unterhalb der durch DAPI gefärbten DNA. In COS-7-Zellen, die mit dem gleichen Konstrukt transfiziert waren, waren diese Bereiche intensiver, gesprenkelter Fluoreszenz stärker ausgeprägt. Bei der Variation der Expressionszeit nach der Transfektion zwischen 20 und 53 Stunden konnte in COS-7-Zellen sogar eine Zunahme dieses Signals beobachtet werden.

DsRed lagert sich *in vitro* und in der lebenden Zelle zu Tetrameren zusammen (Wall et al., 2000). Diese Tetramerisierung ist für die Ausbildung des Fluorophors unbedingt erforderlich (Sacchetti et al., 2002). Überdies war bei einer Fusion von DsRed mit verschiedenen Connexinen, Proteinen der *Gap Junctions*, bereits eine Tendenz zur Aggregation beschrieben worden (Lauf et al., 2001). Somit kann auch für die Fusion von DsRed mit DYRK 3 die Aggregation des heterolog exprimierten Proteins in der Zelle eine Erklärung für die oben beschriebenen Beobachtungen sein (vergleiche hierzu **Abschnitt 3.2.2**).

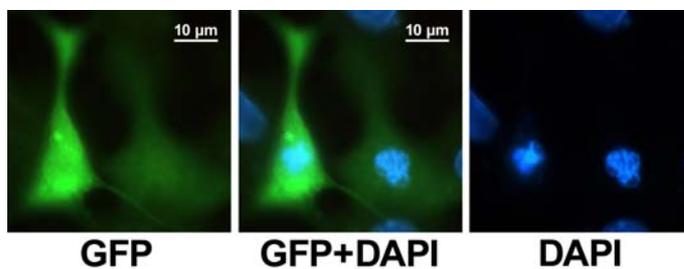


Abb. 3.2: LLC-PK1-Zellen wurden mit DYRK 3-S als GFP-Fusion transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h Expression fixiert und DAPI gefärbt.

Das Oligomerisieren, vor allem aber das Aggregieren des Fusionsproteins kann die korrekte Lokalisierung beeinträchtigen. Da auch die hier verwendete Kombination aus DsRed und DYRK 3-S zur Aggregation neigt, wurden für die folgenden Studien Fusionen von DYRK 3 mit GFP kloniert. Dieses grün fluoreszierende Protein GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* liegt im Gegensatz zu DsRed als Monomer oder als lose assoziiertes Dimer in der Zelle vor (Yang et al., 1996; Zimmer, 2002; Matz et al., 2002).

Die Beobachtungen in LLC-PK1-Zellen mit DsRed-DYRK 3-S sollten nun mit einer Fusion von GFP und DYRK 3-S wiederholt werden. Hierfür wurde die codierende Sequenz der Kinase in den Vektor pEGFP-C1 kloniert. Mit diesem Konstrukt wurden die oben beschriebenen Transfektionen wiederholt. Intensive Bereiche von gefleckter Fluoreszenz waren nun nicht mehr zu

erkennen. Gleichmäßig war die grüne Fluoreszenz der EGFP-Fusion in der Zelle verteilt wie in **Abb. 3.2.** zu erkennen. Aufgrund des beobachteten Aggregationsverhaltens einer Fusion von DYRK 3 mit DsRed war also eine GFP-Fusion von DYRK 3 mit GFP besser für weitere Lokalisierungsstudien geeignet. GFP wurde überdies bereits in verschiedenen Studien zur Analyse des Kerntransports von Proteinen verwendet (Stauber, 2002). Zusätzlich wurde auch eine DYRK 3-Fusion mit einem kurzen Peptid, dem FLAG-Tag, auf seine Lokalisierung getestet, der das Gesamtprotein nur um acht Aminosäuren größer werden lässt im Vergleich zu den Proteinen GFP (27 kDa) und DsRed (28 kDa).

3.1.3 FLAG-DYRK 3-L ist in HEK-293-Zellen vom Zellkern ausgeschlossen

An anderer Stelle wurde bereits gezeigt, dass DYRK 3 Fusionen am N-Terminus toleriert (Li et al., 2002). Eine kleine Fusion wie der FLAG-Tag (acht zusätzliche Aminosäuren) beeinflusst das Verhalten des Gesamtproteins nicht so sehr wie ein zusätzliches Protein (GFP, 27 kDa). Ein zusätzliches Epitop war bei diesen Studien für die Detektion von DYRK 3 erforderlich, da ansonsten nur ein Antikörper gegen den N-Terminus von DYRK 3 zur Verfügung stand, der diese Sequenz sehr schlecht erkannte.

Hierfür wurde vor die codierende Sequenz von DYRK 3-L die Sequenz für den FLAG-Tag eingefügt. Zwischen Start-Codon und der weiteren Sequenz von DYRK 3 befinden sich nun die Tripletts für die Aminosäuren DYKDDDDK. Direkt stromaufwärts des Start-ATGs wurde eine Kozak-Sequenz für gute Translationsinitiation eingefügt (Kozak, 1999; Kozak, 1989). Das so erhaltene Konstrukt wurde in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO eingefügt. (Dieser Vektor eignet sich auch für die stabile Integration des Inserts mittels Flp-Rekombinase.) Mit dem Plasmid FLAG-DYRK 3-L wurden nun HEK-293-Zellen transfiziert, nach 24 h Expression fixiert und durch Immunofluoreszenz und DAPI angefärbt (**Abb. 3.3**).

Die Zellen in den **Abb. 3.3.A** und **B** sind mit FLAG-DYRK 3-L transfiziert. Die Verteilung der Fluoreszenz von FLAG-DYRK 3-L unterscheidet sich deutlich von jener von GFP-DYRK 3-S. Trotz des niedrigeren Molekulargewichts von 66,7 kDa im Vergleich zu 91,4 kDa bei GFP-DYRK 3-S ist das hier untersuchte Fusionsprotein vollständig vom Zellkern ausgeschlossen.

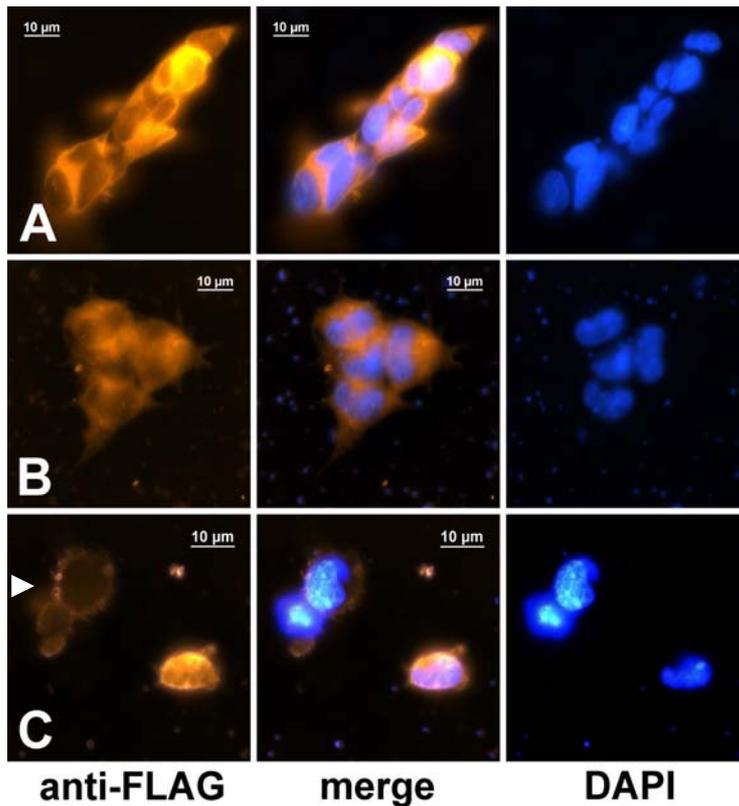


Abb. 3.3: Transfektion von humanen HEK-293 Zellen mit FLAG-DYRK 3-L. **A** und **B** zeigen verschiedene Zellen, die FLAG-DYRK 3-L enthalten, **C** zeigt oben links zwei nicht transfizierte Zellen (▶). Nach 24 h Expression wurden die Zellen fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper (1 : 1000) gegen den FLAG-Tag inkubiert. Der sekundäre **Cy3**-markierte Antikörper war gegen Maus-IgG gerichtet. Dann erfolgten **DAPI**-Färbung und Einbettung. *Merge*, Überlagerung der **Cy3**-Fluoreszenz mit dem DAPI-Signal.

Zwei nicht transfizierte Zellen sind in **Abb. 3.3.C** zu erkennen (siehe Pfeilspitze ▶). Diese wurden nicht vom anti-FLAG-Antikörper angefärbt und stellen somit eine Negativkontrolle für den Antikörper dar. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Zellen COS-7 und LLC-PK1 formen HEK-293 Zellhaufen. Dieses Erscheinungsbild ist jedoch nicht von der Transfektion abhängig.

FLAG-DYRK 3-L wurde in HEK-293-Zellen vom Kern ausgeschlossen, GFP-DYRK 3-S in LLC-PK1- und COS-7-Zellen jedoch nicht. Der Ausschluss vom Zellkern wurde bisher für keine Kinase der DYRK-Familie beschrieben. Um diese Art der Lokalisierung genauer zu untersuchen, wurde nun auch DYRK 3-S mit N-terminalem GFP in HEK-293-Zellen untersucht. Zudem wurde auch der Einfluss der Position des GFPs mit DYRK 3-Konstrukten mit C-terminalem GFP untersucht.

3.1.4 Klonierung von DYRK 3-Fusionen mit C-terminalem GFP

Die verschiedenen Isoformen von DYRK 3 (siehe **Einleitung 1.4**) unterscheiden sich in den ersten Aminosäuren des N-Terminus. Der gesamte N-terminale Teil dieser Kinase ist zudem der Bereich, der sich am meisten von den anderen DYRK-Proteinen unterscheidet. Innerhalb der ersten 150

Aminosäuren bestehen lediglich 15% Identität (und 26% Ähnlichkeit, *Needle Align*, EBI) zur Sequenz von DYRK 2. Falls in diesem Teil des Proteins die entscheidenden Signale für die korrekte Sortierung in der Zelle liegen, könnten diese durch N-terminale Fusionen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Deshalb wurden auch DYRK 3-Konstrukte mit C-terminalem Fusionsprotein untersucht.



Abb. 3.4: Schematische Darstellung von DYRK 3 in dem eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP-N1. Kozak, Nucleotid-Sequenz CCACC für gute Translationsinitiation.

Hierfür wurden sowohl die *Long*- als auch die *Short*-Isoform von DYRK 3 in den Vektor pEGFP-N1 kloniert. Bei diesen Konstrukten ist ein EGFP-Molekül C-terminal an das zu untersuchende Protein fusioniert. Für eine erleichterte Translationsinitiation wurde vor das Start-Codon ATG die Sequenz CCACC eingefügt (Kozak, 1999; Kozak, 1989). Eines dieser Konstrukte ist schematisch in **Abb. 3.4** dargestellt.

3.1.5 DYRK 3 mit C-terminalem GFP ist in HEK-293-Zellen vom Kern ausgeschlossen

HEK-293-Zellen, die von humanen embryonalen Nierenzellen abstammen, wurden bereits in früheren Arbeiten über DYRK 3 verwendet (Li et al., 2002). Diese Zellen wurden mit DYRK 3-L mit C-terminalem GFP, DYRK 3-S mit N- bzw. C-terminalem GFP sowie isoliertem GFP transfiziert, nach 24 h fixiert und DAPI gefärbt und durch Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert (**Abb. 3.5**).

Nach der Transfektion von HEK-293 mit DYRK 3-L und DYRK 3-S mit C-terminaler GFP-Fusion (**Abb. 3.5.A** und **B**) war die Fluoreszenz wie bei DYRK 3 mit N-terminalem FLAG-*Tag* vom Zellkern ausgeschlossen. Bei der Transfektion von HEK-293-Zellen mit DYRK 3-S mit N-terminalem GFP (**Abb. 3.5.C**) wurde die grüne Fluoreszenz wieder in der gesamten Zelle detektiert wie auch in LLC-PK1-Zellen (vergleiche **Abschnitt 3.1.2**). Hier war kein Ausschluss des Fusionsproteins vom Kern zu beobachten.

Um Klarheit über die Lokalisierung von DYRK 3 mit N-terminalem GFP zu gewinnen, wurde die Lokalisierung von GFP-DYRK 3 in HEK-293 auch durch

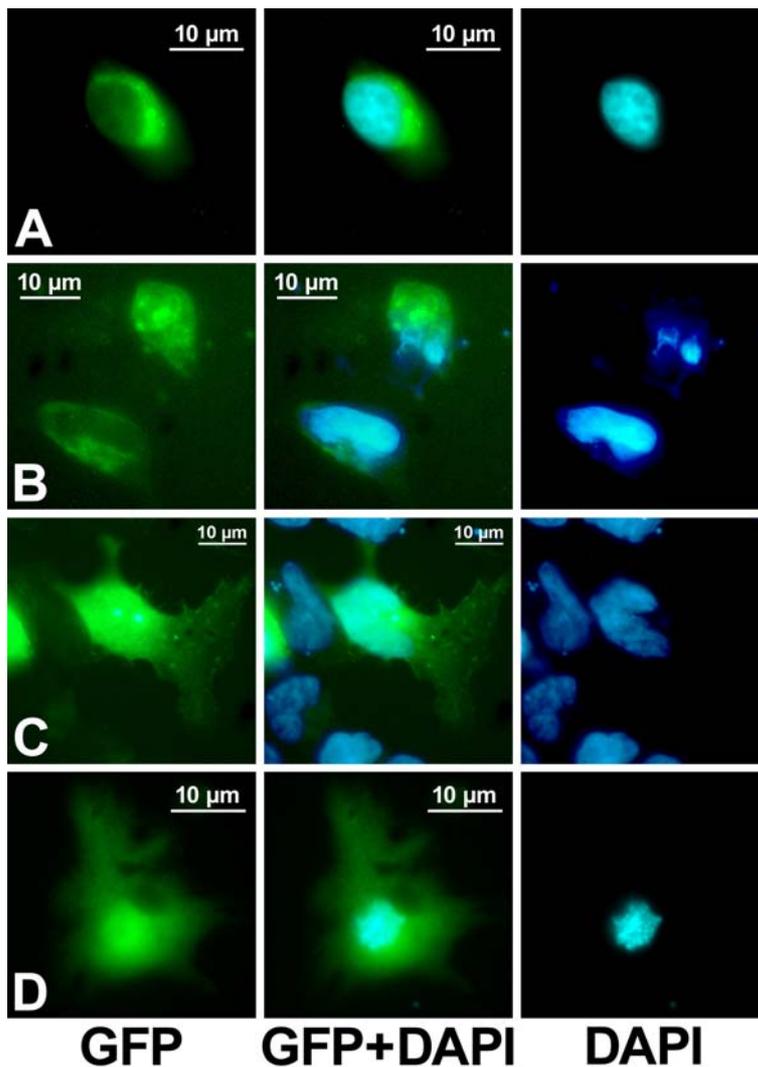


Abb. 3.5: Transfektion von HEK-293 Zellen mit DYRK 3-GFP-Fusionskonstrukten. Humane HEK-293 Zellen wurden mit **A)** DYRK 3-L-GFP, **B)** DYRK 3-S-GFP, **C)** GFP-DYRK 3-S sowie **D)** pEGFP-N1 transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen fixiert und DAPI gefärbt.

Zell-Fraktionierung untersucht. Im *Western Blot* wurde eine immunreaktive Proteinspezies mit einem apparenten Mol-Gewicht von etwas mehr als 90 kDa detektiert, was dem theoretischen M_W des Fusionsproteins von 91,4 kDa entspricht. Trotz niedriger Intensität des Signals konnte GFP-DYRK 3 sowohl im cytosolischen als auch im Kernextrakt nachgewiesen werden (**Abb. 3.6**). Dieses Ergebnis stimmt also mit den mikroskopischen Beobachtungen überein.



Abb. 3.6: Fraktionierung von HEK-293-Zellen, die mit GFP-DYRK 3-S transfiziert waren. In einem 4-12% NuPAGE-MOPS-Gel wurden cytosolischer Extrakt (cyt) und Kernextrakt (nuc) aufgetrennt und mittels *Western Blot* mit einem Antikörper gegen GFP analysiert.

Die DYRK 3-Fusion mit C-terminalem GFP war vom Kern ausgeschlossen, die DYRK 3-Fusion mit N-terminalem GFP befand sich im Gegensatz dazu sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern von HEK-293-Zellen. DYRK 3-S wurde nun mit N- bzw. C-terminalem GFP auch in HEP-G2-Zellen transfiziert, um zu klären, ob diese Unterschiede in der Lokalisierung auf einen Zelltyp beschränkt sind.

3.1.6 GFP-Fusionen von DYRK 3 sind in HEP-G2-Zellen vom Kern ausgeschlossen

Bei der Datenbank-Analyse der DYRK 3-Expression (siehe **Abschnitt 3.1.1**) wurden die meisten ESTs in Bibliotheken aus Leber-cDNA gefunden. Deshalb wurde nun auch die Lokalisierung von GFP-Fusionen von DYRK 3 in der menschlichen Leber-Zelllinie HEP-G2 untersucht. Diese Zelllinie exprimiert weiterhin zahlreiche Proteine des Leberstoffwechsels (Aden et al., 1979; Knowles et al., 1980).

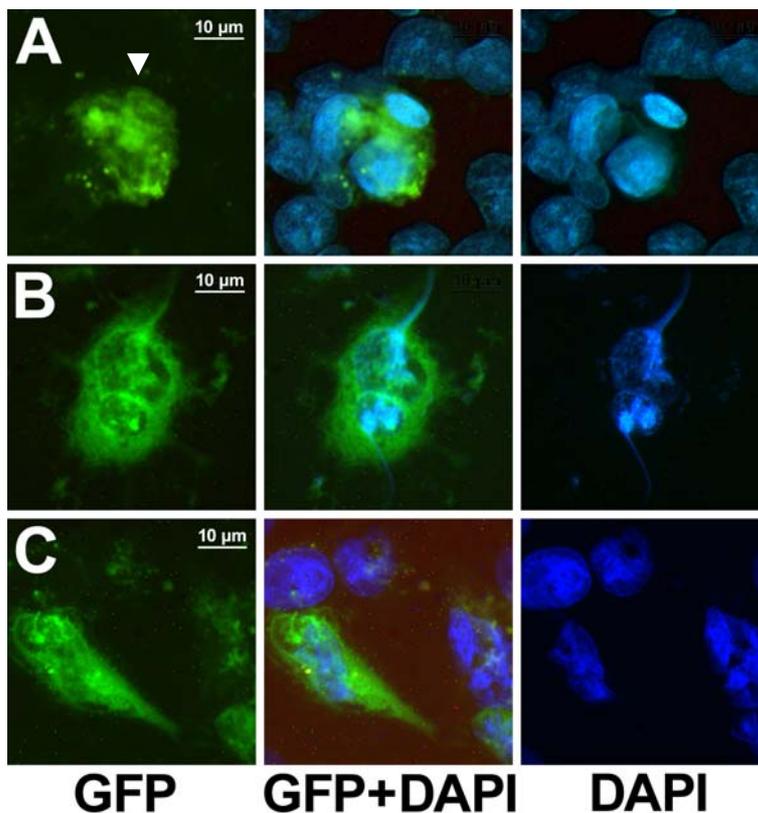


Abb. 3.7: Transiente Transfektion von humanen HEP-G2 Zellen mit
A) GFP-DYRK 3-S,
B) DYRK 3-S-GFP und
C) pEGFP-N1.

Nach 24 h Expression wurden die Zellen fixiert und **DAPI** gefärbt.

Hierfür wurden HEP-G2-Zellen mit DYRK 3-S mit N- bzw. C-terminalem GFP sowie dem Vektor pEGFP-N1 transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen fixiert, DAPI gefärbt und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert

(**Abb. 3.7**). In HEP-G2-Zellen befand sich DYRK 3 ausschließlich im Cytoplasma, nicht jedoch im Zellkern. Der Kernausschluss von DYRK 3 war hier unabhängig von der Position des GFPs im Gegensatz zu den in **Abschnitt 3.1.5** transfizierten HEK-293-Zellen. Diese bisher noch nicht beschriebene Art der Lokalisierung war bei HEP-G2-Zellen mit DYRK 3 und C-terminalem GFP deutlich zu erkennen (**Abb. 3.7.B**). Bei jenen Zellen mit DYRK 3 und N-terminalem GFP ist in **Abb. 3.7.A** lediglich eine Zelle mit klarem Ausschluss der Fluoreszenz vom Zellkern zu sehen (Pfeilspitze ▼ in **Abb. 3.7.A**).

Sowohl in HEK-293- als auch in HEP-G2-Zellen, nicht jedoch in LLC-PK1-Zellen war DYRK 3 als Fusion mit GFP oder dem FLAG-Tag vom Zellkern ausgeschlossen. Die Stellung des GFPs relativ zu DYRK 3 ist für den Kern-Ausschluss entscheidend, jedoch abhängig vom Zelltyp. Diese Art der Lokalisierung konnte nicht durch einfache Größenbegrenzung erklärt werden, da einzig der Größe nach alle hier untersuchten Fusionsproteine vom Kern ausgeschlossen sein sollten. Somit stellt die Lokalisierung von DYRK 3 ausschließlich im Cytoplasma ein Merkmal dar, das bisher bei keiner anderen DYRK-Kinase beschrieben worden ist.

Der Ausschluss von DYRK 3 vom Zellkern kann durch die Bindung an ein cytosolisches Ankerprotein erklärt werden. Dieses könnte in den verwendeten Zellen unterschiedlich exprimiert sein. So wäre die beobachtete Zelltyp-Spezifität verständlich. Auch verschiedene Zelltyp-spezifische posttranslationale Modifizierungen können die Lokalisierung von DYRK 3 beeinflussen.

3.1.7 Fragmente von DYRK 3 als GFP-Fusionen

Um erste Hinweise für den Mechanismus des Kern-Ausschlusses zu erhalten, wurde nun die Lokalisierung von Proteinfragmenten analysiert. Hierfür wurde der N-terminale Teil von DYRK 3-S von Met1 bis Gly163 in den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert. Laut dem Programm PSORT (www.psort.org) enthält dieses Fragment mit der Sequenz ¹⁵³PNAKKRH¹⁵⁹ ein einteiliges Kern-Lokalisierungssignal (NLS) (Horton und Nakai, 1997; Nakai und Horton, 1999). Falls dieses NLS funktional ist, sollte dieses Fragment im Kern angereichert werden. Wenn das Fusionsprotein jedoch vom Kern ausgeschlossen wird, spricht dies eher für die Existenz einer Bindungsstelle für ein Ankerprotein.

