

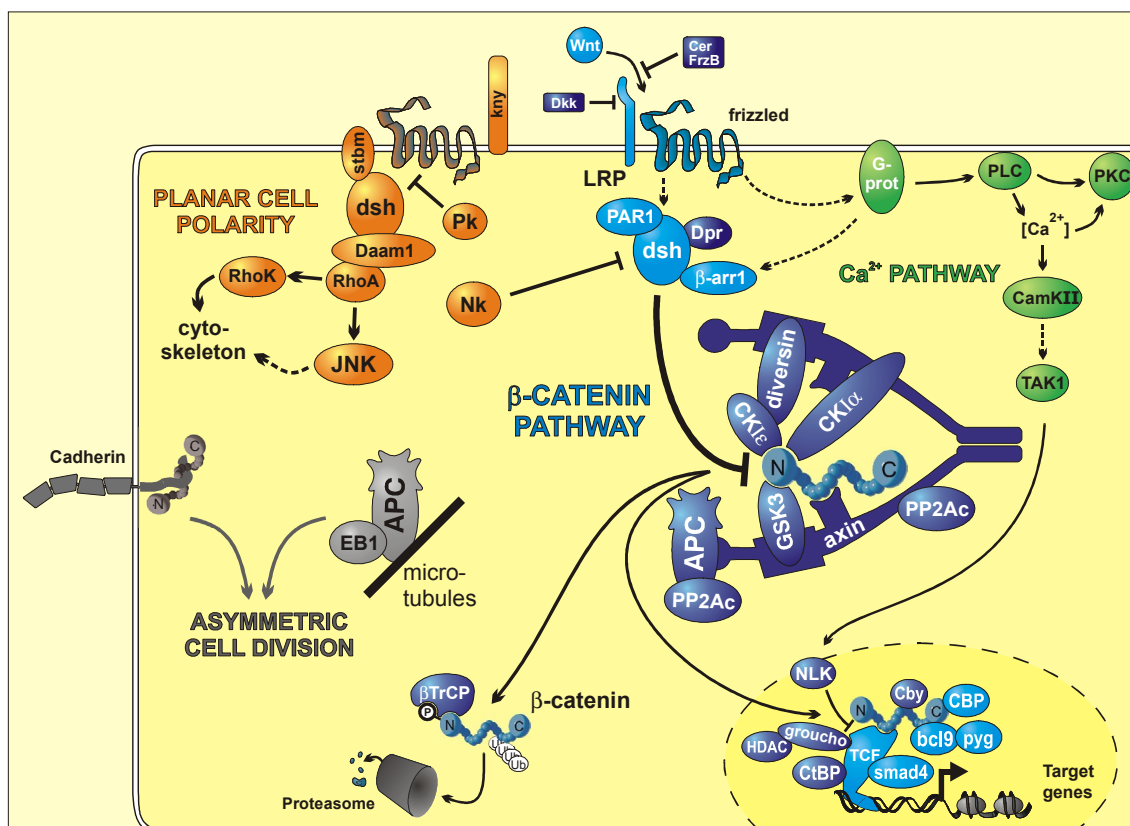
---

## 2 Einleitung

In jedem Organismus existiert eine Vielzahl spezialisierter Zellen, die in Geweben und Organen alle Lebensfunktionen ermöglichen. Verschiedene miteinander vernetzte Signalkaskaden und ihre extrazellulären Liganden (z.B. Wnt, TGF $\beta$ , Hedgehog, TNF, EGF, Cytokine u.a.) vermitteln Informationen zu Position, Funktion und Typ von Zellen innerhalb des Gesamtorganismus. Intra- und interzelluläre Kommunikation kontrolliert sowohl Induktions- und Differenzierungsprozesse während der Embryogenese als auch physiologische Abläufe im adulten Organismus. Die biochemische und genetische Charakterisierung der Signalkaskaden und ihres Zusammenspiels hat in den letzten Jahren zu einem tieferen Verständnis der molekularen Grundlagen biologischer Steuer- und Regelprozesse geführt. Das Wissen um solche physiologischen Abläufe eröffnet bisher unbekannte Interventionsmöglichkeiten, d.h. die Entwicklung neuer Konzepte im Rahmen medizinischer Therapien.

