

## **Zusammenfassung: Identifizierung von zwei TKL-Proteinen als wichtige STATc Modulatoren in der hyperosmotischen Stressantwort**

**Linh Vu Hai**

Um sich an wechselnde Bedingungen des osmotischen Milieus anzupassen, initiieren Zellen umfassende Veränderungen in der Transkription. In *D. discoideum* spielt STATc (Signal Transducer and Activator of Transcription c) eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Antwort auf hyperosmotischen Stress. Unter diesen Bedingungen wird STATc durch Phosphorylierung am Tyrosin 922 aktiviert. Daraufhin dimerisieren zwei STATc-Monomere und werden in den Zellkern transportiert, um spezifische Gentranskription zu kontrollieren. In Säugerzellen werden STATs von JAKs (Janus Kinase) aktiviert. Im Dictyosteliumgenom konnte jedoch kein eindeutiger JAK-Ortholog identifiziert werden. Neuere Studien konnten bereits zwei STATc-Regulatoren ermitteln, PTP3 (Protein Tyrosine Phosphatase 3) und Pyk2 (Tyrosinkinase-ähnliches (TKL) Protein) (Araki *et al.*, 2008; Araki *et al.*, 2012). Die Ergebnisse zeigten, dass Pyk2 nicht allein für die STATc-Phosphorylierung verantwortlich ist.

Basierend auf Microarrayergebnissen wurden drei Proteinkinasen, Pyk3, Phg2 und MORN, als mögliche Kandidaten für diese Arbeit ausgewählt. Von diesen Genen analysierten wir Knockout-Mutanten, Doppelknockout-Mutanten für Pyk3 und Phg2, sowie STATc-GFP-exprimierende Mutanten im Hinblick auf die transkriptionelle Regulation, STATc-Phosphorylierung und Kerntranslokation. Wir konnten zeigen, dass Phg2 essentiell für die Regulation der transkriptionellen Aktivierung von STATc und STATc abhängigen Genen unter Zugabe von Sorbitol und 8-Bromo cGMP ist, während Pyk3 und MORN die Transkription partiell regulieren. Die Abwesenheit von Pyk3 und Phg2 führte darüber hinaus zu einer Beeinträchtigung der STATc-Phosphorylierung und -Kerntranslokation unter diesen Bedingungen. Außerdem stellten wir fest, dass die Überexpression von Pyk3 eine konstitutive STATc-Phosphorylierung herbeiführt und dass Pyk3 direkt bakteriell experimentiertes STATc *in vitro* phosphoryliert. Wir zeigten mit Hilfe von Phosphoserin-spezifischen Antikörpern, dass Phg2 an der Inhibierung und Phosphorylierung von PTP3 an Serin 747 beteiligt ist. Pull-Down-Experimente legten dar, dass Phg2 und PTP3 direkt miteinander interagieren. Unter hyperosmotischen Bedingungen wird die Aktivität von STATc über einen gegabelten Signalweg reguliert. In dem cGMP-abhängigen Weg ist Pyk3 für die direkte STATc-Phosphorylierung und Phg2 für die

PTP3-Phosphorylierung und –Inhibierung verantwortlich. In dem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Weg agiert Pyk2 als STATc-Kinase und vermeintlich eine weitere Proteinkinase, die PTP3 an Serin 448 phosphoryliert. Diese komplexe Regulation ermöglicht eine optimale stressinduzierte STATc-Aktivierung.