Sowohl dieses N-terminale als auch das im Folgenden beschriebene Kinase-Konstrukt enthielten ein C-terminales GFP sowie die in **Abschnitt 3.1.4** beschriebene Kozak-Sequenz. Die Kinase-Domäne von DYRK 1A (Val149 bis Met499) zeigte nach Deletion von N- und C-Terminus eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte Kinase-Aktivität (Himpel et al., 2001). Somit sollte auch das hier verwendete Fragment von DYRK 3 eine intakte Kinase-Domäne enthalten. Es beginnt direkt mit der *DYRK Homology Box* (siehe **Einleitung 1.3**) bei Gly164 und schließt den kurzen C-Terminus mit ein.

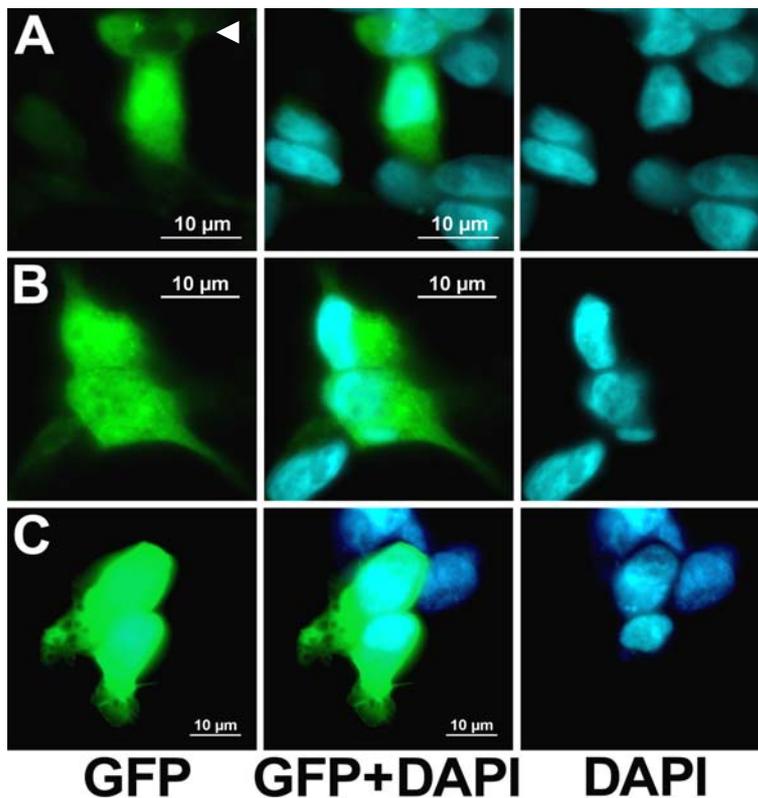


Abb. 3.8: Transfektion von HEK-293 Zellen mit Fragmenten von DYRK 3. HEK-293 wurden mit **A**, DYRK 3-S₁₋₁₆₃-GFP, **B**, DYRK 3-S₁₆₄₋₅₆₈-GFP sowie **C**, pEGFP-N1 transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen fixiert und DAPI gefärbt.

Die Lokalisierung dieser Konstrukte wurde im Folgenden in HEK-293-Zellen analysiert (**Abb. 3.8**). Hierfür wurden die Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert, nach 24 h Expression fixiert, DAPI gefärbt und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

Der N-terminale Teil von DYRK 3-S ist in einigen HEK-293-Zellen in der gesamten Zelle verteilt (**Abb. 3.8.A**). In anderen Zellen war aber auch für das N-terminale Fragment von DYRK 3 der Ausschluss vom Kern zu beobachten (Pfeilspitze ◀ in **Abb. 3.8.A**). In LLC-PK1-Zellen war dieses Konstrukt immer vom Kern ausgeschlossen.

Eine GFP-Fusion von DYRK 3-S ohne den N-terminalen Teil ist in HEK-293-Zellen gleichmäßig über die Zelle verteilt (**Abb. 3.8.B**). Im Gegensatz zu DYRK 3-S und DYRK 3-L in voller Länge (**Abb. 3.2** und **3.5.C**) zeigt dieses Fragment keinen Kernausschluss mehr. Die vermutete Bindungsstelle für ein postuliertes Ankerprotein kann durch die Deletion des N-Terminus verloren gegangen sein.

In **Abb. 3.9** sind die in diesem Abschnitt gewonnenen Erkenntnisse noch einmal zusammengefasst. Sie werden in **Abschnitt 4.1** ausführlich diskutiert. Im Folgenden wurde jedoch ein anderer Aspekt untersucht, der die Lokalisierung von zahlreichen Proteinen beeinflussen kann - mögliche posttranslationale Modifikationen.

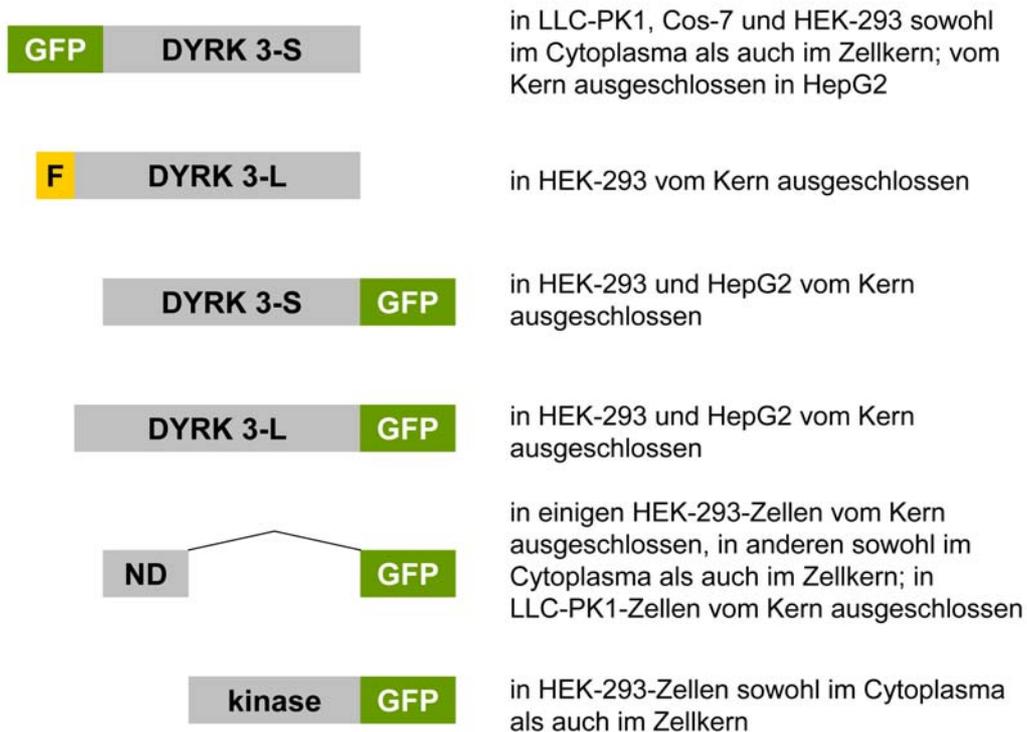


Abb. 3.9: Überblick über die in **Abschnitt 3.1** durchgeführten Transfektionen

3.2 Die Kinase DYRK 3 in eukaryontischen Expressionssystemen

Nach der ausführlichen Analyse der Lokalisierung von DYRK 3 in Säugetier-Zellen wurden Expressionsversuche in verschiedenen eukaryontischen Systemen durchgeführt. Diese sollten zeigen, ob die Kinase für eine *in vitro*-Reinigung überexprimiert werden kann. In diesem Falle sollten posttranslationale Modifizierungen genauer analysiert werden.

Die posttranslationale Modifizierung eines Proteins kann die Lokalisierung eines Proteins beeinflussen. Das Anhängen des kleinen Proteins SUMO (*Small Ubiquitin related MOdifier*) hat beispielsweise einen entscheidenden Einfluss auf den Transport zwischen Cytosol und Zellkern sowie auf die Zellkern-interne Protein-Sortierung (Pichler und Melchior, 2002).

Ein Ankerprotein kann für die Zelltyp-spezifische Lokalisierung von DYRK 3 verantwortlich gewesen sein (siehe **Abschnitt 3.1**). Jedoch können die dort geschilderten Beobachtungen auch durch eine Zelltyp-spezifische Modifizierung von DYRK 3 erklärt werden. Somit sollte des Weiteren dieser Aspekt von DYRK 3 untersucht werden.

3.2.1 Analyse von DYRK 3 mittels 2D-Gelelektrophorese

Mit dem Programm SUMOplot™ (www.abgent.com/sumoplot) wurde zunächst die Aminosäure-Sequenz von DYRK 3 nach Motiven für eine mögliche SUMOylierung durchsucht. Ein Motiv um Lys84 (MK⁸⁴VE), das nur in der Sequenz von DYRK 3 vorhanden ist, sowie ein weiteres um Lys337 (LK³³⁷PE), das in der Sequenz mehrerer Vertreter der DYRK-Familie enthalten ist, entsprechen exakt dem klassischen SUMOylierungsmotiv Φ KxE (Φ steht hier für einen hydrophoben Rest). Innerhalb des N-Terminus von DYRK 3 ist nur noch ein weiteres Motiv zu finden. Das weniger optimale Motiv um Lys159 (EK¹⁵⁹LE) ist einzig in DYRK 3 und dem homologen Nematoden-Protein MBK-2 zu finden. Motive für eine mögliche SUMOylierung sind also in der Aminosäure-Sequenz von DYRK 3 vorhanden. Zudem wird die den DYRK-Proteinen ähnelnde Kinase HIPK 2 durch SUMO-1-Konjugation modifiziert (Engelhardt et al., 2003).

Überdies war in *Western Blots* des in Hefe exprimierten N-Terminus von DYRK 3 eine weitere Beobachtung zu machen, die auf eine SUMOylierung

hinweist. Der Hefe-Stamm AH 109 wurde mit DYRK 3-L₂₇₋₁₈₄ bzw. mit Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ als Fusion mit der DNA bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors Gal4 und dem cMyc-Epitop transformiert. Die Klonierung von Maus-DYRK 3 wird in **Abschnitt 3.4.3** beschrieben. Suspensionskulturen dieser Hefen wurden im *Western Blot* mit einem Antikörper gegen das cMyc-Epitop analysiert (**Abb. 3.10**).

Eine schwache Bande mit einem apparenten M_W von 37 kDa war sowohl bei der Maus- als auch bei der humanen Isoform von DYRK 3 zu sehen (← in **Abb. 3.10**). Diese stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht dieser Fusionsproteine gut überein (37,7 kDa, human; 37,6 kDa, Maus). Zusätzlich zu diesem Signal war eine weitere, intensivere Bande mit einem apparenten MW von etwa 50 kDa zu sehen (◀ in **Abb. 3.10**). Sollte es sich bei beiden Proteinspezies um den N-Terminus von DYRK 3 handeln, so ist eine Modifizierung durch SUMO (11,5 kDa) oder Ubiquitin (8,6 kDa) eine mögliche Erklärung für die Größendifferenz.

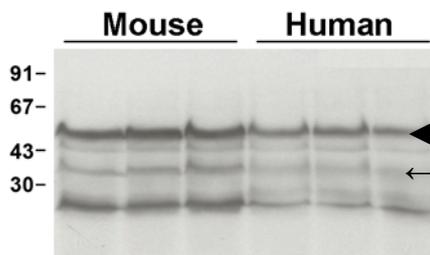


Abb. 3.10: *Western Blot* von humaner DYRK 3²⁷⁻¹⁸⁴ sowie Maus-DYRK 3²⁷⁻¹⁸³, jeweils mit N-terminaler Gal4-BD-Fusion. Das theoretische Molekulargewicht dieser Proteine beträgt 37,7 bzw. 37,6 kDa, hier sind zusätzlich Protein-Spezies mit apparentem M_W von 50 kDa zu erkennen.

Eine korrekte SUMOylierung eines menschlichen Proteins im Hefe-System sollte möglich sein, da die hierfür nötigen Enzyme hoch konserviert sind. (Goettsch und Bayer, 2002). Trotzdem sollte nun in menschlichen Zellen exprimiertes DYRK 3-Protein analysiert werden. Zur Analyse von post-translationalen Modifizierungen eignet sich besonders die zweidimensionale Gelelektrophorese wegen ihres sehr großen Auflösungsvermögens (Görg und Westermeier, 1998; Lottspeich, 1998). Deswegen wurde das ZOOM IPGRunner 2D-Gel-System (Invitrogen) im Labor etabliert (siehe auch **Material und Methoden 2.9.5**).

Die in **Abschnitt 3.1.4** beschriebenen Konstrukte von DYRK 3-L sowie der N-Terminus von DYRK 3-S mit C-terminalem GFP wurden erneut in HEK-293-Zellen transfiziert. Gesamt-Zellextrakt dieser Zellen wurde mit pH-Gradienten von pH 3 bis 10 nach dem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, in

der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und dann Silber gefärbt bzw. nach Transfer auf eine PVDF-Membran mittels *Western Blot* mit einem Antikörper gegen den GFP-Teil analysiert. Mit pEGFP-N1 transfizierte Zellen dienten hier als Positivkontrolle. Ein Signal für das GFP-Protein war bei etwa 28 kDa und einem pKi zwischen 5,1 und 5,3 deutlich zu erkennen.

Bereits bei der Fraktionierung von HEK-293-Zellen war beobachtet worden, dass ein Fusionsprotein mit DYRK 3 nur ein sehr schwaches Signal im *Western Blot* erzeugt (siehe **Abb. 3.6**). Deswegen wurde bei diesen 2D-Gelen getestet, ob die Auflösung der Signale auch oberhalb der vom Hersteller empfohlenen maximalen Proteinmenge zufrieden stellend ist. Überraschenderweise blieb die Auflösung selbst bei starker Überladung des Gels (300 µg Protein pro Gel) nahezu unverändert (**Abb. 3.11**).

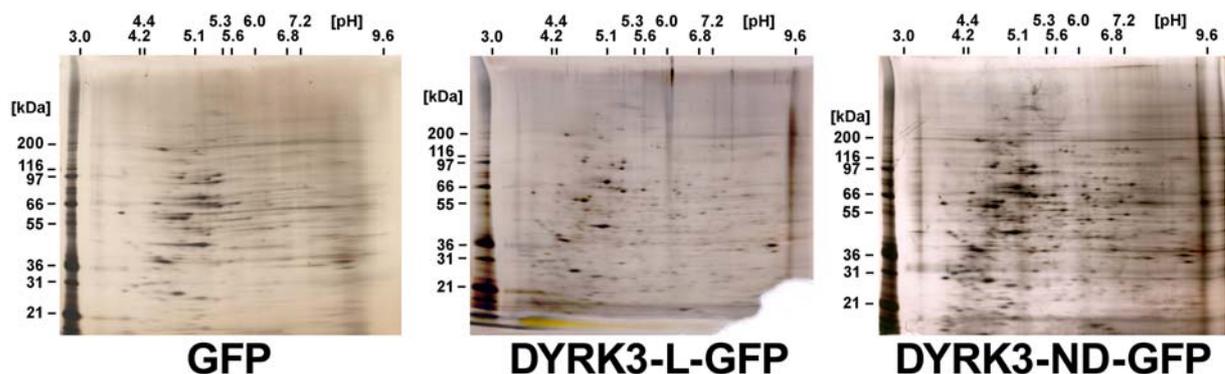


Abb. 3.11: DYRK 3-GFP-Konstrukte im 2D-Gel. HEK-293-Zellen wurden mit pEGFP-N1, DYRK 3-L-GFP sowie DYRK 3-S₁₋₁₆₃-GFP transfiziert. Nach 48 h Expression wurden die Zellen in Niedrigsalz-Puffer lysiert. Jeweils 300 µg Gesamtprotein wurden auf pH-Streifen von pH 3 bis 10 nach dem isoelektrischen Punkt und mittels SDS-PAGE in der zweiten Dimension aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Färbung durch Silbereinlagerung.

Auch mit 300 µg Gesamtprotein blieben Signale für die DYRK 3-Fusionsproteine unter dem Detektionslimit im *Western Blot*. Für eine weitere Analyse der HEK-293-Zellextrakte war der Anteil des DYRK 3-Fusionsproteins am Gesamtprotein nicht ausreichend (siehe hierzu auch **Abschnitt 4.2.1**). Im Folgenden wurde deshalb versucht, mehr DYRK 3-Protein durch gekoppelte *in vitro*-Transkription und Translation zu produzieren.

3.2.2 *in vitro*-Expression von DYRK 3

Nachdem es Indizien für eine posttranslationale Modifizierung von DYRK 3 gab, wurde das Zoom-2D-Gelsystem erfolgreich im Labor etabliert. Wegen des geringen Expressionsniveaus von DYRK 3 in HEK-293-Zellen war eine genauere Analyse möglicher DYRK 3-Isoformen bisher noch nicht möglich. Hierfür waren entweder größere Mengen an DYRK 3-Protein oder ein empfindlicherer Nachweis des Proteins nötig. Darum wurden Versuche unternommen DYRK 3 durch *in vitro*-Transkription und -Translation in einem eukaryontischen System darzustellen. In solchen Systemen ist die Expression von µg- bis mg-Mengen Protein möglich (Yokoyama, 2003). Eine *in vitro*-Translation birgt zudem den Vorteil, dass hier das Translationsprodukt spezifisch markiert werden kann (zum Beispiel durch den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren). Dadurch wird eine empfindlichere Detektion möglich als beim *Western Blot*.

Für die gekoppelte *in vitro*-Transkription und -Translation von DYRK 3-S wurde das Protein in voller Länge mit N-terminalem cMyc-Epitop in einem entsprechenden auf Weizenkeimextrakt basierenden System (TNT®, Promega) exprimiert. Hierfür wurde der Vektor pGBKT7 genutzt, der sowohl T7-Promotor als auch T7-Terminator enthält. cMyc-DYRK 3-S enthält 16 Codons für die Aminosäure Methionin. Dieses Konstrukt sollte also gut durch ³⁵S-Methionin-Einbau markierbar sein.

Das Konstrukt cMyc-DYRK 3-S wurde nach den Angaben des Herstellers im TNT-System exprimiert. Darauf wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Sowohl Überstand als auch das Pellet wurden nun mittels SDS-PAGE und *Western Blot* mit einem Antikörper gegen das cMyc-Epitop auf das Vorhandensein des Fusionsproteins hin analysiert (**Abb. 3.12.A**). Für das spezifische Markieren des Translationsprodukts wurde die TNT-Reaktion nach Zugabe von ³⁵S-Methionin wiederholt. Dieser Reaktionsansatz wurde als Ganzes in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Trocknen des Gels an einem Phosphor-Imager analysiert (**Abb. 3.12.B**).

In **Abb. 3.12.A** ist eine Bande bei 65 kDa zu erkennen, die dem berechneten Molekulargewicht von cMyc-DYRK 3-S von 65,9 kDa entspricht. Zudem sind Banden bei 40 kDa und 36 kDa erkennbar. Bei diesen handelt es sich um N-terminale Abbauprodukte des Translationsprodukts, da nur diese durch das

cMyc-Epitop markiert sind. Im Reaktionsansatz mit ^{35}S -markiertem Methionin (**Abb. 3.12.B**) ist ebenfalls eine Bande mit 65 kDa apparentem Molekulargewicht zu sehen, die cMyc-DYRK 3-S in voller Länge entspricht. Auch in diesem Ansatz sind kleinere Proteinfragmente zu erkennen.

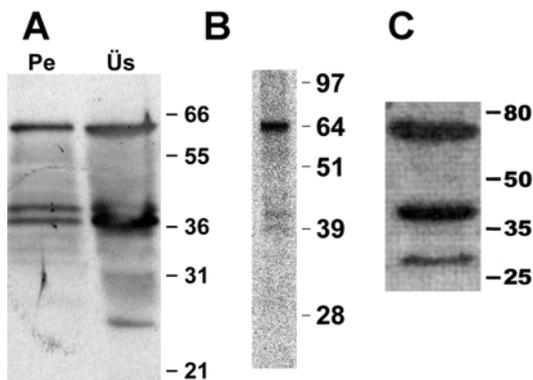


Abb. 3.12: *in vitro*-Expression von cMyc-DYRK 3-S. **A**, Nachweis des Proteins in Pellet (Pe) und Überstand (Üs) mittels anti-cMyc-Antikörper. Sowohl im Pellet als auch im Überstand sind Banden bei 65, 40 und 38 kDa erkennbar. (Standard Mark12 in 12% Tris-Glycin-Gel) **B**, DYRK 3-S wurde durch ^{35}S -Methionin-Einbau während der Translation markiert. Die Detektion des Reaktionsproduktes erfolgte am Phosphor-Imager (Standard SeeBlue2 in 10% MOPS NuPAGE). **C**, Maus-DYRK 3 mit N-terminalem cMyc-Epitop in FDCW2-Zellen zum Vergleich aus Li et al. (2002).

Zum Vergleich ist in **Abb. 3.12.C** eine Abbildung aus Li et al. (2002) wiedergegeben. Dort war Maus-DYRK 3, ebenfalls mit N-terminalem cMyc-Epitop, in Interleukin-3-abhängigen FDCW2-Zellen exprimiert worden. Auch bei der Expression in dieser Maus-Zelllinie waren neben einer Proteinspezies von ca. 70 kDa weitere Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 40 bzw. 30 kDa zu beobachten.

Die in **Abb. 3.12.A** sichtbaren Signale waren sowohl im Pellet als auch im Überstand vorhanden. Somit verringerte nicht nur proteolytischer Abbau die Menge an DYRK 3-Protein in voller Länge, ein Großteil des Proteins aggregierte zudem direkt nach der Translation.

Im TNT-System war es möglich, DYRK 3-S als Protein in voller Länge zu exprimieren. Hierbei waren jedoch trotz Zugabe von Protease-Inhibitoren und den im Weizenkeimextrakt vorhandenen Faltungshelfern sowohl proteolytischer Abbau als auch Aggregation nicht zu unterbinden. Die bei diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse helfen bei der Interpretation der Beobachtungen von DYRK 3-S mit N-terminalem DsRed in COS-7- und LLC-PK1-Zellen. Sowohl mit N-terminalem cMyc-Epitop als auch mit DsRed neigt die Kinase DYRK 3 zur Aggregation (siehe **Abschnitt 3.1.2**).

Wegen Aggregation und Abbau war jedoch das im TNT-System exprimierte Protein nicht für eine Analyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ausreichend. Deshalb wurde durch die aufwändige Expression in einer stabil transfizierten Zelllinie versucht, größere Mengen an DYRK 3 zu erhalten.

3.2.3 Humane DYRK 3-L in stabil transfizierten Flp-In-CHO-Zellen

In den in **Abschnitt 3.1** beschriebenen Versuchen erschienen wiederholt die transfizierten Zellen kleiner zu sein als nicht transfizierte Nachbarzellen in deren Umgebung. Der Kern der transfizierten Zellen war im Vergleich zu den anderen Zellen ebenfalls verkleinert (siehe beispielsweise **Abb. 3.2, 3.7.A und C, 3.8.C**). Diese Änderung der Zellmorphologie war allerdings unabhängig von der An- oder Abwesenheit der DYRK 3-Kinase. Zusätzlich zu diesem Einfluss der Transfektion selbst auf die Zellen waren mit den Plasmiden, die DYRK 3 enthielten, nicht die Transfektionsraten zu erreichen wie mit dem Vektor pEGFP-N1 allein oder mit Kontrollplasmiden, die den Natrium-Glucose-Cotransporter SGLT-1 oder die Tyrosylprotein-Sulfotransferase TPST-1 enthielten (freundlichsten bereitgestellt von Herrn Daniel Scharlau und Dr. Sandra Goettsch).