Der Wnt/Wingless-Signaltransduktionsweg stellt eines dieser wichtigen, evolutionär-konservierten Signalsysteme dar (Cadigan & Nusse, 1997; Bienz & Clevers, 2000). Wnt-Signale kontrollieren sehr frühe musterbildende Prozesse während der Embryogenese, sie induzieren Mesodermbildung und viele Organe, und sie steuern die Differenzierung von Stammzellen (Wodarz & Nusse, 1998; De Robertis et al., 2000; Han, 1997; Huelsken & Birchmeier, 2001). Der Wnt-Signalweg ist intrazellulär aufgegliedert, wodurch unterschiedlichste Prozesse gesteuert werden können. Es werden vier Hauptzweige des Wnt-Signalweges unterschieden (Abb.1): (1) Der klassische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg reguliert über die Aktivierung des zentralen Effektormoleküls  $\beta$ -Catenin Differenzierungsschicksale von Zellen und Geweben in der Entwicklung und Differenzierung (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996, Bienz & Clevers, 2000). Zielgene des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals sind die Proto-Onkogene Cyclin-D1 und c-myc sowie Metalloproteinasen wie Matrilysin und MMP-7 (Tetsu & McCormick, 1999; Brabletz et al., 1999; Crawford et al., 1999; He et al., 1998). Eine unkontrollierte Aktivierung dieses Zweiges des Wnt-Signalweges wird für die Entstehung und Progression verschiedener Tumore verantwortlich gemacht (siehe weiter unten, und (Gumbiner, 1997; Polakis, 2000). (2) Der Wnt/JNK-Signalweg kontrolliert durch Umorganisation des Zytoskeletts Gestalt und Polarität von Epithelzellen und wird deshalb auch als planarer Zellpolaritäts-Signalweg (PCP) bezeichnet (Boutros et al., 1998; Sokol, 2000). (3) Durch die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium regulieren Wnt-Signale Enzyme

wie PLC, PKC und CamKII und greifen so in Zelladhäsionsprozesse ein (Kuhl et al., 2000; Winklbauer et al., 2001). (4) In einem vierten Signalweg sind klassische Wnt-Komponenten wie Frizzled, GSK3 $\beta$  und APC an der Orientierung der mitotischen Spindel bzw. der asymmetrischen Zellteilungen beteiligt (Bienz, 1999; Fodde et al., 2001; Lu et al., 2001).



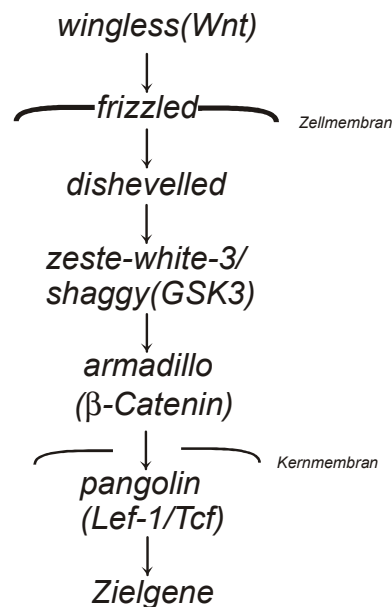
mit freundlicher Genehmigung von J.Hülsken

Abbildung 1: Übersicht zur intrazellulären Diversifizierung der durch Wnt-Liganden induzierten Signalprozesse (Huelsken & Behrens, 2000).

## 2.1 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg

Die Wnt/Wingless-vermittelte Signaltransduktion wurde ursprünglich durch genetische Analysen in *Drosophila* entdeckt. Mutation von Genen des Wnt-Signalweges führt zu Störungen der Segmentierung während der Larvenentwicklung (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980; Riggleman et al., 1990; Siegfried et al., 1994). Die funktionelle Reihenfolge der beteiligten Genprodukte wurde in epigenetischen Experimenten etabliert (Abb. 2): Signale des Liganden Wingless (Wnt) (Nusse & Varmus, 1982; Nusse et al., 1984; Rijsewijk et al., 1987) aktivieren Frizzled-Rezeptoren (Bhanot et al., 1996). Intrazellulär wird das Signal über Dishevelled (Dsh) und Shaggy/Zeste-White-3 (GSK3 $\beta$ ) (Perrimon & Mahowald, 1987) auf Armadillo ( $\beta$ -Catenin) (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980)

übertragen. Die Interaktion von Armadillo mit dem Transkriptionsfaktor Pangolin (Lef-1/Tcf's) (Brunner et al., 1997) vermittelt die Signalübertragung in den Zellkern und die Aktivierung von Wnt-Zielgenen.



**Abbildung 2: Schema der ursprünglich in *Drosophila* identifizierten Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionskaskade.** Die Namen der homologen Gene in Vertebraten sind in Klammern angeführt.

Unser Bild des Wnt/β-Catenin-Weges ist in den letzten Jahren durch die Entdeckung neuer Moleküle komplexer geworden. Neben den ca. 20 Wnt-Liganden, die an die Familie der Frizzled-Rezeptoren binden, wurden Arrow (LRP5 und LRP6 in Vertebraten) als essentielle Korezeptoren identifiziert (Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000). Als weitere extrazelluläre Effektoren wurden Dickkopf, Cerberus, Frzbs und Proteoglykane charakterisiert (Piccolo et al., 1999; Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997; Lin & Perrimon, 1999; Tsuda et al., 1999). Mit Naked cuticle, Par-1, Frodo und Dapper sind verschiedene Regulatoren von Dishevelled isoliert worden, die für die Verzweigung des Wnt/β-Catenin- und des Wnt/JNK-Signals verantwortlich gemacht werden (Cheyette et al., 2002; Gloy et al., 2002; Sun et al., 2001; Zeng et al., 2000). Entscheidende Fortschritte wurden auch in der Analyse des β-Catenin-Abbauflexes erzielt. Dieser Proteinkomplex ermöglicht die N-terminale Phosphorylierung von β-Catenin (Armadillo) durch GSK3β und leitet so den proteasomalen Abbau von β-Catenin ein (Behrens et al., 1998; Hart et al., 1998; Kishida et al., 1998; Zeng et al., 1997). Kürzlich wurde gezeigt, dass die für den β-Catenin-Abbau notwendige „priming phosphorylation“ durch Casein-Kinasen erfolgt (Amit et al., 2002; Liu

