

Diversin, eine neue Komponente des Wnt-Signalweges

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs Biologie/Chemie/Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Thomas Schwarz-Romond

angefertigt am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Birchmeier

Berlin, im August 2002

Gutachter: Prof. Dr. W. Birchmeier

Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Datum der mündlichen Prüfung: 03. Dezember 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	6
2.1	Der Wnt/ β -Catenin Signalweg	7
	β -Catenin und die Signalübertragung in den Zellkern	9
	Der Axin/APC-Komplex	10
	β -Catenin- und Axin/Conductin- Mutationen in Tumoren	13
	Wnt-Signale in der Embryogenese von Frosch, Fisch und Maus	15
2.2	Der Wnt/JNK-Signalweg	17
2.3	Verbindungen zwischen dem Wnt/ β -Catenin- und dem Wnt/JNK- Signalweg	19
3	Zielsetzung dieser Arbeit	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Identifizierung und Klassifizierung potentieller Conductin-Interaktionspartner	23
4.2	Klonierung der vollständigen Diversin cDNA	24
4.3	Diversin interagiert mit Conductin und CKIe im zellulären Kontext	25
4.4	Diversin bindet an die GSK3 β -Bindungsdomäne von Conductin und Axin	27
4.5	Diversin vermittelt die Interaktion von CKIe mit dem Axin/Conductin-Komplex	28
4.6	Diversin stimuliert den Abbau von β -Catenin	29
4.7	Diversin blockiert die Signalfunktion von β -Catenin in 293-Zellen	30
4.8	Diversin fördert die β -Catenin-Phosphorylierung <i>in vitro</i>	32
4.9	Diversin verbindet katalytisch-aktive CKIe mit dem β -Catenin-Abbaukomplex	33
4.10	Diversin kontrolliert die Ausprägung der Körperachse in <i>Xenopus laevis</i>	34
4.11	Diversin kontrolliert frühe Prozesse der Embryogenese in <i>Danio rerio</i>	35
4.12	Diversin aktiviert Wnt/JNK-Signale und beeinflusst die Konvergenz und Extension im Zebrafisch	40
5	Diskussion	45
5.1	Struktur von Diversin und verwandter Proteine	45
5.2	Funktion von Diversin im klassischen Wnt-Signalweg	46
5.3	Diversin reguliert Wnt/ β -Catenin-Signale durch die Interaktion mit Axin/Conductin und CKIe	47
5.4	Ser45 von β -Catenin wird durch Casein-Kinasen phosphoryliert	48
5.5	Diversin verbindet katalytisch-aktive CKIe mit dem β -Catenin-Abbaukomplex	48
5.6	Dimerisiertes Conductin: Gerüst des funktionellen β -Catenin-Abbaukomplexes	49

5.7	Diversin aktiviert den Wnt/JNK-Signalweg	51
5.8	Ähnlichkeit von Diego und Diversin	52
5.9	Diversin als neuer Regulator des Wnt-Signalnetzwerkes	53
6	Material und Methoden	57
	Molekularbiologische Standardmethoden, Chemikalien, Kits und Geräte	57
	Bakterienstämme	57
	Verwendete Plasmide	58
	Klonierung der Diversin-Expressionskonstrukte	59
	Hefe-2-Hybrid-Screen	60
	Zellkultur und Transfektion	61
	Immunpräzipitation und Immunoblot	62
	Herstellung und Aufreinigung eines Diversin Antiserums	63
	Lef-1/Tcf- und JNK- Reporter-Assays	64
	Xenopus Injektionen	65
	Zebrafisch Injektionen	66
	<i>In situ</i> -Hybridisierung	66
	Abkürzungen	68
7	Literaturverzeichnis	69
8	Anhang	86
	Publikationsliste	86
	Lebenslauf	87
	Erklärung	88
	Danksagung	89

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bisher unbekanntes Protein, Diversin, identifiziert und dessen duale Funktion innerhalb der Wnt-Signaltransduktion beschrieben (siehe auch Schwarz-Romond et al., 2002). Der Name Diversin wurde gewählt, da dieses neue Protein gegenläufige Funktionen in unabhängigen Zweigen des Wnt-Signalnetzwerkes ausübt: Einerseits blockiert Diversin Wnt/ β -Catenin-Signale, andererseits stimuliert es den Wnt/JNK-Signalweg. Durch Interaktion mit Axin/Conductin und Casein-Kinase I ϵ ermöglicht Diversin die Bildung des funktionellen β -Catenin-Abbaukomplexes: Durch Diversin an den Komplex gebundene Casein-Kinase I ϵ bewirkt die initiale Ser45-Phosphorylierung von β -Catenin („priming phosphorylation“) und leitet dadurch die für den β -Catenin-Abbau notwendige GSK3 β -Phosphorylierung ein. Antisense-Morpholino-Experimente im Zebrafisch demonstrieren eine frühe Funktion von Diversin während der Embryogenese: Endogenes Diversin begrenzt die Ausdehnung des Blastula-Organizers, ein durch β -Catenin induziertes Signalzentrum des Embryos. Der Verlust von funktionellem Diversin führt zur Expansion dieses Organizers und verursacht die Dorsalisierung des Embryos. Damit ist Diversin entscheidend an einem der ersten musterbildenden Prozesse während der Embryogenese beteiligt. Die Identifizierung von Diversin-Orthologen in Mensch, Maus und Zebrafisch deutet auf eine strenge Konservierung der Funktion von Diversin im System der Vertebraten hin. Die Funktion von Diversin als Aktivator des alternativen Wnt/JNK-Signalweges wurde ebenfalls in Zellkultur und Zebrafisch-Embryonen charakterisiert. Diversin stimuliert hier die Aktivität der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und kontrolliert Zellwanderungsbewegungen während der Gastrulation im Zebrafisch. Unterstützt werden diese Befunde durch den strukturellen und funktionellen Vergleich zwischen Diversin und Diego, einem kürzlich in *Drosophila* charakterisierten Regulator des Wnt/JNK Signalweges: Beide, Diversin und Diego aktivieren die Wnt/JNK-Signaltransduktion. Im Gegensatz dazu spielt Diego jedoch keine Rolle in der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade. Diese Befunde etablieren Diversin als neuen und essentiellen Bestandteil des Wnt-Signalnetzwerkes, der als intrazelluläre Schaltstelle in den Signalfluss des Wnt/ β -Catenin- und des Wnt/JNK-Signalweges eingreift.