Um die Schwierigkeiten bei der Transfektion zu umgehen, sollte nun eine Zelllinie etabliert werden, die die Kinase DYRK 3 stabil exprimiert. Erste Versuche mit spontaner Insertion nach transienter Transfektion und Selektion mit dem Antibiotikum G418 lieferten keine zufrieden stellenden Ergebnisse. Überdies berichteten bereits Lord et al. über Probleme bei der Etablierung einer stabilen DYRK 3 exprimierenden Zelllinie (Lord et al., 2000).

Deswegen wurde eine stabile Zelllinie mit Hilfe des Flp-In-Systems (Invitrogen) etabliert. Hierbei wird die Insertion des Transgens durch die cotransfizierte Flp-Rekombinase katalysiert (Handbuch zum Flp-In-System, Invitrogen). Dieses von dem natürlich vorkommenden 2 μ -Plasmid der Hefe stammende Enzym erkennt eine spezifische 34 bp umfassende DNA-Sequenz und vermittelt an dieser Stelle analog zur Cre-Rekombinase eine homologe Rekombination (Sauer, 1994; Martin et al., 2002; Gopaul et al., 1998; Woods et al., 2001a). Weitere Erläuterungen zum Flp-In-System sind unter **Material und Methoden 2.5.1** zu finden.

Das bereits in **Abschnitt 3.1.3** beschriebene Plasmid von DYRK 3-L mit N-terminalem FLAG-Tag in pcDNA5/FRT/TO konnte für diese Versuche verwendet werden, da dieses Plasmid bereits die Erkennungssequenzen für

die Flp-Rekombinase und ein Hygromycin-Resistenz-Gen enthält. Mit diesem Plasmid und dem die Flp-Rekombinase codierenden Plasmid pOG44 wurden Flp-In-CHO-Zellen transfiziert und anschließend über mehrere Passagen bei einer anfänglichen Hygromycin-Konzentration von 600 µg/ml selektiert.

Durch die Integration des Transgens und der Resistenz sollte in den positiven Klonen die Expression des in den Ausgangszellen vorhandenen Enzyms β -Galactosidase (lacZ) unterbunden werden. Nach Subklonierung einzelner Klone wurden diese auch in einer 24-Loch-Platte ausgebracht und nach Erreichen der Konfluenz mit dem β -Gal *Staining Kit* (Invitrogen) auf ihre β -Galactosidase-Aktivität getestet. Drei dieser Klone sowie nicht transfizierte Flp-In-CHO-Zellen sind nach β -Gal-Färbung in **Abb. 3.13** zu sehen. Zweifelsfrei zeigten diese Klone eine geringere lacZ-Aktivität als der Wildtyp, was auf eine gelungene Insertion des Transgens schließen lässt.

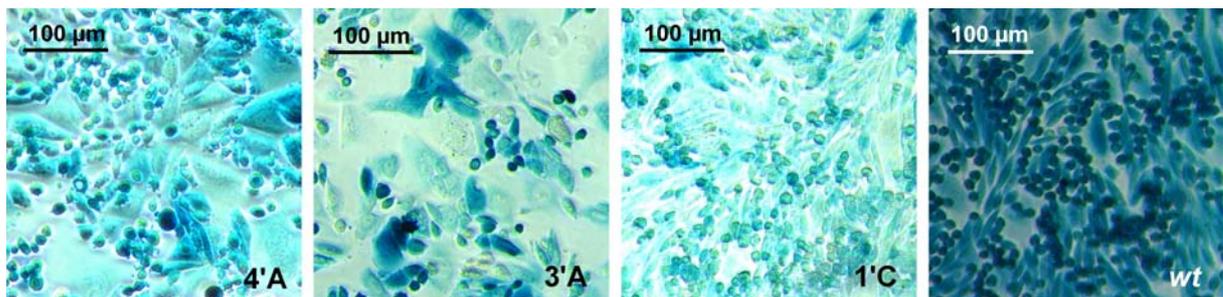


Abb. 3.13: β -Gal-Färbung von Flp-InTM-CHO-Zellen, die mit FLAG-DYRK 3-L transfiziert wurden (Klone 4'A, 3'A und 1'C). Im Vergleich dazu wurden Wildtyp (*wt*) Flp-InTM-CHO-Zellen angefärbt. Diese Aufnahmen erfolgten mit identischen Belichtungszeiten (konstant 15 msec) ohne nachträgliche graphische Bearbeitung.

Nach der positiv verlaufenen Etablierung von Zellklonen, die gegen Hygromycin B resistent sind und keine β -Galactosidase-Aktivität mehr zeigen, wurde das Vorhandensein des DYRK 3-Transgens in der genomischen DNA dieser Zellen durch PCR überprüft. Die verwendeten Primer amplifizieren das DYRK 3-Transgen in seiner vollen Länge (erwartetes PCR-Produkt 1826 bp). Wegen der enthaltenen Introns wird das endogene DYRK 3-Gen bei den hier verwendeten PCR-Bedingungen auf keinen Fall amplifiziert.

Wie unter **Abschnitt 2.5.4** beschrieben wurde genomische DNA aus allen zwölf in Kultur gehaltenen Klonen sowie aus verschiedenen Passagen der Ausgangszellen isoliert und mittels PCR analysiert. Die PCR-Ansätze wurden

anschließend in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt und an einem Gel Doc 1000 System (Bio-Rad) analysiert.

Bei allen zwölf Klone war eine Bande zwischen 1,5 und 2 kb zu sehen, die der erwarteten Größe des PCR-Produkts entsprach (**Abb. 3.14**). Diese Bande war nicht bei der PCR mit der genomischen DNA der Ausgangszellen entstanden. Somit handelt es sich bei diesem PCR-Produkt um das stabil integrierte DYRK 3-Transgen. Folglich war es gelungen, die codierende Sequenz für FLAG-DYRK 3-L in die genomische DNA von Flp-In-CHO-Zellen zu integrieren.

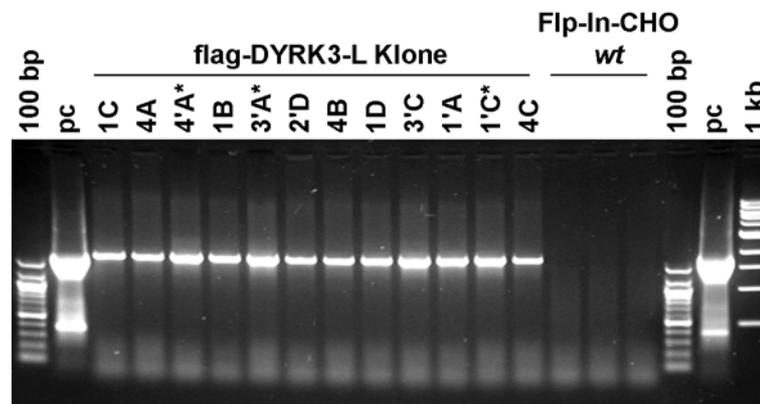


Abb. 3.14: PCR mit genomischer DNA als Template aus Flp-In-CHO-Zellen mit bzw. ohne stabil integrierter FLAG-DYRK 3-L. Als Marker dienten die NEB 100 bp- und 1 kb-Leitern. Als Positivkontrolle (pc) diente die codierende Sequenz von DYRK 3-L in pEGFP-N1 (links) sowie in pcDNA5/FRT/TO, bei denen das zu erwartende 1826 bp-PCR-Produkt zu sehen ist. Die Klone, deren β -Gal-Färbung auch abgebildet ist, sind mit * markiert.

Die Klone mit FLAG-DYRK 3-L sowie nicht transfizierte Zellen wurden nun wie die in **Abschnitt 3.1.3** analysierten HEK-293-Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgebracht. Subkonfluent erfolgte die Färbung mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop oder mit dem Antikörper gegen den N-Terminus von DYRK 3-L. Mit beiden Antikörpern war kein Unterschied zwischen den untersuchten transgenen Klone und den Ausgangszellen zu beobachten.

Daraufhin wurden Zellextrakte der FLAG-DYRK 3-L-Klone 4'A, 3'A und 1'C sowie des Wildtyps mittels *Western Blot* mit dem Antikörper gegen den DYRK 3-L-N-Terminus sowie dem anti-FLAG-Antikörper auf die Anwesenheit des transgenen Proteins getestet. Bei keinem der Klone war eine spezifische

Bande mit einem apparenten Molekulargewicht zu erkennen, die dem theoretischen Molekulargewicht dieses Fusionsproteins von 66,7 kDa entsprach.

Obwohl ohne Zweifel die codierende DNA für DYRK 3 in den transfizierten Flp-In-Zellen vorhanden war, bewirkte das Transgen keine detektierbare Expression des Proteins. Wenn die Überexpression der Kinase DYRK 3 toxisch für die Zellen ist, dann haben jene Zellen einen Wachstumsvorteil, die die Kinase nur schwach oder gar nicht exprimieren. Nach mehreren Passagen kann das zum vollständigen Verlust der Expression führen. In Ermangelung genauerer Kenntnisse über die physiologische Rolle von DYRK 3 bleibt hier die interessante Fragestellung, wie die Zellen die Expression des Transgens unterbinden können. Durch RT-PCR sowie Sequenzierung der genomischen Inserts kann diese Frage in weiterführenden Studien beantwortet werden.

In dieser Arbeit sind erste Indizien für eine posttranslationale Modifizierung von DYRK 3 gesammelt worden. Für die viel versprechende weitere Analyse dieser DYRK 3-Modifizierung wurde zudem die zweidimensionale Gelelektrophorese erfolgreich im Labor etabliert. Bisher behinderte jedoch der niedrige Anteil des DYRK 3-Proteins im Protein-Extrakt transfizierter Zellen genauere Analysen. Diese Aufgabe soll durch Anreicherung der transfizierten Zellen mittels Fluoreszenz-gestützter Zell-Sortierung (FACS) oder Immunopräzipitation in weiterführenden Studien angegangen werden. Dann kann auch der Nachweis einer möglichen SUMOylierung mittels *Western Blot* mit einem gegen SUMO gerichteten Antikörper erbracht werden.

3.3 Der N-Terminus der Kinase DYRK 3 interagiert mit STAT 5

Bei der Entwicklung von roten Blutzellen wurde der Kinase DYRK 3 eine regulierende Rolle zugeschrieben (Geiger et al., 2001; Lord et al., 2000). Die Wirkungsweise dieses Enzyms als Inhibitor der Erythropoiese ist jedoch auf molekularer Ebene noch ungeklärt, da bisher keine Wechselwirkungspartner dieser Kinase bekannt sind.

3.3.1 Suche nach Interaktionspartnern von DYRK 3

Für das Auffinden von Interaktionspartnern hat sich das *Yeast Two-Hybrid*-System besonders bewährt (Drees, 1999; Uetz et al., 1998). Diese Methode wurde 1989 erstmalig beschrieben (Fields und Song, 1989). Hierbei wird die modulare Natur von Transkriptionsfaktoren ausgenutzt. DNA-bindende (BD) und die Transkription aktivierende (AD) Domäne des Transkriptionsfaktors Gal4 können voneinander getrennt und mit anderen Proteinen fusioniert werden. Wenn diese im Zellkern der Hefe miteinander interagieren, entsteht wieder ein voll funktionstüchtiger Transkriptionsfaktor. Dieser wiederum aktiviert nun Reportergene der Hefe, über die die positiven Klone selektiert werden können. In dieser Arbeit wurde das System MatchMaker3™ (BD Clontech) verwendet.

Dem Protein DYRK 3 wurde eine funktionelle Rolle bei der Blutbildung zugeschrieben. Da die Blutbildung im Knochenmark und in fötaler Leber abläuft, wurde in cDNA-Bibliotheken dieser Gewebe in *Yeast Two-Hybrid Screens* nach Wechselwirkungspartnern von DYRK 3 gesucht. In beiden Bibliotheken waren die cDNA-Inserts im Hefe-Vektor pACT2 an die Gal4 Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Für die *Screens* wurden sowohl DYRK 3-*Baits* in voller Länge als auch N-terminale Fragmente im Hefe-Vektor pGBKT7 als Fusion mit der DNA bindenden Domäne (BD) des Transkriptionsfaktor Gal4 verwendet. Mit den *Bait*-Plasmiden transformierte Hefe AH 109 wurde nun entweder chemisch mit der cDNA-Bibliothek transformiert oder mit einer prätransformierten Bibliothek im Hefestamm Y 187 gekreuzt. Nun wurden die positiven Klone auf geeignetem Medium selektiert, die AD-Plasmide dieser Klone isoliert und schließlich deren Inserts sequenziert. Die gefundenen Klone sind in **Tabelle 3.1** aufgeführt, Angaben zu den durchgeführten Screens finden sich in **Tab. 8.10** im Anhang.

Tab. 3.1: Sequenzierte Klone aus den DYRK 3-Y2H-Screens

Screen	sequenzierte Klone
DYRK 3-S in BML	C-Terminus der Enolase-1 (Müller, 2001) STAT 5A (Müller, 2001)
DYRK 3-S in FL	Metallothionein 2A (BC007034), außerhalb des Leserahmens Proteoglycan 4; Megakaryozyten stimulierender Faktor, NP_005798 Erythroides alpha-Spectrin (NP_003117) CpG <i>binding protein</i> ; DNA bindendes Protein mit PHD und CXXC Domäne (NP_055408)
DYRK 3-L ₁₋₁₅₁ in FL	Metallothionein 2A (BC007034), außerhalb des Leserahmens (mehrere Klone)
hD3 ₂₇₋₁₈₄ in FL	Hämoglobin (BC032122) Metallothionein 2A (BC007034), außerhalb des Leserahmens alpha-2-HS-Glycoprotein (NM_001622) ATP-Synthetase F0 (NM_006356)

FL = cDNA-Bibliothek aus fötaler Leber; BML = cDNA-Bibliothek aus Knochenmark. Beide cDNA-Bibliotheken sind humanen Ursprungs. In Klammern ist der entsprechende Datenbank-Eintrag in Genbank angegeben.

Bei verschiedenen *Screens* wurden Klone isoliert, die einen Teil der codierenden Sequenz des Metallothionein 2A enthielten. Diese war jedoch stets außerhalb des Leserahmens an die Aktivierungsdomäne fusioniert, so dass sich die unten angegebene Aminosäure-Sequenz ergab (Kleinbuchstaben waren bei einzelnen Klonen unterschiedlich). Dieser Klon zeigte keine für DYRK 3 spezifische Interaktion und wurde deshalb nicht näher analysiert.

```
vdvpanprAT CPDSSRFFSS PWIPTAPAPP VTPAPAPAPA NAKSANAPPA RKAAPAALW
AVPSVPRAAS AKGRRTSAAA APDAGTAPLP DVKNATSTNL DFLCTTLTVT VCYIPFSMK
```

In einem *Screen* der cDNA-Bibliothek aus fötaler Leber mit der DYRK 3-Kinase in voller Länge als *Bait* wurde der C-Terminus von erythroidem alpha-Spectrin isoliert. Dieses Protein ist am Aufbau der Erythrocyten-Membran beteiligt und besteht zu einem großen Teil aus Spectrin-Motiven, einer sich wiederholenden Einheit. Bei Spectrin-Motiv 10 befindet sich zudem eine SH3-Domäne, deren Liganden noch unbekannt sind. Der in

diesem *Screen* isolierte Klon beginnt bei Spectrin-Motiv 18 und schließt jenen Teil des Proteins mit ein, dem eine E2-Ubiquitin-Ligase-Aktivität zugeschrieben wurde (Sangerman et al., 2001; Kakhniashvili et al., 2001). Dieser Klon kann sowohl für eine posttranslationale Modifizierung von DYRK 3 als auch für die cytosolische Verankerung dieser Kinase verantwortlich sein (siehe **Abschnitt 3.2**). Er soll in weiter führenden Studien charakterisiert werden.

Die anderen isolierten Klone codierten entweder extrazelluläre bzw. sekretierte Proteine (Proteoglycan 4 und alpha-2-HS-Glycoprotein) oder waren typische „Falsch-Positive“ bei *Yeast Two-Hybrid Screens* (CpG bindendes Protein, FO ATP-Synthetase; www.fccc.edu/research/labs/golemis). Aufgrund der hohen Expression von Hämoglobin in erythroiden Geweben und der damit einhergehenden Überrepräsentation der entsprechenden mRNA in der cDNA-Bibliothek wurde auch dieser Klon als „Falsch-Positiver“ eingestuft und nicht weiter bearbeitet.

Nach Aktivierung durch Phosphorylierung dimerisieren STAT-Proteine. Das Dimer wird anschließend aktiv in den Kern transportiert. Neuere Studien bewiesen überdies das konstitutive *Shuttling* von nicht aktivierten STAT-Monomeren (McBride und Reich, 2003; Meyer et al., 2002a; Zeng et al., 2002). Bereits in einer vorangegangenen Arbeit war Maus-STAT 5A als Wechselwirkungspartner von DYRK 3 identifiziert worden (Müller, 2001). Aufgrund der in **Abschnitt 3.1** beschriebenen Anzeichen für ein *Shuttling* von DYRK 3 wurde STAT 5A für die weitere Charakterisierung im Hefe-System ausgewählt.

3.3.2 DYRK 3 interagiert mit STAT 5A im Hefe-System

In vorangegangenen Studien konnte eine Wechselwirkung zwischen humaner DYRK 3-Kinase und dem Transkriptionsfaktor STAT 5A aus der Maus gezeigt werden (Müller, 2001). Für eine Bestätigung dieser Interaktion wurde die codierende Sequenz des menschlichen STAT 5A ausgehend von EST-Klon U43185 kloniert (*Clone ID* RG001104, Invitrogen Research Genetics). In der Aminosäure-Sequenz war eine Abweichung zum RefSeq-Eintrag NM_003152 in GenBank sowie zum SwissProt-Eintrag P42229 zu finden. Die Mutation Ala283Asp war überdies auch nicht in EST-Sequenzen vorhanden. Deshalb wurde diese Mutation mittels QuickChange wieder zu Ala283 korrigiert. Eine andere Sequenzabweichung existierte im RefSeq-

Eintrag NM_003152 im Vergleich zu dem hier sequenzierten Klon sowie zum SwissProt-Eintrag P42229. Anstelle von Gly88 enthält der RefSeq-Eintrag ein Arginin. Beide Varianten konnten durch EST-Sequenzen bestätigt werden, so dass es sich hier um einen natürlich vorkommenden Sequenz-Polymorphismus (SNP) handeln könnte. Gly88 wurde deshalb nicht verändert. Neben diesen Korrekturen wurde für Klonierungszwecke das Codon für Thr97 durch eine Mutation mit Megaprimer von ACA zu ACT verändert, um eine interne *Nde* I-Schnittstelle zu beseitigen.

Die korrigierte Sequenz für STAT 5A wurde als Fusion mit der Aktivierungsdomäne (AD) in den Hefe-Vektor pGADT7 kloniert. Zusammen mit DYRK 3- oder Kontrollkonstrukten in pGBKT7 als Fusion mit der Gal4 DNA bindenden Domäne (BD) wurde mit diesem Plasmid der Hefe-Stamm AH 109 transformiert und auf Selektivmedium ausgebracht (**Abb. 3.15**). Hefe-Stämme mit AD-STAT 5A in Kombination mit BD-DYRK 3-L oder -S zeigten Wachstum auf den Selektionsplatten, die Kontrollen jedoch nicht. Die Aktivierung der Reportergene und somit das Wachstum auf den Selektionsplatten ist der Hinweis auf eine Wechselwirkung der eingebrachten Proteine. Allein mit AD-STAT 5A und BD transformierte Hefen zeigten schwaches Wachstum auf Platten ohne Histidin, dies konnte jedoch durch Zugabe von 10 bis 20 mM 3-Amino-Triazol, einem kompetitiven Inhibitor des durch *His3* codierten Enzyms, unterbunden werden. Somit konnte die Interaktion zwischen den menschlichen Proteinen DYRK 3 und STAT 5A eindeutig im Hefe-System gezeigt werden.

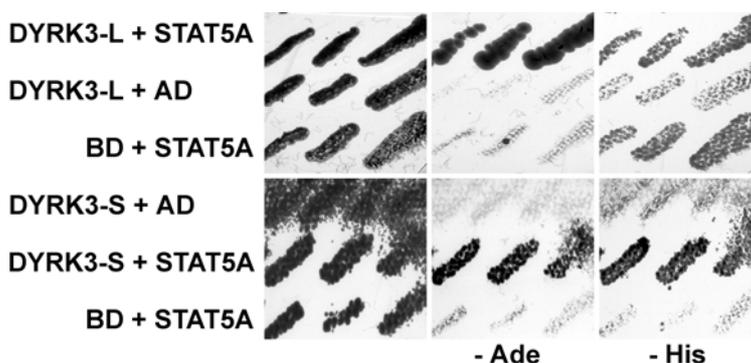


Abb. 3.15: Humane DYRK 3 (als Fusion mit der Gal4-BD) und humane STAT5A (als Fusion mit der Gal4-AD) im Hefe-Stamm AH 109. Wachstum auf den Selektionsplatten deutet auf eine Wechselwirkung der eingebrachten Proteine hin.

Für die weitere Untersuchung dieser Interaktion wurde die codierende Sequenz von humanem STAT 5A in den Vektor pGBKT7 als BD-Fusion kloniert, DYRK 3 in pGADT7 als AD-Fusion. Das Vertauschen von AD- und BD-Partner stellt eine Methode zur Überprüfung der Wechselwirkung im Hefe-System dar (BD Clontech, *Yeast Protocols Handbook*, 2001). Eine

erneute Aktivierung der Reportergene ist ein weiteres Indiz für eine tatsächliche Protein-Protein-Wechselwirkung. Das Testen dieser Plasmide im Hefe-System war aber nicht möglich, da STAT 5A - fusioniert an die Gal4-BD - bereits ohne Wechselwirkungspartner die Reportergene aktivierte. Mutmaßlich mittels seiner eigenen Transaktivierungsdomäne, die auch als solche in Hefe wirkt.

3.3.3 Die Kinase-Aktivität von DYRK 3 ist für die Interaktion mit STAT 5A nicht erforderlich

Ebenso wie andere DYRK-Kinasen phosphoryliert DYRK 3 bevorzugt ein Rx(x)S/TP-Motiv (Becker et al., 1998; Campbell und Proud, 2002), bei dem das Arginin nicht durch ein Lysin ersetzt werden kann. In der Primärsequenz von STAT 5A ist nur ein entsprechendes Motiv um Serin 780 in der Aktivierungsdomäne vorhanden. Die Phosphorylierung dieses Restes und eines weiteren S⁷²⁵P-Motives hat modulierenden Einfluss auf die STAT 5A-Aktivität (Decker und Kovarik, 2000). Dieser Aspekt wird zudem in **Abschnitt 3.6.1** diskutiert. Da die Transaktivierungsdomäne (TAD) von STAT 5A ein mögliches Substrat der Kinase DYRK 3 darstellt, könnte dieser Bereich auch für eine Wechselwirkung im Hefe-System ausreichend sein. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde zum einen die TAD in voller Länge, zum anderen eine Verkürzung bis zu Ser780, einem Teil des möglichen Phosphorylierungsmotivs, in den Hefe-Vektor pGADT7 kloniert und auf Wechselwirkung mit DYRK 3 getestet. Im Gegensatz zu STAT 5A in voller Länge (siehe **Abb. 3.15**) zeigten beide TAD-Konstrukte keine Interaktion mit DYRK 3 im Hefe-System (nicht abgebildet).

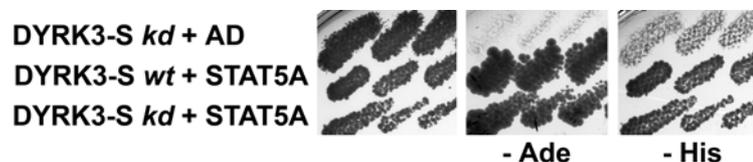


Abb. 3.16: Hefe-Stamm AH 109 wurde mit DYRK 3-S bzw. der katalytisch inaktiven Mutante DYRK 3-S_{Lys218Arg} als BD-Fusion und AD-STAT 5A transformiert und auf Selektionsplatten auf eine Wechselwirkung der transformierten Proteine getestet. *kd*, katalytisch inaktiv (*kinase dead*).

Zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen sind von der Phosphorylierung mindestens eines Wechselwirkungspartners abhängig. Wenn die Interaktion zwischen DYRK 3 und STAT 5 allerdings nicht primär auf die TAD und somit

auf das mutmaßliche Phosphorylierungsmotiv beschränkt ist, kann diese Wechselwirkung auch ohne Phosphorylierung durch DYRK 3 stattfinden. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde in BD-DYRK 3-S mittels QuickChange eine Punktmutation in der ATP-Bindungstasche eingeführt. Diese bei DYRK 1A und Maus-DYRK 3 bereits beschriebene Mutation (Lys218Arg) führt zum Verlust der Kinase-Aktivität (Becker et al., 1998; Li et al., 2002). (Dieses Lysin ist auch in **Abb. 1.2** dargestellt.)

Mit der katalytisch inaktiven Mutante von BD-DYRK 3-S und AD-STAT 5A wurde erneut die Hefe AH109 transformiert und auf Selektivmedium ausgebracht. In **Abb. 3.16** ist das Wachstum der Hefe mit AD-STAT 5A und BD-DYRK 3-S zu sehen, unabhängig ob Wildtyp oder Mutante. Die Interaktion zwischen STAT 5A und DYRK 3 ist folglich nicht abhängig von der Kinase-Aktivität von DYRK 3. Ob auch die Kinase-Domäne als strukturelle Einheit bei dieser Wechselwirkung entbehrlich ist, wurde in den folgenden Studien getestet. Hierfür wurde zunächst verschiedene Teile des DYRK 3-N-Terminus in pGBKT7 subkloniert und anschließend auf eine Wechselwirkung mit STAT 5A getestet.

3.3.4 Der DYRK 3-N-Terminus ist ausreichend für die Wechselwirkung mit STAT 5A

Innerhalb der Kinase-Domäne ähneln sich die Vertreter der DYRK-Familie. Die N-terminalen Domänen dieser Proteine sind jedoch sehr unterschiedlich. Die Unterschiede in den N-terminalen Sequenzen könnten Bereiche möglicher Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern darstellen und ein Merkmal zur molekularen Diskriminierung sein. Daher wurde nun getestet, ob der N-Terminus von DYRK 3 für die Bindung an STAT 5A ausreichend ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden unterschiedliche Teile des DYRK 3-N-Terminus in pGBKT7 kloniert und auf eine Wechselwirkung mit STAT 5A getestet (**Abb. 3.17**).

Das DYRK 3-L-Fragment von Met64 bis Lys151 beginnt in der Mitte eines 40 Aminosäuren umfassenden Bereiches, für den keine definierte Sekundärstruktur vorhergesagt werden konnte. Das Ende dieses Fragments befindet sich mit Lys151 genau zwischen zwei mutmaßlichen Helices. Isoliert konnte dieses Fragment stabil in *E. coli* exprimiert werden (siehe **Tab. 8.5** des Anhangs). Fusioniert an die DNA bindende Domäne von Gal4 war dieser Teil von DYRK 3 jedoch nicht ausreichend für eine Bindung an STAT 5A. Die

ersten N-terminalen Aminosäuren der langen Isoform von DYRK 3 schließen einige positiv geladene, aber auch flexible Reste (Ser, Gly) mit ein. Auch ein Fragment von Met1 bis zu dem eben beschriebenen Ende bei Lys151 zeigt keine Interaktion mit STAT 5A.

Das Konstrukt DYRK 3-L₂₇₋₁₈₄ bzw. das entsprechende Fragment Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ des Maus-Proteins beginnt mit der Leu27, ab der die verschiedenen DYRK 3-Isoformen *Short* und *Long* identisch sind. Dieses Fragment endet zwei Aminosäuren vor der *DYRK Homology Box*, einem innerhalb der DYRK-Familie konservierten Sequenz-Motiv (siehe **Einleitung 1.3**). Laut Sekundärstruktur-Vorhersage ist dieser Abschnitt eine *Loop*- oder *Coil*-Region. DYRK 3-L₂₇₋₁₈₄ schließt am C-terminalen Ende ein kurzes Falblatt mit ein und endet mit Gly183-Gly184 genau vor Prolin 185, einem Sekundärstruktur brechenden Rest. Dieses Fragment ist für eine Interaktion mit STAT 5A ausreichend (**Abb. 3.17**).

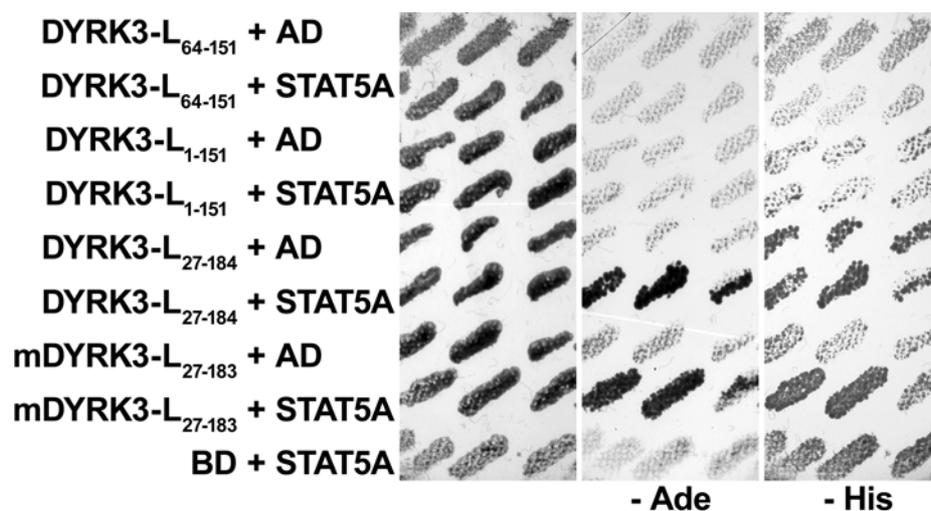


Abb. 3.17: Das N-terminale Konstrukt DYRK 3-L²⁷⁻¹⁸⁴ bzw. Maus-DYRK 3-L²⁷⁻¹⁸⁴ ist ausreichend für eine Wechselwirkung mit STAT 5A. Verschiedene Fragmente von DYRK 3-L wurden als Gal4-BD-Fusion gemeinsam mit AD-STAT 5A in den Hefe-Stamm AH 109 transformiert. Die Hefen wurden auf SD/WL ausgestrichen und nach 1 d bei 30 °C auf die Selektionsmedien SD/WAL und SD/WHL+10 mM 3-AT Replika gestempelt. Der Phänotyp auf den Selektionsmedien wurde nach drei bis fünf Tagen bewertet.

Der für die Bindung an STAT 5A verantwortliche Teil innerhalb des DYRK 3-Proteins konnte in diesen Versuchen schrittweise eingegrenzt werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in **Abb. 3.18** noch einmal schematisch

dargestellt. Das N-terminale Fragment DYRK 3-L₂₇₋₁₈₄ bzw. Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ ist für die Interaktion mit STAT 5A ausreichend.

Die Aminosäure-Sequenz des N-Terminus von DYRK 3 ist in **Abb. 3.20** zu sehen. Obwohl dieser Teil für eine Wechselwirkung mit STAT 5A ausreichend ist und darüber hinaus auch für die cytoplasmatische Verankerung von DYRK 3 verantwortlich zu sein scheint, enthält dieser Bereich keine bisher bekannte Protein-Domäne (lt. SMART-Datenbank für Protein-Domänen). Zudem sind auch keine zufrieden stellenden Antworten durch die Vorhersage der Sekundärstruktur zu erhalten. Deshalb sollte der N-terminale Teil von DYRK 3 in weiteren Studien biophysikalisch untersucht werden.

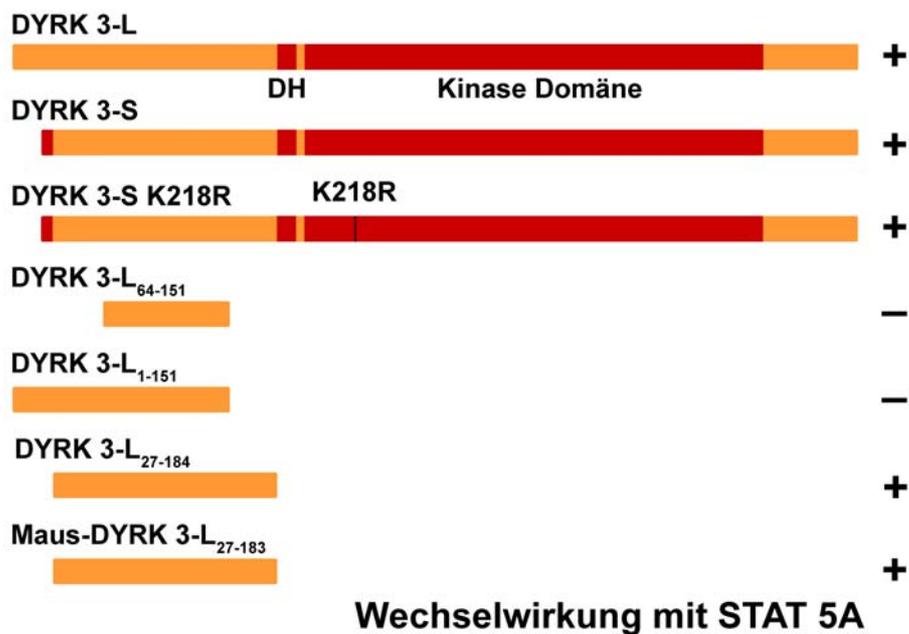


Abb. 3.18:
Schematische
Darstellung der
Wechselwirkung
von STAT 5A mit
Teilen von DYRK 3.
DH, DYRK
Homology Box.

3.4 Der N-Terminus von DYRK 3 besitzt nur wenig Sekundärstruktur in Lösung

In **Abschnitt 3.1** wurde gezeigt, dass der N-terminale Teil für die Verankerung von DYRK 3 im Cytoplasma verantwortlich ist, wahrscheinlich durch Bindung an ein Ankerprotein. Überdies ist dieser Teil für die Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor STAT 5A ausreichend (**Abschnitt 3.3**). Der N-Terminus ist also für die Funktion von DYRK 3 bedeutend. Dieser Teil des Proteins zeigt die geringste Ähnlichkeit zu anderen DYRK-Proteinen. Zudem enthält DYRK 3-L im Bereich von Met1 bis zu Tyr207, dem Beginn der Kinase-Domäne, außer dem kurzen *DYRK Homology*-Motiv keine bekannten Protein-Domänen laut der Domänen-Datenbank SMART (Letunic et al., 2004; Schultz et al., 1998). Selbst mit dem *Fold Recognition* Programm 3D-PSSM (Kelley et al., 2000) gelang es nicht ein Modell dieses Protein-Fragments zu erzeugen.

Der N-Terminus ist nach den Ergebnissen der bisherigen Abschnitte bedeutend für die Funktion von DYRK 3. Über die Struktur kann jedoch mittels bioinformatischer Methoden keine Aussage gemacht werden. Deshalb sollten nun Teile des N-Terminus heterolog exprimiert und biophysikalisch charakterisiert werden.

3.4.1 Der N-Terminus der humanen DYRK 3 neigt zur Aggregation

Zunächst wurde hierfür die codierende Sequenz von humaner DYRK 3-S einschließlich der *DYRK Homology* Box in einen modifizierten pET-19-Vektor kloniert. Das so entstandene Konstrukt enthält einen N-terminalen His6-Tag, eine Erkennungsstelle für TEV-Protease sowie humane DYRK 3-S₁₋₁₈₆. Dieses Konstrukt endet direkt vor der Kinase-Domäne. (Da sich die beiden DYRK 3-Isoformen L und S um 20 Aminosäuren unterscheiden, entspricht Tyr187 in DYRK 3-S dem oben erwähnten Tyr207 in DYRK3-L.)

Der N-Terminus von humaner DYRK-3 mit N-terminaler His6-Fusion wurde in *E. coli* BL21(DE3)RIL exprimiert (◀ in **Abb. 3.19.A**). Der größte Teil des Proteins befand sich nach dem Zellaufschluss im Pellet, ein gewisser Teil konnte jedoch mittels IMAC gereinigt werden (◀ in **Abb. 3.19.B**). Diese Präparation wurde mittels analytischer Gelfiltration untersucht (**Abb. 3.19.C**). Verschiedene Protein-Spezies wurden dabei detektiert, die einen großen

hydrodynamischen Radius hatten. Ein intensives Signal bei 46 min entspricht einem Partikel von deutlich mehr als 100 kDa. Einzig das schwache Signal (*) bei 83 min (entspricht 16,5 kDa) stimmt ungefähr mit dem erwarteten Laufverhalten eines Monomers des exprimierten Proteins (20,7 kDa) überein. In der SDS-PAGE enthielten alle untersuchten Fraktionen jedoch nur das monomere Fragment des DYRK-3-N-Terminus. Der geringe lösliche Anteil dieses Proteins besteht also hauptsächlich aus großen Aggregaten.

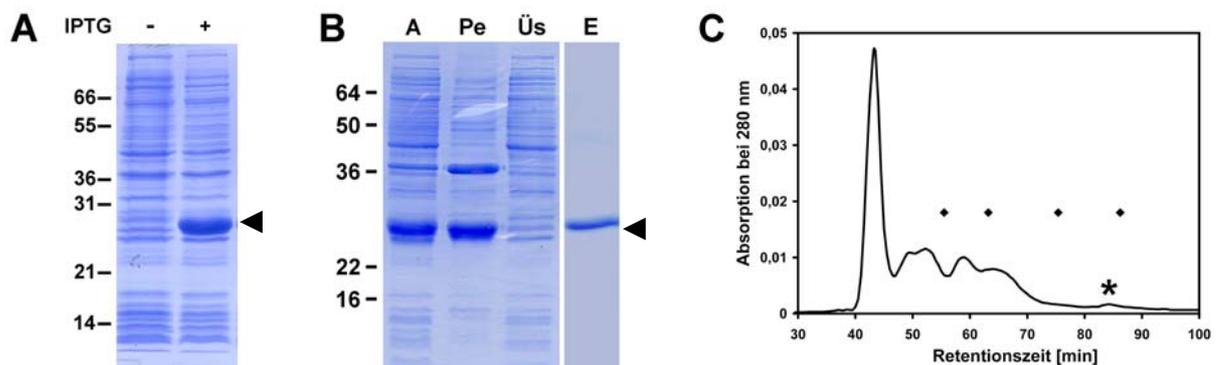


Abb. 3.19: **A**, Expression des humanen DYRK 3-N-Terminus mit N-terminalem His6-Epitop und TEV-Erkennungssequenz in *E. coli* BL21(DE3)RIL. **B**, Reinigung durch IMAC; A, Aufschluss; Pe, Pellet; Üs, Überstand; E, Eluat. **C**, Analytische Gelfiltration auf Superdex 75. Standards (◆) entsprechen 67 kDa, 43 kDa, 25 kDa und 13,7 kDa (von links nach rechts). Pfeilspitze (◄) in **A** und **B**, Induktionsbande und Bande nach IMAC-Reinigung.

Um ein besser lösliches Konstrukt des N-terminalen Teils des DYRK 3-Proteins zu erhalten, wurde nun die Aminosäure-Sequenz des N-terminalen Teils von DYRK 3 aus verschiedenen Säugetier-Spezies miteinander verglichen.

3.4.2 Sequenzvergleich des DYRK 3-N-Terminus aus verschiedenen Säugetier-Spezies

Da das exprimierte N-terminale Fragment der humanen DYRK 3 zum überwiegenden Teil aggregierte, wurde diese Sequenz mit dem homologen Protein aus der Maus verglichen (**Abb. 3.20**). Obwohl für das Protein aus Maus bisher noch keine *Splice*-Varianten beschrieben sind, waren auch hierfür ESTs mit unterschiedlichen 5'-Bereichen zu finden. In dieser Abb. wurde eine Sequenz dargestellt, die der humanen DYRK 3-L gleicht. Diese Sequenzen zeigen im gesamten N-terminalen Bereich bis Tyr209 81% Identität (und 94% Ähnlichkeit) in der Aminosäure-Sequenz. ESTs mit der

Mehrere Austausche von geladenen Aminosäuren (Asn48Asp, Gly71Arg, Asp72Gly, Asp79Asn, Asp107Asn) führen dazu, dass das Fragment Leu27-Gly183 des Maus-Proteins einen um fast eine pH-Einheit höheren isoelektrischen Punkt aufweist als der entsprechende Teil der humanen DYRK 3-L (pK_i 7,22 statt pK_i 6,48). Mit ⁵³PxxPxxPxR und ¹³⁴KxxKxxPxxP sind zwei verschiedene Poly-Prolin-II-Motive in der humanen DYRK 3-Sequenz vorhanden, die von SH3- oder WW-Domänen gebunden werden können (Cesareni et al., 2002).

Bis auf wenige bei Redox-Prozessen beteiligte Proteine liegen die Cystein-Seitenketten cytosolischer Proteine permanent als freie Thiol-Gruppen vor. Die Kinase DYRK 3 aus der Maus enthält in der Primärsequenz des N-terminalen Teils nur ein einziges Cystein (Cys128) im Gegensatz zu vier Cysteinen (Cys43, Cys46, Cys51, Cys123) im N-Terminus der humanen DYRK 3. Zudem ist auch dieses Cystein zwischen Mensch und Maus nicht konserviert, an Position 128 befindet sich in menschlicher DYRK 3-L ein Serin-Rest.

Sowohl für humane als auch für Maus-DYRK 3 wurde eine Rolle bei der Blutbildung nachgewiesen (siehe **Einleitung 1.4**). Somit sind die Cystein-Reste auch für die Funktion von DYRK 3 nicht essentiell. Da trotz Reduktionsmittel in allen verwendeten Puffern die Aggregate des humanen DYRK 3-Fragments Disulfid verbrückt waren, wurde der N-Terminus der Maus mit nur einem Cystein-Rest ausgewählt.

3.4.3 Klonierung und Expression vom Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃

Nachdem das DYRK 3-Protein aus der Maus für weitere Studien ausgewählt war, wurde die codierende Sequenz des N-Terminus von Maus-DYRK 3 ausgehend von EST-Klon BG 915770 (Research Genetics, Invitrogen) kloniert. Dieser EST-Klon wurde zunächst vom 5'- und vom 3'-Ende her sequenziert. Da 5'-Bereich und poly(A)-Schwanz der cDNA (GenBank NM_145508) vorhanden sind, enthält dieser EST-Klon die codierende Sequenz von Maus-DYRK 3 in voller Länge.

Zur Analyse der Struktur des DYRK 3-N-Terminus wurde die codierende Sequenz von Leu27 bis Gly183 des Maus-Proteins in pET-41 kloniert. Das so erhaltene Konstrukt schließt ein Start-Codon innerhalb einer *Nde* I-Erkennungssequenz und eine C-terminale His8-Fusion ein. Das DYRK 3-

Fragment von Leu27 bis Gly183 entspricht überdies dem in den **Abschnitten 3.1.7** sowie **3.3.4** verwendeten Teil der humanen DYRK 3 (Leu27 bis Gly184).

Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ wurde in *E. coli* BL21(DE3)RIL mit C-terminaler His8-Fusion exprimiert. Nach Induktion mit IPTG war eine deutliche Induktionsbande erkennbar (**Abb. 3.21.A**). Die Reinigung erfolgte durch IMAC sowie Kationenaustausch-Chromatographie. Der Anteil an löslichem Protein war bei Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ wesentlich höher als bei dem in **Abschnitt 3.4.1** exprimierten Protein (**Abb. 3.21.B**). Durch Austausch des einzigen Cysteins durch Serin (Cys128Ser) mittels QuickChange konnte die Löslichkeit dieses Fragments weiter gesteigert werden (**Abb. 3.21.C**). Hier war keine Bande in der pelletierten Fraktion (Pe) mit dem gleichen apparenten Molekulargewicht wie die Induktionsbande zu sehen, im Gegensatz zu Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃, (**Abb. 3.21.B**).

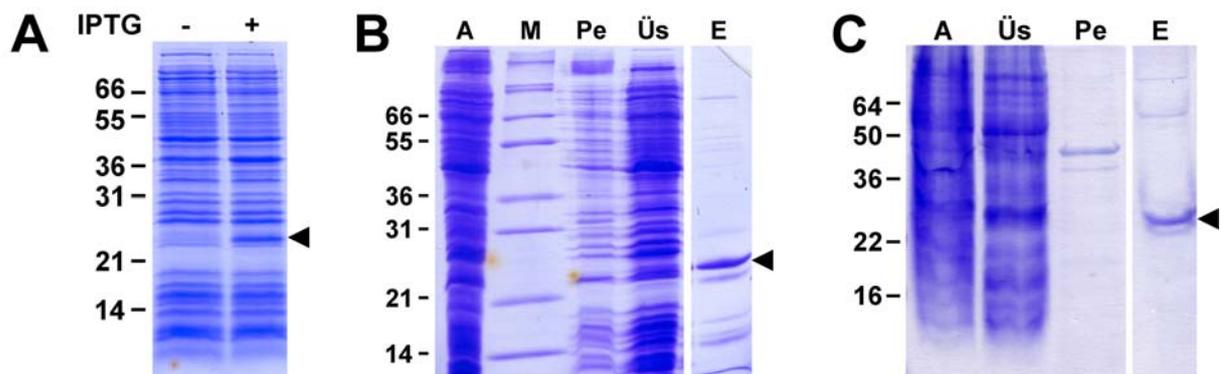


Abb. 3.21: **A**, Expression von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ mit C-terminalem His6-Epitop in *E. coli* BL21(DE3)RIL. **B**, Reinigung von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ und **C**, Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ C128S durch IMAC. A, Aufschluss; M, Standard; Pe, Pellet; Üs, Überstand; E, Eluat.

Das gereinigte Protein wurde durch MALDI-TOF analysiert. Im MS-Spektrum von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ (**Abb. 3.22**) ist als intensivstes Signal eine Masse von 18807,94 Da zu erkennen. Diese Masse entspricht dem berechneten Molekulargewicht (Abweichung 1,00 Da). Zudem zeigt das Spektrum einige weitere Signale zwischen 17 und 20 kDa. Diese entsprechen N-terminalem Abbau-Fragmenten von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃. Unter Nutzung dieser Signale war eine N-terminale Protein-Sequenzierung möglich (**Tab. 3.2**). Bei der Masse 19017,47 Da handelt es sich mutmaßlich um das Matrix-Addukt von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃. Um 9000 Da sind die eben beschriebenen Fragmente noch einmal mit zweifacher Ladung zu sehen.

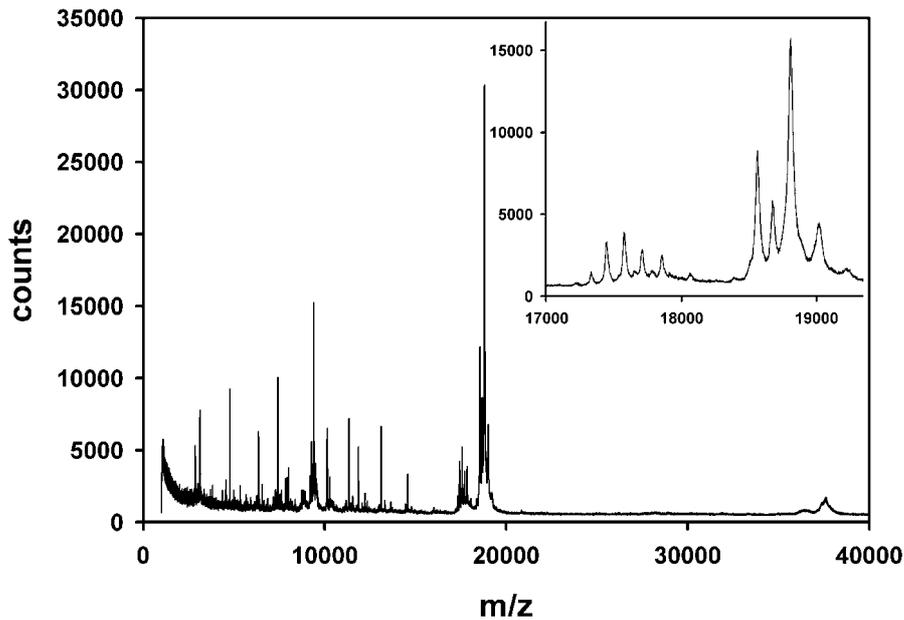


Abb. 3.22: Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ (C_{128S}) im MALDI-TOF. Matrix war Sinapin-Säure.

Die für die weiteren Studien verwendeten Präparationen von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ enthalten zum größten Teil das Protein in seiner vollen Länge. Zu einem geringeren Teil sind Protein-Spezies vorhanden, die um maximal 14 Aminosäuren N-terminal verkürzt sind. Somit konnte das N-terminale Fragment Leu₂₇ bis Gly₁₈₃ von Maus-DYRK 3 mit C-terminaler His₈-Fusion exprimiert und gereinigt werden. Dieses Protein wurde im Folgenden biophysikalisch charakterisiert.

Tab. 3.2: MALDI-TOF Fragmente von Maus-DYRK 3₂₇₋₁₈₃ (C_{128S})

m/z (Da)	Sequenz	berechnetes MW	Differenz
19017,47	MW + SA		
18807,94	Met (MW)	18806,94	1,00
18675,72	Leu	18675,74	-0,02
18562,17	Gly	18562,59	-0,42
(Asp, Gly, Val, Tyr, Asp, Thr)			
17855,06	Phe	17854,89	0,17
17706,82	Met	17707,71	-0,89
17575,63	Met	17576,52	-0,89
17444,82	Ile	17445,33	-0,51
17330,94	Asp	17332,17	-1,23
17218,00	Glu	17217,08	0,92

224,07 Da = Mol-Masse der Matrix Sinapin-Säure (SA)

3.4.4 Im CD zeigt Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ einen geringen Anteil an Sekundärstruktur

Zur Analyse der Sekundärstruktur wurde das über IMAC und Anionenaustausch-Chromatographie gereinigte Protein Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ (C_{128S}) mit C-terminalem His-Tag mittels Fern-CD-Spektroskopie untersucht. Das Spektrum dieses Proteins in 50 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 6,5) ist durch ein Minimum an Elliptizität bei 200 nm sowie ein Plateau zwischen 215 und 225 nm gekennzeichnet (**Abb. 3.23**, geschlossene Kreise). Die CD-Spektren von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ und Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ C_{128S} waren identisch.

Die Auswertung dieses Spektrums mit dem Programm Jasco Secondary Structure Estimation 1.0 ergab einen Sekundärstruktur-Anteil von 47% beta-Faltblatt, 7% beta-Turn und 45% *Random Coil*. Diese Angaben können jedoch nur grobe Näherungen sein, da das daraus berechnete Referenzspektrum (Linie in **Abb. 3.23**) merklich von den Messdaten abweicht. Zudem vernachlässigt dieses Programm den Anteil an Poly-Prolin-II-Helices (PPII). Gerade in flexiblen Peptiden oder Proteinen ist dies ein in den letzten Jahren zunehmend häufiger beschriebenes Sekundärstruktur-Element (Bhatnagar und Gough, 1996).

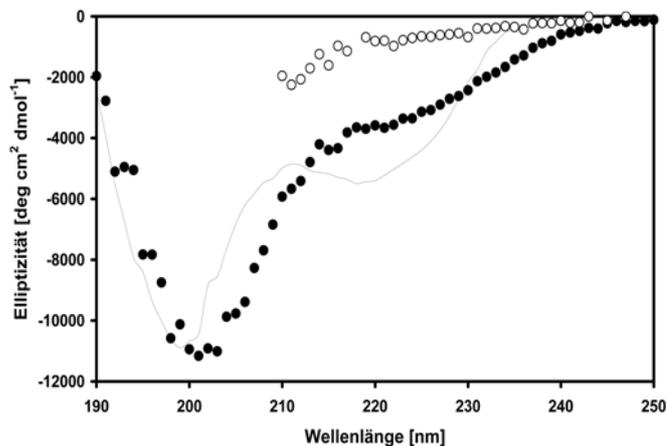


Abb. 3.23: DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ (C_{128S}) aus Maus im CD-Spektrum. Aufgenommen in 50 mM K-Phosphat, pH 6,5 (●) oder 50 mM K-Phosphat, pH 6,5, 6 M Gdm-Cl (○). Die Linie entspricht einem Spektrum mit 47% beta-Faltblatt, 7% beta-Turn und 45% *Random Coil* (Jasco Secondary Structure Estimation 1.0).

Poly-Prolin-II-Helices weisen ebenso wie *Random Coil*-Bereiche ein deutliches Minimum an Elliptizität bei 200 nm auf. Zusätzlich zeigen PPII-Peptide ein schwaches Maximum an Elliptizität um 215 nm (Bochicchio und Tamburro, 2002). Somit enthält Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ (C_{128S}) Bereiche in *Random Coil*, PPII-Abschnitte und eventuell auch einen geringen beta-Faltblatt-Anteil. Diese Sekundär-Struktur-Elemente können durch 6 M Gdm-Cl entfaltet werden (offene Kreise in **Abb. 3.23**).

Laut CD-Spektroskopie enthält Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ (C_{128S}) unstrukturierte Bereiche, jedoch auch Anteile von Sekundärstruktur-Elementen, die durch Gdm-Cl entfaltet werden können. Ob diese Elemente sich auch zu einer globulären Struktur zusammen lagern, wurde im Folgenden durch limitierte Proteolyse untersucht.

3.4.5 Die limitierte Proteolyse von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ ergibt kleinere Fragmente

Die limitierte Proteolyse stellt eine schnelle und einfache Methode zur Analyse der räumlichen Struktur eines Proteins dar. Bei limitierenden Mengen der Protease erfolgt zunächst die Spaltung des Proteins an exponierten Stellen wie *Random Coil*- oder *Loop*-Regionen, globuläre Bereiche werden erst später oder bei höheren Konzentrationen an Protease verdaut. Somit deuten bei der limitierten Proteolyse entstehende Fragmente auf globuläre Bereiche hin (Polverino de Laureto et al., 1999).

Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ wurde einer limitierten Proteolyse durch Trypsin unterworfen (siehe **Material und Methoden 2.7.6**). Hierbei wurde die Trypsin-Konzentration bei gleich bleibender Inkubationszeit gesteigert. Durch Zugabe eines zehnfachen Überschusses an Trypsin-Inhibitor aus Soja wurde die Reaktion gestoppt. In **Abb. 3.24** ist die Analyse dieser Reaktionsansätze mittels Tris-Tricin-SDS-PAGE zu sehen.

Bei Inkubation von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ mit geringer Trypsin-Menge ist noch ein Teil des ursprünglichen Proteins zu sehen (siehe Pfeilspitze in **Abb. 3.24**). Mit zunehmender Trypsin-Konzentration sind drei Fragmente mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 15, 12 und 9 kDa zu erkennen. Die Intensität der Bande, die dem ursprünglich eingesetzten Protein entspricht, nimmt schon bei einem 1 : 1000-Verhältnis von Trypsin zum Substrat deutlich ab, diese Bande ist jedoch bis zu einem 1 : 400-Verhältnis sichtbar. Auch die Intensität der Banden für die größeren Spaltprodukte verringert sich bei steigender Trypsin-Konzentration. Einzig das Fragment bei 9 kDa ist noch deutlich bei hoher Trypsin-Konzentration zu sehen (1 : 200 Trypsin/Substrat, teils auch bei 1 : 100). Die in diesen Ansätzen sichtbare Bande bei 20 kDa stammt vom Trypsin-Inhibitor aus Soja, mit dem die Reaktion gestoppt wurde. Ein ähnliches Banden-Muster wurde auch beim limitierten proteolytischen Verdau durch die Protease Papain beobachtet.

Die Banden bei 15, 12 und 9 kDa wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Durch N-terminale Protein-Sequenzierung konnte der Beginn der Fragmente nicht bestimmt werden. Das eingesandte Protein, das auf eine PVDF-Membran übertragen war, war wahrscheinlich N-terminal blockiert. Durch MALDI-Fingerprinting konnten jedoch alle drei Banden als Teile des N-Terminus von DYRK 3 identifiziert werden.

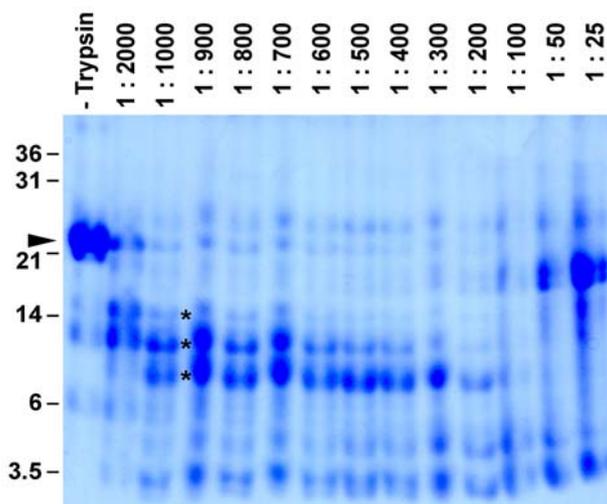


Abb. 3.24: Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃-His8 wurde mit Trypsin in den angegebenen molaren Verhältnissen gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion mit zehnfachem Überschuss an Trypsin-Inhibitor abgestoppt, gefällt und im 15%igen Tris-Tricin-Gel analysiert. Die Pfeilspitze markiert das ursprüngliche Protein, die mit * gekennzeichneten Banden zeigen ein apparentes Molekulargewicht von etwa 15, 12 und 9 kDa.

Die Protease Trypsin spaltet die Polypeptidkette N-terminal vor positiv geladenen Arginin- und Lysin-Resten. 18 positiv geladene Reste sind in der Aminosäure-Sequenz von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ vorhanden, der größte Bereich ohne positiv geladene Seitenketten erstreckt sich über 18 Aminosäuren. Einzig durch die Primär-Sequenz können die beobachteten Fragmente also nicht erklärt werden.

Bei der limitierten Proteolyse des DYRK 3-N-Terminus waren Fragmente des Proteins zu beobachten. Diese wurden jedoch ebenfalls bei höheren Konzentrationen an Protease verdaut. Somit bildet dieser Teil von DYRK 3 keinen stabilen globulären Bereich, durch einige lokale Wechselwirkungen wird dagegen ein Teil des Proteins anfangs vor der Einwirkung der Protease geschützt. Sowohl bei der Analyse durch CD als auch bei der limitierten Proteolyse gab es Hinweise auf strukturierte Bereiche bzw. Teilstrukturen innerhalb des N-Terminus von DYRK 3. Um die Struktur dieses Proteinteils abschließend zu beschreiben, wurde der DYRK 3-N-Terminus nun mittels NMR analysiert.

3.4.6 NMR-Analyse von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃

Bei der Kernspinresonanz werden die Resonanzsignale einzelner NMR-aktiver Kerne detektiert. Die chemische Verschiebung dieser Kerne ist sehr empfindlich gegenüber der Umgebung. Ein ¹⁵N-HSQC-Spektrum eines Proteins kann deshalb zur Beurteilung der räumlichen Struktur genutzt werden. Besonders innerhalb des hydrophoben Kerns einer globulären Domäne kommt es zu einer starken Aufspaltung der chemischen Verschiebungen. Nach den Hinweisen auf einen bestimmten Gehalt an Struktur durch CD und limitierte Proteolyse sollte deshalb der N-Terminus von DYRK 3 mittels NMR untersucht werden.

Hierfür wurde ¹⁵N-markiertes Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ mit C-terminalem His8-Tag exprimiert und wie in **Abschnitt 3.4.3** gereinigt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem Varian-NMR-Spektrometer bei einer Protonen-Resonanzfrequenz von 600 MHz (siehe **Material und Methoden 2.11**). Während der Messung aggregierte ein Teil des Proteins.

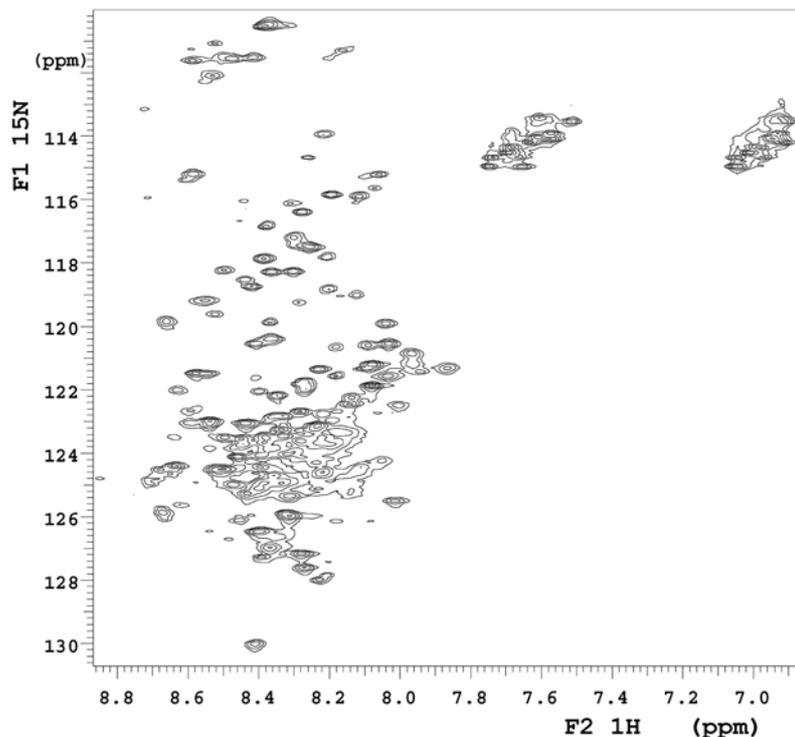


Abb. 3.25: ¹⁵N-HSQC-Spektrum von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃.
50 μM Protein in 50 mM K-Phosphat, pH 6,5,
1 mM DTT, 10% ²H₂O.

In **Abb. 3.25** ist ein Ausschnitt des ¹⁵N-HSQC-Spektrums von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ mit C-terminalem His8-Tag dargestellt. In diesem Spektrum sind zahlreiche Resonanzen im ¹H-Bereich zwischen 7,8 und 8,8 ppm sowie 114 bis 130 ppm auf der ¹⁵N-Skala zu sehen. Dies ist die für *Random Coil*

charakteristische Region (Wüthrich, 1986). In diesem Bereich sind etwa 105 einzeln aufgelöste Resonanzen erkennbar. Das untersuchte Konstrukt des DYRK 3-N-Terminus umfasst jedoch 168 Aminosäuren. Die fehlenden Aminosäuren sind entweder mit anderen Resonanzen überlagert oder aber in der NMR nicht sichtbar.

Neben diesen Resonanzen enthält das ^{15}N -HSQC-Spektrum von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ noch weitere Signale. Jene um 114 ppm auf der ^{15}N -Skala und 7,0 sowie 7,6 ppm im ^1H -Bereich stammen von den Stickstoff enthaltenden Seitenketten der Glutamine und Asparagine. Die Resonanzen zwischen 110 und 114 ppm stammen vorwiegend von Glycin- und Serin-Resten.

Von den NMR-Daten kann abgeschätzt werden, dass mindestens 63% der Aminosäuren von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ ungeordnet vorliegen (dies entspricht der Anzahl der sichtbaren Resonanzen). Wegen möglicher Überlagerung weiterer Resonanzen kann der Anteil von Resten in *Random Coil* allerdings auch höher liegen. Deshalb können in dem isolierten Fragment Leu27 bis Gly183 des DYRK 3-Proteins aus Maus ternäre Kontakte im stabilen hydrophoben Kern einer globulären Domäne ausgeschlossen werden.

3.4.7 Weitere N-terminale Fragmente von DYRK 3

CD-Spektren und limitierte Proteolyse von Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ deuten auf einen bestimmten Gehalt an beta-Faltblatt und PPII-Helix hin. Zur genaueren Definition dieser Bereiche lokaler Struktur wurden deshalb weitere Teile des N-Terminus subkloniert und in *E. coli* exprimiert. Diese zeigten jedoch im Vergleich zu Maus-DYRK 3-L₂₇₋₁₈₃ keinen erhöhten Anteil an Sekundärstruktur (in **Tab. 8.5** zusammengefasst). Alle untersuchten Fragmente waren in den verwendeten Puffern zum größten Teil ungeordnet, obwohl sie in *E. coli* exprimiert werden konnten.

Somit ist ein großer N-terminaler Teil der Kinase DYRK 3 flexibel bzw. in Lösung unstrukturiert, obwohl er die Verankerung des Proteins im Cytoplasma und die Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor STAT 5A vermittelt.

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) mit der Sequenz $^{153}\text{PNAKKRH}^{159}$ 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-S₁₋₁₆₃ 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-S₁₋₁₆₃-GFP oder DYRK 3-S₁₆₄₋₅₆₈-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-S₁₋₁₆₃-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 PS⁷²⁷MP-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^{780/779P} 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.

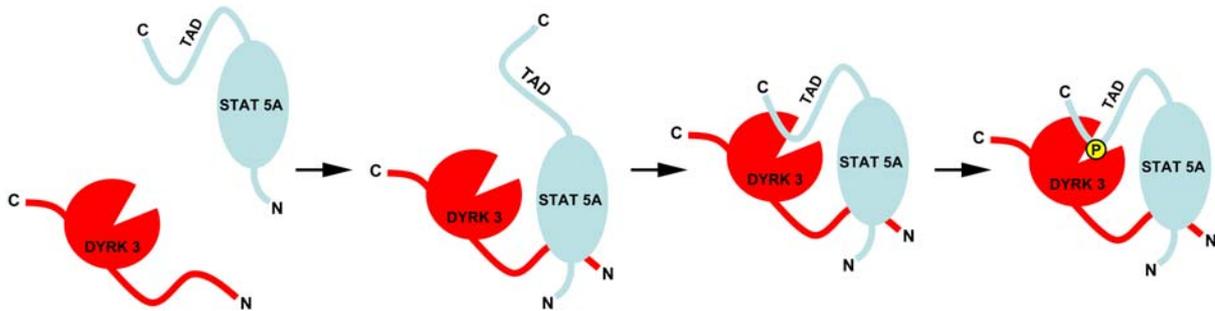


Abb. 4.1: Modell der Wechselwirkung zwischen DYRK 3 und STAT 5A. DYRK 3 ist in Rot dargestellt, STAT 5A in Blau. TAD, Transaktivierungsdomäne; P, Phosphat.

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-L₂₇₋₁₈₄ 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 Immuno-präzipitation) 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.

5 Zusammenfassung

Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 3 (DYRK 3) zählt zur Kinase-Familie der DYRK-Proteine, die eine Rolle bei Wachstum und Entwicklung spielen. DYRK 3 fungiert hier als für die erythroide Linie spezifischer Inhibitor der Entwicklung von roten Blutzellen. Diese Funktion wurde sowohl für das humane als auch das Maus-Protein gezeigt. DYRK 3 enthält eine zentrale Kinase-Domäne gemeinsam mit 20 Aminosäuren, die einzig bei Kinasen der DYRK-Familie konserviert sind (DH-Box). Zudem enthält das Protein einen kurzen C-Terminus sowie eine ausgedehnte N-terminale Domäne mit bisher unbekannter Funktion. (Diese enthält 184 bzw. 164 Aminosäuren in den Isoformen DYRK 3-L und S.) Bisher ist die Funktion von DYRK 3 nur wenig verstanden.

Um DYRK 3 innerhalb der Zelle zu lokalisieren, wurden verschiedene Säugetier-Zellen mit Fusionen aus DYRK 3 und GFP oder FLAG-Tag transfiziert. Durch Fluoreszenz-Mikroskopie und Zell-Fraktionierung konnte gezeigt werden, dass sich DYRK 3-S sowohl im Cytoplasma als auch im Kern von HEK-293-Zellen befindet. GFP-DYRK 3-S kann mit 91,4 kDa nicht mehr durch einfache Diffusion in den Kern gelangen. Das Protein muss also in der Lage sein, aktiv zwischen Cytoplasma und Zellkern hin und her zu wandern (*Shuttling*).

Im Gegensatz dazu wurde DYRK 3 mit C-terminalem GFP oder N-terminalem FLAG-Epitop in HEK-293-Zellen vom Kern ausgeschlossen. Nach Deletion des N-Terminus bis zum Beginn der DH-Box befand sich auch DYRK 3-S₁₆₄₋₅₆₈-GFP sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Der isolierte N-Terminus mit C-terminalem GFP wurde in einem Teil der Zellen vom Kern ausgeschlossen. Der Ausschluss von Zellkern war bei DYRK 3-S-GFP auch in HEP-G2-Zellen, jedoch nicht in LLC-PK1- oder COS-7-Zellen zu beobachten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass DYRK 3 innerhalb der N-terminalen Domäne Zelltyp-spezifisch im Cytosol verankert wird.

Zur Identifizierung von Wechselwirkungspartnern wurden *Yeast-Two-Hybrid-Screens* mit DYRK 3 als *Bait* durchgeführt. Einer der Klone, der mit DYRK 3

interagiert, war STAT 5A. Innerhalb des Hefe-Systems konnte der STAT 5A-bindende Teil von DYRK 3 erfolgreich eingegrenzt werden. 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 so identifizierte Bindungsdomäne beinhaltet die gleichen C-terminalen Aminosäuren wie jenes DYRK 3-Fragment, das die Verankerung der Kinase im Cytoplasma bewirkt.

Diese Bindungsdomäne von Maus-DYRK 3 wurde in *E. coli* als lösliches Protein exprimiert und biophysikalisch untersucht. Hierbei deuteten Analysen mittels CD-Spektroskopie und limitierter Proteolyse auf einen geringen Anteil an beta-Faltblatt und Poly-Prolin-II-Helix hin. Die Untersuchung dieses Protein-Fragments durch ¹⁵N-NMR-Spektroskopie zeigte jedoch, dass der N-Terminus von DYRK 3 zum großen Teil flexibel in Lösung vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Hinweise für das *Shuttling* eines DYRK-Proteins in Säugetier-Zellen beschrieben. Darüber hinaus konnte der bisher nicht untersuchte N-Terminus von DYRK 3 für die Verankerung der Kinase im Cytosol und für die Interaktion mit dem möglichen Substrat STAT 5A verantwortlich gemacht werden. Bei der biophysikalischen Analyse dieser Bindedomäne erwies sie sich allerdings in Lösung als flexibel oder ungeordnet. Der N-Terminus von DYRK 3 ist also für die Interaktion mit anderen Proteinen von Bedeutung und beeinflusst die subzelluläre Lokalisierung von DYRK 3.

6 Summary

Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 3 (DYRK 3) is a member of the DYRK family of serine/threonine protein kinases implied in growth and developmental regulation. Within the haematopoietic system, DYRK 3 plays a unique role among the DYRK family members as line specific suppressor of red blood cell development in man and mouse. DYRK 3 consists of a central kinase domain with an associated 20 N-terminal amino acids only conserved within the DYRK family of protein kinases (DH box), a short C-terminal part and a large amino acids spanning N-terminal domain with unknown function (184 or 164 amino acids in DYRK 3-Long (L) and Short (S), respectively). However, DYRK 3 action is still poorly understood.

To localize DYRK 3 within the cell, protein fusions with GFP or FLAG tag were transiently transfected into different mammalian cell lines. By fluorescence microscopy and cell fractionation studies DYRK 3-S with N-terminal GFP fusion was shown to be present within the cytosol and the nucleus. As the GFP-DYRK 3-S fusion would be restricted to the cytosol simply by its size of 91.4 kDa, the protein has to be able to shuttle between cytosol and nucleus.

In Contrast, a fusion of DYRK 3 with C-terminal GFP or N-terminal FLAG tag was excluded from the nucleus of HEK 293 cells. Deletion of the N-terminal domain up to the start of the DH box caused the protein DYRK 3-S₁₆₄₋₅₆₈-GFP to shuttle again. The N-terminal domain with C-terminal GFP tag was excluded from the nucleus in many of the cells. Exclusion of DYRK 3-S-GFP was also clearly seen in HEP-G2 cells but not in LLC-PK1 or COS-7 cells. These findings can be explained by cell type specific cytosolic anchorage of DYRK 3 via its N-terminus.

Yeast two-hybrid screens were performed to identify interacting partners of DYRK 3. Among others, one DYRK 3 interacting candidate was STAT 5A. The interaction of DYRK 3 with STAT 5A was dissected using the yeast system. Not only was the kinase activity of DYRK 3 dispensable for this interaction, but the N-terminal fragment from Leu27 to Gly184 of DYRK 3-L was

sufficient for an interaction with STAT 5A. This binding domain includes the same C-terminal end as the DYRK 3 fragment causing cytoplasmic anchorage of DYRK 3-S.

This binding domain of mouse DYRK 3 was then expressed in *E. coli* as soluble protein and characterized biophysically. Although CD and limited proteolysis studies suggested a certain content of beta sheet and poly proline II helix, the protein was shown to be flexible to a large extent by ^{15}N NMR spectrometry.

This is the first description of a mammalian DYRK protein to shuttle between nucleus and cytosol. In addition, the individual N-terminal part of DYRK 3 caused cytoplasmic anchorage of DYRK 3 and was sufficient for the interaction with STAT 5 although this binding domain was unstructured in solution. Taken together, the N-terminal part of DYRK 3 is responsible for protein-protein interactions and influences the subcellular localization of DYRK 3.

7 Referenzen

- Adachi, M., Fukuda, M., und Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J.* 18, 5347-5358.
- Adachi, M., Fukuda, M., und Nishida, E. (2000). Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148, 849-856.
- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., und Knowles, B.B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-616.
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., Oset, M., Gonzalez, J.R., Florez, J., Fillat, C., und Estivill, X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1915-1923.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol Biol* 215, 403-410.
- Altschul, S.F. und Koonin, E.V. (1998). Iterated profile searches with PSI-BLAST--a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem. Sci.* 23, 444-447.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Alvarez, M., Estivill, X., und de la, L.S. (2003). DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *J. Cell Sci.* 116, 3099-3107.
- Anholt, R.R., Lyman, R.F., und Mackay, T.F. (1996). Effects of single P-element insertions on olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 143, 293-300.
- Arnold, U. und Ulbrich-Hofmann, R. (1999). Quantitative Protein Precipitation from Guanidine Hydrochloride-Containing Solutions by Sodium Deoxycholate/Trichloroacetic Acid. *Anal. Biochem.* 271, 197-199.
- Bähler, J. und Nurse, P. (2001). Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *EMBO J.* 20, 1064-1073.
- Bähler, J. und Pringle, J.R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.* 12, 1356-1370.
- Bairoch, A. und Apweiler, R. (1997). The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL. *Nucleic Acids Res.* 25, 31-36.
- Becker, W. und Joost, H.G. (1999). Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 1-17.
- Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eirmbter, K., Tejedor, F.J., und Joost, H.G. (1998). Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity

- of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J. Biol. Chem.* *273*, 25893-25902.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., und Wheeler, D.L. (2001). GenBank. *Nucleic Acids Res.* *30*, 17-20.
- Beuvink, I., Hess, D., Flotow, H., Hofsteenge, J., Groner, B., und Hynes, N.E. (2000). Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland, and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated in vitro DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* *275*, 10247-10255.
- Bhatnagar, R.S. and Gough, C.A. (1996). CD of Collagen and Related Polypeptides. In *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, G.D. Fasman, ed. (New York: Plenum Press), pp. 183-200.
- Blom, N., Gammeltoft, S., und Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol Biol* *294*, 1351-1362.
- Bohicchio, B. und Tamburro, A.M. (2002). Polyproline II Structure in Proteins: Identification by Chiroptical Spectroscopies, Stability, and Functions. *Chirality* *14*, 782-792.
- Boer, A.-K., Drayer, A.L., Rui, H., und Vellenga, E. (2002). Prostaglandin-E2 enhances EPO-mediated STAT5 transcriptional activity by serine phosphorylation of CREB. *Blood* *100*, 467-473.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.
- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., und Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.* *18*, 664-674.
- Campbell, L.E. und Proud, C.G. (2002). Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS Lett.* *510*, 31-36.
- Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., und Goldsmith, E.J. (1997). Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK2 by Dual Phosphorylation. *Cell* *90*, 859-869.
- Cantor, A.B. und Orkin, S.H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* *21*, 3368-3376.
- Cesareni, G., Panni, S., Nardelli, G., und Castagnoli, L. (2002). Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS Lett.* *513*, 38-44.
- Chang, F. und Peter, M. (2003). Yeasts make their mark. *Nat. Cell Biol.* *5*, 294-299.
- Chen, H. und Antonarakis, S.E. (1997). Localisation of a human homologue of the *Drosophila* *mnf* and rat *Dyrk* genes to chromosome 21q22.2. *Hum. Genet.* *99*, 262-265.
- Chen-Hwang, M.C., Chen, H.R., Elzinga, M., und Hwang, Y.W. (2002). Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J. Biol. Chem.* *277*, 17597-17604.
- Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (2000). Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 7-9.
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 596-601.

- Colledge, M. und Scott, J.D. (1999). AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* 9, 216-221.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., und Deléage, G. (2000). NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25, 147-150.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., und Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Dalbey, R.E. and von Heijne, G. (2002). *Protein Targeting, Transport and Translocation.* (Amsterdam: Academic Press).
- Dasso, M. (2002). The Ran GTPase: theme and variations. *Curr. Biol* 12, R502-R508.
- de Cárcer, G., do Carmo Avides, M., José Lallena, M., Glover, D.M., und González, C. (2001). Requirement of Hsp90 for centrosomal function reflects its regulation of Polo kinase stability. *EMBO J.* 20, 2878-2884.
- De Graaf, K., Hekerman, P., Spelten, O., Herrmann, A., Packman, L.C., Bussow, K., Muller-Newen, G., und Becker, W. (2004). Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors. *J. Biol. Chem.* 279, 4612-4624.
- Decker, T. und Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628-2637.
- Deng, X., Ewton, D.Z., Pawlikowski, B., Maimone, M., und Friedman, E. (2003). Mirk/dyrk1B is a Rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 41347-41354.
- Deng, X., Mercer, S.E., Shah, S., Ewton, D.Z., und Friedman, E. (2004). The CDK Inhibitor p27kip1 is stabilized in G0 by Mirk/dyrk1B kinase. *J. Biol. Chem.*
- Drees, B.L. (1999). Progress and variations in two-hybrid and three-hybrid technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 64-70.
- Eblen, S.T., Catling, A.D., Assanah, M.C., und Weber, M.J. (2001). Biochemical and biological functions of the N-terminal, noncatalytic domain of extracellular signal-regulated kinase 2. *Mol Cell Biol* 21, 249-259.
- Engelhardt, O.G., Boutell, C., Orr, A., Ullrich, E., Haller, O., und Everett, R.D. (2003). The homeodomain-interacting kinase PKM (HIPK-2) modifies ND10 through both its kinase domain and a SUMO-1 interaction motif and alters the posttranslational modification of PML. *Exp. Cell Res.* 283, 36-50.
- Ewton, D.Z., Lee, K., Deng, X., Lim, S., und Friedman, E. (2003). Rapid turnover of cell-cycle regulators found in Mirk/dyrk1B transfectants. *Int. J. Cancer* 103, 21-28.
- Farooq, A., Chaturvedi, G., Mujtaba, S., Plotnikova, O., Zeng, L., Dhalluin, C., Ashton, R., und Zhou, M.M. (2001). Solution structure of ERK2 binding domain of MAPK phosphatase MKP-3: structural insights into MKP-3 activation by ERK2. *Mol Cell* 7, 387-399.
- Feliciello, A., Gottesman, M.E., und Avvedimento, E.V. (2001). The Biological Functions of A-Kinase Anchor Proteins. *J. Mol Biol* 308, 99-114.
- Ferl, R.J., Manak, M.S., und Reyes, M.F. (2002). The 14-3-3s. *Genome Biol* 3, reviews3010.1-3010.7.
- Fields, S. und Song, O.K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

- Fisher, J.W. (2003). Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update. *Exp. Biol. Med.* 228, 1-14.
- Fletcher, C.M. und Wagner, G. (1998). The interaction of eIF4E with 4E-BP1 is an induced fit to a completely disordered protein. *Protein Sci.* 7, 1639-1642.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcantara, S., Martinez, S., Marti, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., und Arbones, M.L. (2002). Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell Biol.* 22, 6636-6647.
- Fukuda, M., Gotoh, Y., und Nishida, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.* 16, 1901-1908.
- Funakoshi, E., Hori, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Kudoh, J., Shimizu, N., und Ito, F. (2003). Overexpression of the human MNB/DYRK1A gene induces formation of multinucleate cells through overduplication of the centrosome. *BMC. Cell Biol.* 4, 12.
- Furebring, C., Ohlin, M., Pettersson, S., und Borrebaeck, C.A. (1997). Evaluation of novel control elements by construction of eukaryotic expression vectors. *Gene* 188, 191-198.
- Furuno, T., Hirashima, N., Onizawa, S., Sagiya, N., und Nakanishi, M. (2001). Nuclear shuttling of mitogen-activated protein (MAP) kinase (extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2) was dynamically controlled by MAP/ERK kinase after antigen stimulation in RBL-2H3 cells. *J Immunol.* 166, 4416-4421.
- Garrett, S. und Broach, J. (1989). Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 3, 1336-1348.
- Garrett, S., Menold, M.M., und Broach, J.R. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol Cell Biol* 11, 4045-4052.
- Geiger, J.N., Knudsen, G.T., Panek, L., Pandit, A.K., Yoder, M.D., Lord, K.A., Creasy, C.L., Burns, B.M., Gaines, P., Dillon, S.B., und Wojchowski, D.M. (2001). mDYRK3 kinase is expressed selectively in late erythroid progenitor cells and attenuates colony-forming unit-erythroid development. *Blood* 97, 901-910.
- Goettsch, S. und Bayer, P. (2002). Structural attributes in the conjugation of ubiquitin, SUMO and RUB to protein substrates. *Front Biosci.* 7, a148-a162.
- Gopaul, D.N., Guo, F., und van Duyne, G.D. (1998). Structure of the holliday junction intermediate in cre-loxp site-specific recombination. *EMBO J.* 17, 4175.
- Görg, A. und Westermeier, R. (1998). Elektrophoretische Verfahren. In Bioanalytik, F.Lottspeich and H.Zorbas, eds. (Heidelberg, Berlin: Spektrum Verlag), pp. 217-252.
- Griffioen, G., Branduardi, P., Ballarini, A., Anghileri, P., Norbeck, J., Baroni, M.D., und Ruis, H. (2001). Nucleocytoplasmic Distribution of Budding Yeast Protein Kinase A Regulatory Subunit Bcy1 Requires Zds1 and Is Regulated by Yak1-Dependent Phosphorylation of Its Targeting Domain. *Mol Cell Biol* 21, 511-523.
- Griswold, K.E., Mahmood, N.A., Iverson, B.L., und Georgiou, G. (2003). Effects of codon usage vs. putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Protein Expr. Purif.* 27, 134-142.

- Groote-Bidlingmaier, F., Schmoll, D., Orth, H.M., Joost, H.G., Becker, W., und Barthel, A. (2003). DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 764-769.
- Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A.M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., und Pritchard, M.A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1305-1310.
- Gunasekaran, K., Tsai, C.-J., Kumar, S., Zanuy, D., und Nussinov, R. (2003). Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. *Trends Biochem. Sci.* 28, 81-85.
- Gupta, R., Brunak, S., und Hansen, J. (2003). Identifying intracellular O-(beta)-GlcNAc 'yin-yang' switches in the available human proteome. www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., und Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* 22, in Press.
- Guthrie, C. and Fink, G.R. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods Enzymol.* 194. (London: Academic Press).
- Hammerle, B., Carnicero, A., Elizalde, C., Ceron, J., Martinez, S., und Tejedor, F.J. (2003a). Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2277-2286.
- Hammerle, B., Colonques, J., Vera, E., Chulia, J., und Tejedor, F.J. (2003b). Bases moleculares de las neuropatologías del síndrome de Down: implicación del gen *Minibrain*. *Mapfre Medicina* 14, 58-64.
- Hanks, S.K. und Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576-596.
- Hanks, S.K. und Quinn, A.M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* 200, 38-62.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., und Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Haq, R., Halupa, A., Beattie, B.K., Mason, J.M., Zanke, B.W., und Barber, D.L. (2002). Regulation of Erythropoietin-induced STAT Serine Phosphorylation by Distinct Mitogen-activated Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* 277, 17359-17366.
- Himpel, S., Panzer, P., Eirnbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L.C., Blundell, T., Kentrup, H., Grotzinger, J., Joost, H.G., und Becker, W. (2001). Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. J.* 359, 497-505.
- Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H.G., und Becker, W. (2000). Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2431-2438.
- Horton, P. und Nakai, K. (1997). Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 5, 147-152.

- Horvath, C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* 25, 496-502.
- Huh, W. und et al. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Hunter, T. und Plowman, G.D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* 22, 18-22.
- Johnson, G. (2002). Signal transduction. Scaffolding proteins--more than meets the eye. *Science* 295, 1249-1250.
- Kakhniashvili, D.G., Chaudhary, T., Zimmer, W.E., Bencsath, F.A., Jardine, I., und Goodman, S.R. (2001). Erythrocyte spectrin is an E2 ubiquitin conjugating enzyme. *Biochemistry* 40, 11630-11642.
- Karandikar, M. und Cobb, M.H. (1999). Scaffolding and protein interactions in MAP kinase modules. *Cell Calcium* 26, 219-226.
- Kassis, S., Melhuish, T., Annan, R.S., Chen, S.L., Lee, J.C., Livi, G.P., und Creasy, C.L. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* Yak1p protein kinase autophosphorylates on tyrosine residues and phosphorylates myelin basic protein on a C-terminal serine residue. *Biochem. J.* 348, 263-272.
- Kay, L.E., Keifer, P., und Saarinen, T. (1992). Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10663-10665.
- Kelley, L.A., MacCallum, R.M., und Sternberg, M.J. (2000). Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM. *J. Mol Biol* 299, 499-520.
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schurmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., und Joost, H.G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J. Biol. Chem.* 271, 3488-3495.
- Kentrup, H., Joost, H.G., Heimann, G., und Becker, W. (2000). [Minibrain/DYRK1A gene: candidate gene for mental retardation in Down's syndrome?]. *Klin. Padiatr.* 212, 60-63.
- Kipping, M., Zarnt, T., Kiessig, S., Reimer, U., Fischer, G., und Bayer, P. (2001). Increased Backbone Flexibility in Threonine45-Phosphorylated Hirudin upon pH Change. *Biochemistry* 40, 7957-7963.
- Kirken, R.A., Malabarba, M.G., Xu, J., Liu, X., Farrar, W.L., Hennighausen, L., Lerner, A.C., Grimley, P.M., und Rui, H. (1997). Prolactin stimulates serine/tyrosine phosphorylation and formation of heterocomplexes of multiple Stat5 isoforms in Nb2 lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 14098-14103.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., und Schindler, C.W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1-24.
- Kleene, K.C. (2001). A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mechanisms of Development* 106, 3-23.
- Kliemann, M., Rattenholl, A., Golbik, R., Balbach, J., Lilie, H., Rudolph, R., und Schwarz, E. (2004). The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett.* in press.

- Knowles, B.B., Howe, C.C., und Aden, D.P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.
- Komeili, A. und O'Shea, E.K. (2001). New perspectives on nuclear transport. *Annu. Rev. Genet.* 35, 341-364.
- Koon, N., Schneider-Stock, R., Sarlomo-Rikala, M., Lasota, J., Smolkin, M., Petroni, G., Zaika, A., Boltze, C., Meyer, F., Andersson, L., Knuutila, S., Miettinen, M., und El Rifai, W. (2004). Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours. *Gut* 53, 235-240.
- Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J., und Laz, T.M. (2002). Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol* 3, RESEARCH0043.
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* 108, 229-241.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234, 187-208.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., und Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 9112-9117.
- Kuersten, S., Ohno, M., und Mattaj, I.W. (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol* 11, 497-503.
- Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.-H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S., und Snyder, M. (2002). Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* 16, 707-719.
- Kyshe-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-207.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lauf, U., Lopez, P., und Falk, M.M. (2001). Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins. *FEBS Lett.* 498, 11-15.
- Leder, S., Czajkowska, H., Maenz, B., De Graaf, K., Barthel, A., Joost, H.G., und Becker, W. (2003). Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties. *Biochem. J.* 372, 881-888.
- Leder, S., Weber, Y., Altafaj, X., Estivill, X., Joost, H.G., und Becker, W. (1999). Cloning and characterization of DYRK1B, a novel member of the DYRK family of protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 474-479.
- Lee, K., Deng, X.B., und Friedman, E. (2000). Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells. *Cancer Research* 60, 3631-3637.
- Letunic, I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P., und Bork, P. (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res.* 32, D142-D144.

- Li, K., Zhao, S., Karur, V., und Wojchowski, D.M. (2002). DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival. *J. Biol. Chem.* 277, 47052-47060.
- Li, X., Romero, P., Rani, M., Dunker, A.K., und Obradovic, Z. (1999). Predicting protein disorder for N-, C-, and internal regions. *Genome Informatics* 10, 30-40.
- Li, X., Zhong, F., und Qi, S. (2003). Modification of pGH cDNA using the first intron and adenovirus-mediated expression in CHO cells. *Chin Med. J. (Engl.)* 116, 1267-1269.
- Lim, S., Jin, K., und Friedman, E. (2002a). Mirk protein kinase is activated by MKK3 and functions as a transcriptional activator of HNF1alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 25040-25046.
- Lim, S., Zou, Y., und Friedman, E. (2002b). The transcriptional activator Mirk/Dyrk1B is sequestered by p38alpha/beta MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 49438-49445.
- Lochhead, P.A., Sibbet, G., Kinstrie, R., Cleghon, T., Rylatt, M., Morrison, D.K., und Cleghon, V. (2003). dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase in *Drosophila*. *Biochem. J.* 374, 381-391.
- Lord, K.A., Creasy, C.L., King, A.G., King, C., Burns, B.M., Lee, J.C., und Dillon, S.B. (2000). REDK, a novel human regulatory erythroid kinase. *Blood* 95, 2838-2846.
- Lottspeich, F. (1998). Proteomanalyse. In *Bioanalytik*, F. Lottspeich and H. Zorbas, eds. (Heidelberg, Berlin: Spektrum Verlag), pp. 815-828.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., und Sudarsanam, S. (2002a). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27, 514-520.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., und Sudarsanam, S. (2002b). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Mao, J.H., Maye, P., Kogerman, P., Tejedor, F.J., Toftgard, R., Xie, W., Wu, G.Q., und Wu, D.Q. (2002). Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35156-35161.
- Martin, S.S., Pulido, E., Chu, V.C., Lechner, T.S., und Baldwin, E.P. (2002). The order of strand exchanges in cre-loxp recombination and its basis suggested by the crystal structure of a cre-loxp holliday junction complex. *J. Mol. Biol.* 319, 107.
- Matsuo, R., Ochiai, W., Nakashima, K., und Taga, T. (2001). A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J. Immunol. Methods* 247, 141-151.
- Matz, M.V., Lukyanov, K.A., und Lukyanov, S.A. (2002). Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *BioEssays* 24, 953-959.
- McBride, K.M. und Reich, N.C. (2003). The Ins and Outs of STAT1 Nuclear Transport. *Sci. STKE*. re13.
- Meyer, T., Begitt, A., Lodige, I., van Rossum, M., und Vinkemeier, U. (2002a). Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J.* 21, 344-354.
- Meyer, T., Gavenis, K., und Vinkemeier, U. (2002b). Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp. Cell Res.* 272, 45-55.

- Miller, C.T., Aggarwal, S., Lin, T.K., Dagenais, S.L., Contreras, J.I., Orringer, M.B., Glover, T.W., Beer, D.G., und Lin, L. (2003). Amplification and overexpression of the dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (DYRK2) gene in esophageal and lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* 63, 4136-4143.
- Miyata, Y. und Nishida, E. (1999). Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 291-295.
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M., und Sakai, A. (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev.* 15, 1217-1228.
- Müller, J.W. (2001). Yeast Two-Hybrid-Wechselwirkungsassays mit regulatorischen Proteinen der hämatopoietischen Signaltransduktion. Diplom-Arbeit, Martin-Luther-Universität.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Muslin, A.J. und Xing, H. (2004). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cellular Signalling* 12, 703-709.
- Nakai, K. und Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 24, 34-36.
- Niccoli, T., Arellano, M., und Nurse, P. (2003). Role of Tea1p, Tea3p and Pom1p in the determination of cell ends in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 20, 1349-1358.
- Niccoli, T. und Nurse, P. (2002). Different mechanisms of cell polarisation in vegetative and shmooing growth in fission yeast. *J. Cell Sci.* 115, 1651-1662.
- O'Shea, J.J., Gadina, M., und Schreiber, R.D. (2002). Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the Jak/Stat Pathway. *Cell* 109, S121-S131.
- Pang, K.M., Ishidate, T., Nakamura, K., Shirayama, M., Trzepacz, C., Schubert, C.M., Priess, J.R., und Mello, C.C. (2004). The minibrain kinase homolog, mbk-2, is required for spindle positioning and asymmetric cell division in early *C. elegans* embryos. *Dev. Biol.* 265, 127-139.
- Park, S.-H., Yamashita, H., Rui, H., und Waxman, D.J. (2001). Serine Phosphorylation of GH-Activated Signal Transducer and Activator of Transcription 5a (STAT5a) and STAT5b: Impact on STAT5 Transcriptional Activity. *Mol. Endocrinol.* 15, 2157-2171.
- Paukku, K. (2003). Regulation of STAT5 Activation. (Helsinki: Helsinki University Biomedical Dissertations No. 35).
- Pellettieri, J., Reinke, V., Kim, S.K., und Seydoux, G. (2003). Coordinate activation of maternal protein degradation during the egg-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev. Cell* 5, 451-462.
- Pesu, M., Takaluoma, K., Aittomaki, S., Lagerstedt, A., Saksela, K., Kovanen, P.E., und Silvennoinen, O. (2000). Interleukin-4-induced transcriptional activation by stat6 involves multiple serine/threonine kinase pathways and serine phosphorylation of stat6. *Blood* 95, 494-502.

- Pettiford, S.M. und Herbst, R. (2003). The protein tyrosine phosphatase HePTP regulates nuclear translocation of ERK2 and can modulate megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Leukemia* 17, 366-378.
- Pichler, A. und Melchior, F. (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic*. 3, 381-387.
- Piotto, M., Saudek, V., und Sklenar, V. (1992). Gradient tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy in aqueous solution. *J. Biomol. NMR* 2, 661-665.
- Pircher, T.J., Petersen, H., Gustafsson, J.A., und Haldosen, L.A. (1999). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5A. *Mol. Endocrinol.* 13, 555-565.
- Plowman, G.D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D., und Hunter, T. (1999). The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: A model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13603-13610.
- Polverino de Laureto, P., Scaramella, E., Frigo, M., Wondrich, F.G., de Filippis, V., Zamboni, M., und Fontana, A. (1999). Limited proteolysis of bovine α -lactalbumin: Isolation and characterization of protein domains. *Protein Sci.* 8, 2290-2303.
- Quintin, S., Mains, P.E., Zinke, A., und Hyman, A.A. (2003). The mbk-2 kinase is required for inactivation of MEI-1/katanin in the one-cell *Caenorhabditis elegans* embryo. *EMBO Rep.* 4, 1175-1181.
- Raich, W.B., Moorman, C., Lacefield, C.O., Lehrer, J., Bartsch, D., Plasterk, R.H., Kandel, E.R., und Hobert, O. (2003). Characterization of *Caenorhabditis elegans* homologs of the Down syndrome candidate gene DYRK1A. *Genetics* 163, 571-580.
- Reddy, E.P., Korapati, A., Chaturvedi, P., und Rane, S. (2000). IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* 19, 2532-2547.
- Richter, K. und Buchner, J. (2001). Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell Physiol* 188, 281-290.
- Roach, M., Guilmette, E., Allen, M., Haskell, K., Durtschi, B., Neote, K., und Brissette, W. (2003). Attenuation of Erythropoiesis by REDK (DYRK3) in an Embryonic Stem cell-based *in vitro* Differentiation model. ISSCR Meeting Abstract Nr. 86.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., und Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Romero, P., Obradovic, Z., Kissinger, C.R., Villafranca, J.E., und Dunker, A.K. (1997). Identifying Disordered Regions in Proteins from Amino Acid Sequences. *Proc. Int. Conf. Neuronal Networks* 90-95.
- Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E., Brown, C., und Dunker, A.K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins: Struct. Funct. Gen.* 42, 38-48.
- Rose, M.D., Winston, F., und Hieter, P. (1990). *Methods in Yeast Genetics*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sacchetti, A., Subramaniam, V., Jovin, T.M., und Alberti, S. (2002). Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Lett.* 525, 13-19.

- Saffman, E.E. und Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1141-1163.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Sangerman, J., Kakhniashvili, D., Brown, A., Shartava, A., und Goodman, S.R. (2001). Spectrin ubiquitination and oxidative stress: potential roles in blood and neurological disorders. *Cell Mol. Biol. Lett.* 6, 607-636.
- Sauer, B. (1994). Site-Specific Recombination: Developments and Applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 521-527.
- Schaegger, H. (1994). Denaturing Electrophoretic Techniques. In *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, (New York: Academic Press), pp. 59-71.
- Schaffer, A.A., Aravind, L., Madden, T.L., Shavirin, S., Spouge, J.L., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., und Altschul, S.F. (2001). Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2994-3005.
- Schiebler, T.H. (1996). *Histologie*, 4. Auflage (Original: Junqueira, L.C., Carneiro, J.: *Histologia Basica*). (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
- Schiestl, R.H. und Gietz, R.D. (1989). High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16, 339-346.
- Schmid, F.X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation. In *Protein Structure: A practical Approach*, T.E. Creighton, ed. (Oxford, New York, Tokio: Oxford University Press), pp. 261-297.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., und Ponting, C.P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5857-5864.
- Shibayama, S., Shibata-Seita, R., Miura, K., Kirino, Y., und Takishima, K. (2002). Identification of a C-terminal region that is required for the nuclear translocation of ERK2 by passive diffusion. *J. Biol. Chem.* 277, 37777-37782.
- Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Shimizu, Y., und Shimizu, N. (1996). Cloning of a human homolog of the *Drosophila* minibrain/rat *Dyrk* gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 92-99.
- Sitz, J.H., Tigges, M., Baumgartel, K., Khaspekov, L.G., und Lutz, B. (2004). *Dyrk1A* potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor *Arip4*. *Mol Cell Biol* 24, 5821-5834.
- Smith, A., Ward, M.P., und Garrett, S. (1998). Yeast PKA represses *Msn2p/Msn4p*-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17, 3556-3564.
- Smith, D.J., Stevens, M.E., Sudanagunta, S.P., Bronson, R.T., Makhinson, M., Watabe, A.M., Odell, T.J., Fung, J., Weier, H.-U.G., Cheng, J.-F., und Rubin, E.M. (1997). Functional screening of 2Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat. Genet.* 16, 28-36.

- Song, W.J., Chung, S.H., und Kurnit, D.M. (1997). The murine Dyrk protein maps to chromosome 16, localizes to the nucleus, and can form multimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *231*, 640-644.
- Song, W.J., Sternberg, L.R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M.L., Chung, S.H., Slack, A.C., Miller, D.E., Glover, T.W., Chiang, P.W., Lou, L., und Kurnit, D.M. (1996). Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics* *38*, 331-339.
- Souza, G.M., da Silva, A.M., und Kuspa, A. (1999). Starvation promotes *Dictyostelium* development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development* *126*, 3263-3274.
- Souza, G.M., Lu, S., und Kuspa, A. (1998). YakA, a protein kinase required for the translation from growth to development in *Dictyostelium*. *Development* *125*, 2291-2302.
- Stauber, R.H. (2002). Analysis of nucleocytoplasmic transport using green fluorescent protein. *Methods Mol Biol.* *183*, 181-198.
- Taminato, A., Bagattini, R., Goriao, R., Chen, G., Kuspa, A., und Souza, G.M. (2002). Role for YakA, cAMP, and Protein Kinase A in Regulation of Stress Responses of *Dictyostelium discoideum* Cells. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2266-2275.
- Tejedor, F.J., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., und Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* *14*, 287-301.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., und Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4673-4680.
- Tilbrook, P.A. und Klinken, S.P. (1999). The erythropoietin receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *31*, 1001-1005.
- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 527-533.
- Towbin, H., Staehlin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *79*, 267-271.
- Uetz, P.H., Hughes, R.E., und Fields, S. (1998). The Two-Hybrid System: Finding Likely Partners for Lonely Proteins. *Focus* *20*, 62-64.
- Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* *61*, 203-212.
- Uversky, V.N. (2002). Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Sci.* *11*, 739-756.
- van der Heide, L.P., Hoekman, M.F., und Smidt, M.P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J.* *380*, 297-309.
- van Es, S., Weening, K.E., und Devreotes, P.N. (2001). The protein kinase YakA regulates G-protein-linked signaling responses during growth and development of *Dictyostelium*. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 30761-30765.

- Verkhusha, V.V., Akovbian, N.A., Efremenko, E.N., Varfolomeyev, S.D., und Vrzheshch, P.V. (2001). Kinetic analysis of maturation and denaturation of DsRed, a coral-derived red fluorescent protein. *Biochemistry (Mosc.)* 66, 1342-1351.
- Visconti, R., Gadina, M., Chiariello, M., Chen, E.H., Stancato, L.F., Gutkind, J.S., und O'Shea, J.J. (2000). Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood* 96, 1844-1852.
- Wall, M.A., Socolich, M., und Ranganathan, R. (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1133-1138.
- Wang, D., Moriggl, R., Stravopodis, D., Carpino, N., Marine, J.C., Teglund, S., Feng, J., und Ihle, J.N. (2000). A small amphipathic alpha-helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated Stat5. *EMBO J.* 19, 392-399.
- Wang, X., Li, W., Parra, J.-L., Beugnet, A., und Proud, C.G. (2003). The C Terminus of Initiation Factor 4E-Binding Protein 1 Contains Multiple Regulatory Features That Influence Its Function and Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1546-1557.
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Dowjat, K., Silverman, W.P., Reisberg, B., deLeon, M., Wisniewski, T., Adayev, T., Chen-Hwang, M.C., und Hwang, Y.W. (2004). Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res.* 1010, 69-80.
- Whitehurst, A.W., Robinson, F.L., Moore, M.S., und Cobb, M.H. (2004). The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *J. Biol Chem.* 279, 12840-12847.
- Whitehurst, A.W., Wilsbacher, J.L., You, Y., Luby-Phelps, K., Moore, M.S., und Cobb, M.H. (2002). ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 7496-7501.
- Wick, K.R. und Berton, M.T. (2000). IL-4 induces serine phosphorylation of the STAT6 transactivation domain in B lymphocytes. *Mol. Immunol.* 37, 641-652.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., und Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79, 143-180.
- Wiechmann, S., Czajkowska, H., De Graaf, K., Grotzinger, J., Joost, H.G., und Becker, W. (2003). Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 403-408.
- Wojchowski, D.M., Gregory, R.C., Miller, C.P., Pandit, A.K., und Pircher, T.J. (1999). Signal Transduction in the Erythropoietin Receptor System. *Exp. Cell Res.* 253, 143-156.
- Wolf, I., Rubinfeld, H., Yoon, S., Marmor, G., Hanoch, T., und Seger, R. (2001). Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *J. Biol Chem.* 276, 24490-24497.
- Woods, K.C., Martin, S.S., Chu, V.C., und Baldwin, E.P. (2001a). Quasi-equivalence in site-specific recombinase structure and function: crystal structure and activity of trimeric Cre recombinase bound to a three-way Lox DNA junction. *J. Mol Biol* 313, 49-69.
- Woods, Y.L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., und Proud, C.G. (2001b). The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212:

- potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* **355**, 609-615.
- Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T.G., und Cohen, P. (2001c). The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem. J.* **355**, 597-607.
- Wright, P.E. und Dyson, H.J. (1999). Intrinsically Unstructured Proteins: Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J. Mol Biol* **293**, 321-331.
- Wu, X., Jörnvall, H., Berndt, K.D., und Oppermann, U. (2004). Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 89-96.
- Wüthrich, K. (1986). NMR of proteins and nucleic acids. (New York: Wiley Interscience).
- Xia, J., Yang, X., Ruan, Q., Pan, Q., Liu, C., Xie, W., und Deng, H. (1998). [Molecular cloning and characterization of novel protein kinase gene DYRK3]. *Zhonghua Yi. Xue. Yi. Chuan Xue. Za Zhi.* **15**, 327-332.
- Xue, H.H., Fink, D.W., Jr., Zhang, X., Qin, J., Truck, C.W., und Leonard, W.J. (2002). Serine phosphorylation of Stat5 proteins in lymphocytes stimulated with IL-2. *Int. Immunol.* **14**, 1263-1271.
- Yamashita, H., Nevalainen, M.T., Xu, J., LeBaron, M.J., Wagner, K.U., Erwin, R.A., Harmon, J.M., Hennighausen, L., Kirken, R.A., und Rui, H. (2001). Role of serine phosphorylation of Stat5a in prolactin-stimulated beta-casein gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* **183**, 151-163.
- Yamashita, H., Xu, J., Erwin, R.A., Farrar, W.L., Kirken, R.A., und Rui, H. (1998). Differential control of the phosphorylation state of proline-juxtaposed serine residues Ser725 of Stat5a and Ser730 of Stat5b in prolactin sensitive cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 30218-30224.
- Yang, E.J., Ahn, Y.S., und Chung, K.C. (2001). Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 39819-39824.
- Yang, F., Moss, L.G., und Phillips, G.N., Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1246-1251.
- Yaoita, Y. (2002). Inhibition of Nuclear Transport of Caspase-7 by Its Prodomain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 79-84.
- Yarbrough, D., Wachter, R.M., Kallio, K., Matz, M.V., und Remington, S.J. (2001). Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 462-467.
- Yokoyama, S. (2003). Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 39-43.
- Yoshioka, K. (2004). Scaffold Proteins in Mammalian MAP Kinase Cascades. *J. Biochem.* **135**, 657-661.
- Zeng, G. (1998). Sticky-End PCR: New Method for Subcloning. *Biotechniques* **25**, 206-208.

- Zeng, R., Aoki, Y., Yoshida, M., Arai, K., und Watanabe, S. (2002). STAT5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J Immunol.* *168*, 4567-4575.
- Zhao, K.N., Tomlinson, L., Liu, W.J., Gu, W., und Frazer, I.H. (2003). Effects of additional sequences directly downstream from the AUG on the expression of GFP gene. *Biochim. Biophys. Acta* *1630*, 84-95.
- Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* *102*, 759-781.
- Zou, Y., Ewton, D.Z., Deng, X., Mercer, S.E., und Friedman, E. (2004). Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J. Biol. Chem.*
- Zou, Y., Lim, S., Lee, K., Deng, X., und Friedman, E. (2003). Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. *J. Biol. Chem.* *278*, 49573-49581.
- Zuniga, A., Torres, J., Ubeda, J., und Pulido, R. (1999). Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J. Biol Chem.* *274*, 21900-21907.

8 Anhang

8.1 Plasmide, Vektoren und Oligonucleotide

Tab. 8.1: Verwendete cDNAs

Insert	Vektor	Referenz
humane DYRK 3-L	pBS SK(-)	Dr. W. Becker, Aachen (588 aa/65713,1 Da/pK _i 9,61)
humane DYRK 3-S	pBS SK(-)	Dr. W. Becker, Aachen (568 aa/63976,2 Da/pK _i 9,51)
DYRK 1A aus Ratte	pBS SK(-)	Dr. W. Becker, Aachen
humane DYRK 2.1	pBS SK(-)	Dr. W. Becker, Aachen
Maus-DYRK 3-L	pCMV.SPORT-6	EST-Klon BG915770*
Maus-STAT 5A	pBS SK(-)	Dr. Th. Decker, Wien
humanes STAT 5A	pCMV.SPORT-6	EST-Klon U43185*

*Research Genetics, Invitrogen; aa, Anzahl der Aminosäuren

Tab. 8.2: Verwendete Vektoren

Vektor	Merkmale (Fusionen, Tags)	Marker	Ref.
pEGFP-N1	EGFP C-terminal zur MCS 239 aa/26941,6 Da/pK _i 5,51	Kan/Neo	BD Clontech
pEGFP-C1	EGFP N-terminal zur MCS 265 aa/29371,1 Da/pK _i 5,83	Kan/Neo	BD Clontech
pDsRed2-C1	DsRed N-terminal zur MCS 248 aa/27935,6 Da/pK _i 6,85	Kan/Neo	BD Clontech
pECFP-C1 _{mod}	ECFP N-terminal zur MCS	Kan/Neo	BD Clontech
pEYFP-C1	EYFP N-terminal zur MCS	Kan/Neo	BD Clontech
pcDNA3.1		Amp, Neo	Invitrogen
pcDNA5/FRT/TO	FRT-Erkennungssequenz	Amp, Hyg	Invitrogen
pGBKT7	Gal4 DNA bindende Domäne	Kan, Trp	BD Clontech
pGADT7	Gal4 Aktivierungsdomäne (AD)	Amp, Leu	BD Clontech
pACT2	Gal4 AD, cDNA-Bibliotheken	Amp, Leu	BD Clontech
pET-41	GST-Fusion, His-Tag	Kan	Novagen Merck
pET-19_Mod	mit TEV-Schnittstelle	Amp	Axel Scheidig
pCR2.1-TOPO		Amp, Kan	Invitrogen

Neo, Neomycin-; Hyg, Hygromycin-; Kan, Kanamycin-; Amp, Ampicillin-Resistenz
Leu, LEU2-Gen; Trp, TRP1-Gen

Tab. 8.3: Die in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Plasmide für eukaryontische Expression (ausgenommen Hefe)

Insert	Vektor	aa/M _w /pK _i
FLAG-DYRK 3-L (#142)	pcDNA5 /FRT/TO	596 aa/66708,0 Da/pK _i 9,44
GFP-DYRK 3-S (#168)	pEGFP-N1	812 aa/91399,9 Da/pK _i 8,85
DsRed2-DYRK 3-S (#88)	pDsRed2-N1	795 aa/89964,5 Da/pK _i 9,18
DYRK 3-L-GFP (#129)	pEGFP-C1	833 aa/93216,8 Da/pK _i 8,85
DYRK 3-S-GFP (#130)	pEGFP-C1	813 aa/91480,0 Da/pK _i 8,71
DYRK 3-S ₁₋₁₆₃ -GFP (#131)	pEGFP-C1	408 aa/45783,6 Da/pK _i 5,86
DYRK 3-S _{Delta1-163} -GFP (#132)	pEGFP-C1	651 aa/73349,7 Da/pK _i 9,06
STAT 5A	pcDNA3.1	
GFP-SGLT-1	pEGFP-N1	Daniel Scharlau
TPST-1-GFP	pEGFP-C1	Dr. Sandra Goettsch

aa, Aminosäuren; M_w, theoretisches Molekulargewicht; pK_i, isoelektrischer Punkt

Tab. 8.4: Die in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Konstrukte in Hefe-Vektoren

Insert	Vektor	Bemerkung
BD-DYRK 3-S	pGBKT7	Müller, 2001
BD-DYRK 3-S <i>kd</i>	pGBKT7	
BD-DYRK 3-L	pGBKT7	Müller, 2001
BD-DYRK 3-L ₂₇₋₁₈₄	pGBKT7	
BD-mDYRK 3-L ₂₇₋₁₈₃	pGBKT7	
BD-DYRK 3-L ₁₋₁₅₁	pGBKT7	
BD-DYRK 3-L ₆₄₋₁₅₁	pGBKT7	
BD-rDYRK 1A	pGBKT7	
BD-DYRK 2.1	pGBKT7	
AD-DYRK 3-S	pGADT7	Müller, 2001
AD-DYRK 3-L	pGADT7	Müller, 2001
AD-mSTAT 5A	pGADT7	Müller, 2001
BD-STAT 5A	pGBKT7	
AD-STAT 5A	pGADT7	
AD-STAT 5A-TAD' (Ala717-Ser780)	pGADT7	
AD-STAT 5A-TAD (Ala717-Ser794)	pGADT7	
AD-Spectrin-alpha (His1704-Glu1892)	pACT2	

Der Spectrin-Klon wurde nur 5' ansequenziert, enthält aber der Insertlänge nach die gesamte C-terminale Sequenz bis Gln2418. Die anderen Klone aus den Yeast Two-Hybrid Screens sind nur in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tab. 8.5: DYRK 3-Konstrukte zur Expression in *E. coli*

Insert	Nr.	Vektor	Bemerkungen
hDYRK 3-S ₁₋₁₈₆	56	pET-19_mod	siehe Abschnitt 3.4.1; N-term. His6-TEV
mD3-L ₂₇₋₁₈₃	121	pET-41*	siehe Abschnitt 3.4.3 ff.
mD3-L ₂₇₋₁₈₃ (C128S)	173	pET-41*	Cys128Ser, siehe Abschnitt 3.4.3 ff.
mD3-L ₄₃₋₁₂₇	133	pET-41*	keine Induktionsbande
mD3-L ₆₅₋₁₅₀	134	pET-41*	unstrukturiert nach CD und ¹ H-NMR
mD3-L ₇₂₋₁₇₅	135	pET-41*	<i>Inclusion Body</i>
mD3-L ₇₂₋₁₅₀	136	pET-41*	unstrukturiert nach CD und ¹ H-NMR
mD3-L ₂₈₋₁₅₀	145	pET-41*	keine Induktionsbande
mD3-L ₆₅₋₁₅₈	147	pET-41*	lösliches Protein
mD3-L ₆₅₋₁₅₈ (C128S)	174	pET-41*	Cys128Ser, unstrukturiert nach CD
mD3-L ₁₋₁₅₀	153	pET-41*	lösliches Protein
mD3-L ₁₋₁₅₀ (C128S)	175	pET-41*	Cys128Ser, unstrukturiert nach CD

mD3, Maus-DYRK 3
 * Klonierung über *Nde I/Xho I*, deshalb nur C-terminaler His8-Tag, kein GST

Tab. 8.6: Verwendete Oligonucleotide für Sequenzierung und Klonierung

Name	Sequenz (5' nach 3')	Bemerkungen	(T _M)
Sequenzier-Primer für Vektoren			
T7 Prom	taa tac gac tca cta tag gg		47 °C
T7 Term	gct agt tat tgc tca gcg g		48 °C
CMV for	cgc aaa tgg gcg gta ggc gtg	für pcDNA Vektoren	60 °C
BGH rev	cta gaa ggc aca gtc gag g	für pcDNA Vektoren	53 °C
GST for	ttg cag ggc tgg caa gcc acg	GST 3'-Ende	60 °C
5' AD	cta ttc gat gat gaa gat acc cca cca aac cc	5' Gal4-AD Insert	> 65 °C
3' AD	agt gaa ctt gcg ggg ttt ttc agt atc tac gat	3' Gal4-AD Insert	> 65 °C
102	ccc gga att agc ttg gct gca	r SP für pGBKT7	
177	TGA TCA GTT ATC TAG ATC CG	r SP für Living Color Vectors	
Oligonucleotide für humane DYRK 3			
440-S3	gtg aaa ctt tcc agc atg tgg	int rev SP für DYRK3	52 °C
116	gca tga tgg agc ttc tag gg	int for SP für hDYRK3	
117	ccc tag aag ctc cat cat gc	int rev SP für hDYRK3	
175	aga gag aga tct atg aag tgg aaa gag aag ttg ggg	f PP für DYRK3_MKWKE (Bgl II)	
176	aga gag GAA TTC ACT AGC TAA TCA GTT TTG GC	r PP für DYRK3 (Eco RI)	
103	cta tat tca tgt acc tcg aga cca	int for SP für DYRK3	
184	aaa ttt aaa cat ATG AAG TGG AAA GAG AAG TTG GGG	f PP für hDYRK3_ND_MKWKE (Nde I)	
185	aaa ttt gga tcc <u>atta</u> AGC TAG ATG GTC TCG AGG TAC ATG	r PP für hDYRK3_ND (Bam HI, Stop)	

186	aaa ttt aaa cat ATG GGT CCC AAT AAT GGA GGG TAT GAT G	f PP für hDYRK3_KD (Nde I)
187	CGC TAC AGC ACA CCA ATT GAT ATA TGG AGT TTT GGC TGC ATC	mut for PP für hDYRK3_KD (Δ Nde I)
188	aaa ttt gga tcc atTA GCT AAT CAG TTT TGG CAA TAC ACT	r PP für hDYRK3_KD_KLIS (Bam HI) KLIS
197	tat ata tat CAT ATG GGG GAT GGT GTC TAT GAC ACC	f PP für h_DYRK3_ND (Nde I)
198	a cac acg aat tca tta ctc gag ACC ACC AAT AAC TCC ATG TCT TTTC	r PP für h_DYRK3_ND (Xho I - Stop - Eco RI)
199	a tat atg aat tcc acc ATG GGA GGC ACA GCT CGT GGG	forPP - h_DYRK3-L (Eco RI - Kozak)
200	a tat atg aat tcc acc ATG AAG TGG AAA GAG AAG TTG GGG	forPP - h_DYRK3-S (Eco RI - Kozak)
201	aa tta agg atc cga AAT CAG TTT TGG CAA TAC ACT GC	revPP - h_DYRK3 (NO Stop Bam HI)
202	a tat atg aat tcc acc atg GGT CCC AAT AAT GGA GGG TAT GAT G	forPP - h_DYRK3-S DELTA 1 - 164 (Eco RI - Kozak)
203	aa tta agg atc cCC AAT AAC TCC ATG TCT TTT CTT GGC	revPP - h_DYRK3-S only 1 - 164 (NO Stop Bam HI)
216	ata tat gga tCC ACC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG gga ggc aca gct cgt ggg cct ggg	forPP h_DYRK3-L_MDYKD (Bam HI , <u>Kozak</u> , Flag-Tag)
217	aa tta att aat tgc ggc cgc tca gct aat cag ttt tgg caa tac act gc	revPP h_DYRK3_KLIS (Not I, Stop)
218	at ata t CC ATG ggc cac cat cac cat cac cat GAA ATA ATT AAT TAT CCA GAA ATT TAC	forPP h_DYRK3 EIIN (Nco I, His6)
219	aat taa gga tcc atta GAA AGC ACT TGC AGG ATT AAC TAC C	revPP h_DYRK3 PASAF (Bam HI , <u>Stop</u>)
221	ata tat gaa ttc <u>atta</u> TTT ATA TTG CTT CAG GGC TTG TTC	revPP h_DYRK3_QYK (Eco RI , <u>Stop</u>) ähnlich 208
223	ata tat act agt ccc cac tgg aat gat ggg gcc atc	forPP h_STAT5A_SH2 (Spe I)
224	tat ata tat cat atg acc act gag cag ttt aca gga gat c	forPP h_DYRK3_TTE (Nde I)
225	tat ata tat cat atg gga ggc aca gct cgt ggg	forPP h_DYRK3_MGGT (Nde I)
226	tat ata tat cat atg aag tgg aaa gag aag ttg ggg ga	forPP h_DYRK3_MKWK (Nde I)
228	aca cac ctc gag TTT ATA TTG CTT CAG GGC TTG TTC	revPP h_DYRK3_QYK (Xho I), ohne Stop!
238	ata tat gga tcc ttg ggg gat ggt gtc tat gac acc	hDYRK3_LGDGV (Bam HI)
239	aat taa gaa ttc <u>att att</u> tat att gct tca ggg ctt gtt c	hDYRK3_LKQYK_rc <u>STOP</u> (Eco RI)

 Oligonucleotide für Maus-DYRK 3

193	tat ata tat cat atg TTG GGG GAT GGT GTC TAT GAT AC	f PP für m_DYRK3_ND (Nde I)
194	aca cac ctc gag ACC ACC AAT AAC TCC CTG CCG C	r PP für m_DYRK3_ND (Xho I) w/o St
195	tat ata tat cat ATG GGG GAT GGT GTC TAT GAT ACT TTC	f PP für m_DYRK3_ND (Nde I) = 193 Delta TTG
196	a cac acg aat tca tta ctc gag ACC ACC AAT AAC TCC CTG CCG C	r PP für m_DYRK3_ND (Xho I - Stop - Eco RI)
204	tat ata tat cat atg GGC CCA CCC TAT TCG GAC ACA TTC	forPP m_DYRK3_GPP (Nde I)

205	tat ata tat cat atg ACC ACT GAG CCA CTC ACG AGA GGC	forPP m_DYRK3_TTE (Nde I)
206	tat ata tat cat atg GGC CAC ACT CAG CAC TTT GTG AAT GG	forPP m_DYRK3_GHT (Nde I)
207	aca cac ctc gag CTT CAC CGC GCT CAG GCT TTC TG	revPP m_DYRK3_AVK (Xho I), ohne Stop!
208	aca cac ctc gag TTT ATA CTG CTT CAG CGC TTG CTC	revPP m_DYRK3_QYK (Xho I), ohne Stop!
209	aca cac ctc gag TTT GGC ATT CGG ACC CAC AAA GTA G	revPP m_DYRK3_NAK (Xho I), ohne Stop!
220	ata tat gaa ttc <u>atta</u> ctc gag ctt ctc gta ggc agt gag gtg gtg	revPP m/h_D3 EKLE (<i>Eco</i> RI, <u>Stop</u> , Xho I)
227	tatatatat cat ATG GGA GGC GCA GCC CGC GAT C	forPP m_DYRK3_MGGA (Nde I)

Oligonucleotide für DYRK 2 und DYRK 1A

118	gga cag cat tca tag acg gc	if SP für hDYRK2
119	gcc gtc tat gaa tgc tgt cc	ir SP für hDYRK2
120	ggc tcc agt tgt tac gag cat c	if SP für hDYRK2
121	gat gct cgt aac aac tgg agc c	ir SP für hDYRK2
130	tATG TTA ACC AGG AAA CCT TCG G	f PP 1 hDYRK2_L (für Nde I)
131	TG TTA ACC AGG AAA CCT TCG Gc	f PP 2 hDYRK2_L (für Nde I)
132	cTCA GCT AAC AAG TTT TGG CAA CAC	r PP 1 für hDYRK2 (für Eco RI)
133	aattcTCA GCT AAC AAG TTT TGG CAA CAC	r PP 2 für hDYRK2 (für Eco RI)
143	tg aat gat cac ctg cat gtc ggc	f PP 1 für hDYRK2_S (Nde I)
144	tatg aat gat cac ctg cat gtc ggc	f PP 2 für hDYRK2_S (Nde I)
122	ctc tat gat ttg ttg agg aac acc	if SP für rDYRK1A
123	cct gtt cct caa caa atc ata gag	ir SP für rDYRK1A
124	ccc agt ctt cag gca cca cct cc	if SP für rDYRK1A
125	gga ggt ggt gcc tga aga ctg gg	ir SP für rDYRK1A
145	gat tat gac ccc aaa act cgg	if SP für rDYRK1A
146	GCC TGG ACA GCA GCA GCG	ir SP für rDYRK1A
126	T ATG CAT ACA GGA GGA GAG AC	f PP 1 rDYRK1A (für Nde I)
127	TG CAT ACA GGA GGA GAG ACT tc	f PP 2 rDYRK1A (für Nde I)
128	cTC ACG AGC TAG CTA CAG GAC TC	r PP 1 rDYRK1A (für Eco RI)
129	aatt cTC ACG AGC TAG CTA CAG GAC TC	r PP 2 rDYRK1A (für Eco RI)

Oligonucleotide für Enolase-1

84int3	tta ttc tcc agg atg ttg gga gca	i SP für ENO1 und MBP-1
115	gag cag agg ttt acc aca acc	i SP für ENO1

Oligonucleotide für STAT 5A

104	aaa ttt aaa cat atg gcg ggc tgg atc cag gcc cag c	for PP für hSTAT5 Nde I
105	ttt aaa ccc ggg tca tga gag gga gcc tct ggc aga ggt g	rev PP für hSTAT5 Xma I
106	ggg ggc agc ggt cat aAg ttt tct gga gct gcg tgg cg	int rev PP für hSTAT5 Δ Nde I
111	gcg gcg gca gca gct ggc cgg g	i SP für hSTAT5A
112	ccc ggc cag ctg ctg ccg ccg c	i r SP für hSTAT5A
113B	CGG CTA CTG TGC TGT GGG	i SP für hSTAT5A
114	ggt tct cct tgg tca ggc ccc gg	i r SP für hSTAT5A
140	GCA GCG TGA GGC ACA GAC	i SP für hSTAT5A

181	aaa ttt aaa cat atg GCC ACG TAC ATG GAC CAG GCC	f PP für STAT5_Cterm (Nde I)
182	aaa ttt gga tcc <i>atta</i> CGA GAG GCG GGA GTC AAG ACT G	r PP für STAT5_Cterm1 (Bam HI)
183	aaa ttt gga tcc <i>atta</i> TGA GAG GGA GCC TCT GGC AGA G	r PP für STAT5_Cterm2 (Bam HI)

T_M , Schmelztemperatur; PP, Primer für PCR; SP, zum Sequenzieren; f/for, forward; r/rev, reverse, i/int, intern; m/mut, Mutation.

Tab. 8.7: Zielgerichtete Mutationen (QuickChange)

Plasmid	Sequenz der verwendeten Oligonucleotide (5' nach 3')	Nr.
pECFP-C1 _{mod}	GAT CTC GAG CTC AAG CTT CcG AAT TCT GCA GTC GAC GG	161
	CCG TCG ACT GCA GAA TTC gGA AGC TTG AGC TCG AGA TC	162
DYRK 3-S Lys218Arg	tac gtg gcc cta cgt atg gtg cgc aat gag aag	440M1
	cat tgc gca cca tac gta ggg cca cgt act gtc	440M2
Maus-DYRK 3-L Cys128Ser	GAA AGC CTG AGC GCG GTG AAG AGC AAC CTT TCC TCC AGG C	244
	GCC TGG AGG AAA GGT TGC TCT TCA CCG CGC TCA GGC TTT C	245
humanes STAT5A	GGT GTG AGA AGT TGg CCG AGA TCA TCT GGC	141
	CAG ATG ATC TCG GcC AAC TTC TCA CAC CAG G	142

8.2 Die verwendeten Bakterien- und Hefe-Stämme

Tab. 8.8: Stämme von *E. coli* für die Manipulation von DNA

Name	Hersteller	Bemerkungen
DH5 α TM	Invitrogen, Karlsruhe	zur Klonierung
XL-1 Blue	Stratagene, Amsterdam, NL	zur Klonierung
XL-10 Gold [®]	Stratagene, Amsterdam, NL	zur Klonierung großer Inserts
DH10B	Research Genetics, USA	Wirt sämtlicher ESTs
TOP10 One Shot	Invitrogen, Karlsruhe	Elektro-kompetent
Top10	Invitrogen, Karlsruhe	TOPO-Klonierung

Tab. 8.9: *E. coli* Stämme für die heterologe Expression von Proteinen

Name	Hersteller	Bemerkungen
BL21(DE3)RIL	Merck Novabiochem, Schwalbach (Taunus)	T7-Polymerase, Codon optimiert
Rosetta	Merck Novabiochem, Schwalbach (Taunus)	T7-Polymerase, Codon optimiert, reagiert auf unterschiedliche Konzentrationen von IPTG

Die verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* (Genotyp)

Der Genotyp des Hefe-Stammes Y 187 (BD Clontech, Heidelberg), der die cDNA-Bibliothek enthielt, ist: *MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4 Δ* , *met*, *gal80 Δ* , *URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ*, *MEL1*.

Der *S. cerevisiae*-Stamm AH 109 (BD Clontech, Heidelberg) wurde als Kreuzungspartner für Y 187 mit der prätransformierten Bibliothek verwendet. Mit AH 109 wurden überdies sämtliche Co-Transformationsexperimente durchgeführt. Dieser Stamm besitzt den Genotyp: *MAT α* , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3*, *MEL1*, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*, *URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ*.

8.3 Angaben zu den Yeast Two-Hybrid Screens

Informationen zu den durchgeführten Screens mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid*-Systems sind in **Tab. 8.10** zu finden. Diese enthält Angaben zur Komplexität der verwendeten cDNA-Bibliotheken, zur Effizienz der Kreuzung bzw. der Transformation, zu den Selektionsbedingungen sowie zur Zahl der gesichteten Klone. Die Klone, die sequenziert wurden, sind in **Tab. 3.1** aufgeführt.

Tab. 8.10: Mit dem Yeast Two-Hybrid-System durchgeführte *Screens* von cDNA-Bibliotheken

<i>Bait</i>	DYRK 3-S	DYRK 3-L ₆₄₋₁₅₁ *	DYRK 3-L ₁₋₁₅₁	DYRK 3-L ₂₇₋₁₈₄	DYRK 3-L ₂₇₋₁₈₄	Maus-DYRK 3-L ₂₇₋₁₈₃
cDNA-Bibliothek	Leber	Leber	Leber	Leber	Knochenmark	Leber
Methode	Chemische Transformation	Chemische Transformation	Chemische Transformation	Chemische Transformation	Mating (1,5 x 10 ⁸)	Chemische Transformation
SD/W	4,6 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁸	3,4 x 10 ⁸	3,5 x 10 ⁸	7,6 x 10 ⁹	7,4 x 10 ⁸
SD/L	k. A.	4,0 x 10 ⁶	k. A.	6,0 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁶
SD/WL	6,0 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁶	0,2 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶
% der Bibliothek	17%	59%	7%	77%	6%	32%

* Mit diesem Konstrukt wurden zwei Screens durchgeführt. Die Angaben aus beiden Screens sind hier addiert worden. Die verwendeten cDNA-Bibliotheken waren in dem AD-Vektor pACT2 aus polyA⁺-mRNA aus fötaler Leber bzw. Knochenmark humanen Ursprungs (BD Clontech, Heidelberg). Die Knochenmark-Bibliothek war bereits in den Hefe-Stamm Y 187 prätransformiert. Beide Bibliotheken enthielten lt. Hersteller ursprünglich 3,5 x 10⁶ unabhängige Klone. Die sequenzierten Klone sind in **Tab. 3.1** aufgelistet. *** Bei diesem *Screen* ist die Effizienz des *Matings*, nicht jene der Transformation aufgeführt.

Lebenslauf

Jonathan Wolf Müller

geboren	am 29. Juli 1976 in Haldensleben
Adresse	Landgrafenstr. 124 44139 Dortmund jonathanWmueller@web.de
6/1995	Abitur, Stadtfeld Gymnasium, Wernigerode, "1.2" (Sehr Gut)
8/1995 - 8/1996	Zivildienst im Bethesda Altenpflegeheim, Teltow
10/1996 - 7/2001	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
9/1998	Biochemie-Vordiplom "1.0" (Sehr Gut)
10 - 12/1998	Praktikum, Institut für Pflanzen-Biochemie, Halle (Saale) "Characterization of A. thaliana signal transduction mutants"
4 - 6/1999 und 4 - 6/2000	Forschungspraktika in der NMR-Gruppe der Max-Planck-Forschungsstelle Halle (Saale), "Assignment of resonances of the small peptidyl-prolyl isomerase hPar14" and "pH Titrations of PPIases with and without peptide substrate"
7 - 9/1999	Auslandspraktikum bei Prof. Dr. Robert Westwood, Institute for Chemistry in Industry, University of Kingston upon Hull, United Kingdom, "Synthesis of a peptidomimetic Caspase inhibitor"
1 - 4/2000	Industriepraktikum im Pharmaforschungszentrum Wuppertal, Bayer AG, mit Schwerpunkt auf Apoptose, Signalübertragung von Cytokinen und Adapterproteinen
10/2000 - 7/2001	Diplom-Arbeit " Yeast Two-Hybrid-Wechselwirkungsassays mit regulatorischen Proteinen der hämatopoietischen Signaltransduktion." Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Bayer AG, Wuppertal.
7/2001	Diplom in Biochemie, "1.0" (Mit Auszeichnung) mit den Wahlfächern „Technische Biochemie“ und „Molekularbiologie“
Seit 8/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie Dortmund, Thema: „Zelluläre und biophysikalische Studien an DYRK 3: Der N-Terminus als Schlüssel zum Verständnis dieser Protein-Kinase“
8/2003	FEBS/EMBO Lecture Course on Signal Transduction, Spetses, Griechenland
5/2004	FEBS Lecture Course on Cellular Signaling, Dubrovnik, Kroatien

Stipendien

- 7 - 9/1999 Sokrates Austauschstipendium, Europäische Union, University of Kingston upon Hull, United Kingdom
- 4/1999 - 7/2001 Stipendiat der Friedrich-Ebert-Stiftung
- 1/2002 - 12/2003 Kekulé Stipendium, Stiftung Stipendien-Fonds, Verband der Chemischen Industrie
- 8/2003 FEBS-Student, FEBS/EMBO Lecture Course on Signal Transduction, Spetses, Griechenland
- 5/2004 FEBS-Student, FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference, Dubrovnik, Kroatien

Publikationen

Bayer E, Goettsch S, Mueller JW, Griewel B, Guiberman E, Mayr LM, Bayer P. Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: Insights into domain architecture and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 2003, 278 (28), S. 26183–26193.

Mueller JW, Bayer P. A new regulator of small GTPases? *Trends in Biochem. Sci.* 2002. 27 (3): 118

Sekerina E, Rahfeld JU, Fanghänel J, Müller J, Rascher C, Fischer G, Bayer P. Solution NMR Structure of hPar14: The Catalytic Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerase Core Folds Analogous to that of hPin1, but the N-Terminus Extends to a Distinct Interaction Module. *Nova Acta Leopoldina* 2001. Suppl 16: 149 - 150.

Sekerina E, Rahfeld JU, Müller J, Fanghänel J, Rascher C, Fischer G, Bayer P. NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. *J Mol Biol* 2000. 301 (4): 1003 - 1017.

Abstract

Müller JW, Schwarz E, Bayer P. The Erythroid Kinase DYRK3: Studies on Localisation and Binding Partners. FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference, Dubrovnik, Croatia, 2004, P-80. ISBN 953-6690-44-6

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Einzig die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden verwendet. Ich versichere weiterhin, dass alle wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet sind.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität vorgelegt.

Halle (Saale), Juli 2004

Dank

Herrn PD Dr. Peter Bayer danke ich für die Überlassung des Themas, für eine sehr angenehme, produktive und lehrreiche Zeit in Dortmund und für das immer wieder demonstrierte große Vertrauen in mich.

PD Dr. Elisabeth Schwarz danke ich besonders für ihre Hilfsbereitschaft, unter anderem beim Lesen eines sehr frühen Manuskripts und beim Interpretieren der CD-Spektren.

Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für die freundliche Unterstützung in Halle (Saale).

Petra Glitz und Christiane Pfaff gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der Zellkultur.

Daniel Scharlau verdanke ich wertvolle Einblicke in eukaryontische Zellen durch die Einführung in die Fluoreszenz-Mikroskopie.

Bernhard Griewel danke ich für die Durchführung der NMR-Messungen.

Dr. Frank ter Veld, Heidrun Olsen, Mobeen Raja und Daniel Scharlau danke ich für stimulierende und anregende Diskussionen. Ohne eine gewisse Prise holländischen Humors wäre die Arbeit nicht so gut vorangegangen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Peter Bayer danke ich für tatkräftige Unterstützung: Dr. Elena Bayer, Matthias P. J. Rabiller, Christina Fatu, Dr. Sandra Goettsch, Karl-Heinz Müller, Bernhard Griewel, Dr. Elena Guiberman und Dr. Stefan Harjes, Fanni Cuesta und vor allem Beate Schoelermann.

Nikola Kellner, Bianca Hoffmann und Daniel Neumann danke ich für die Unterstützung bei der Arbeit mit Hefe sowie mit 2D-Gelen. Ich wünsche mir weiterhin so motivierte Praktikanten.

Prof. Dr. Rolf K.-H. Kinne und Dr. Lorenz M. Mayr danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft. Prof. Dr. Walter Becker danke ich für die freundliche Übersendung der DYRK-cDNAs.

Meinen treuen Manuskript-Lesern und Motivatoren Beate und Olli danke ich aufs Herzlichste.

Danke an Abteilung II sowie an die unverzichtbaren Zentralen Einrichtungen ZE DOC und ZE EDV des Max-Planck-Institutes.

DFG, MPG, FCI und BMBF danke ich für die finanzielle Unterstützung.