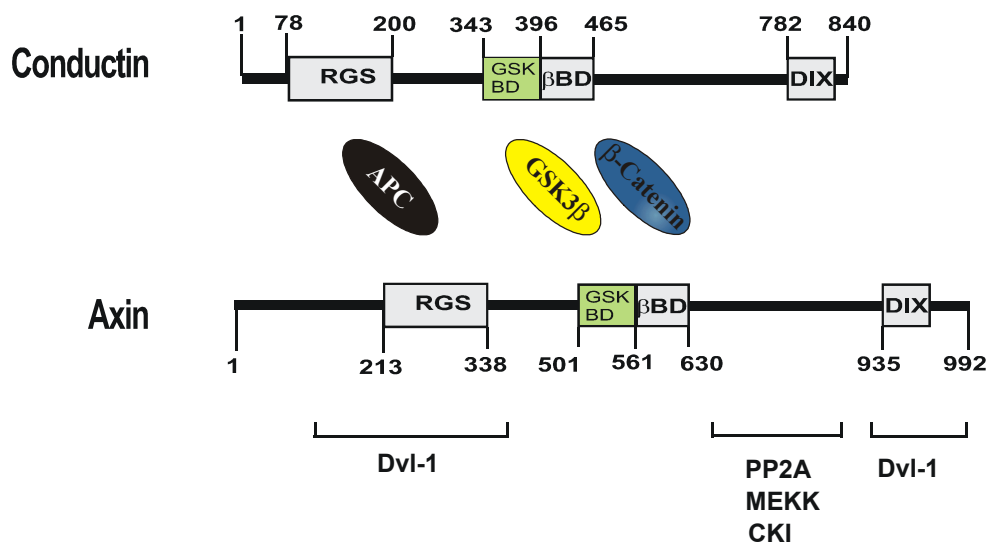
et al., 2002; Schwarz-Romond et al., 2002), siehe auch die klassische  $\beta$ -Catenin Kaskade im Zentrum von Abb. 1).

### ***$\beta$ -Catenin und die Signalübertragung in den Zellkern***

Das zu *Drosophila* Armadillo orthologe Protein  $\beta$ -Catenin besitzt zwei zelluläre Funktionen. Ursprünglich wurde  $\beta$ -Catenin in Immunpräzipitaten mit Antikörpern gegen das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin identifiziert (Nagafuchi & Takeichi, 1989; Ozawa et al., 1989). Hier verbindet  $\beta$ -Catenin als wesentlicher Bestandteil der Zell-Zelladhäsion in *Adherens Junctions* Transmembranproteine der Cadherin-Familie über  $\alpha$ -Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett (für eine Übersicht siehe Huelsken et al., 1994; Takeichi et al., 2000; Nagafuchi, 2001). Die Signalfunktion von  $\beta$ -Catenin wurde in unserem Labor durch die Aufklärung der Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren der Lef-1/Tcf-Familie charakterisiert (Behrens et al., 1996). Die zwölf zentral gelegenen „Armadillo-Repeats“ von  $\beta$ -Catenin vermitteln die funktionell wichtigen Interaktionen mit Cadherinen, APC, Axin/Conductin und Lef-1/Tcfs. Die direkte Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Lef-1/Tcfs erlaubt die Bildung eines "zweigeteilten" Transkriptionsfaktors: Während Lef-1/Tcfs durch die HMG-Domäne den Kontakt zur DNA herstellen, aktiviert  $\beta$ -Catenin über seine N- und C-terminalen Transaktivierungsdomänen die Expression von Zielgenen (Tetsu & McCormick, 1999; Brabletz et al., 1999; Crawford et al., 1999; He et al., 1998). Die Aktivität des  $\beta$ -Catenin/Lef-1/Tcf-Komplexes wird im Zellkern durch spezifische Modulatoren reguliert (Roose & Clevers, 1999). So wurden kürzlich in *Drosophila* das zu Bcl9-homologe Protein Legless und nukleäres Pygopus als Wnt-spezifische Ko-Aktivatoren identifiziert (Kramps et al., 2002; Parker et al., 2002; Thompson et al., 2002). Pontin und Reptin interagieren mit  $\beta$ -Catenin und vermitteln als "Brückenmoleküle" die Interaktion mit dem TATA-Bindungsprotein (Bauer et al., 2000). Postrtranslationale Modifikationen durch die Histon-Acetylase CBP und die MAP-Kinase NLK regulieren ebenfalls die Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Lef/Tcf-Komplexes (Ishitani et al., 1999; Meneghini et al., 1999). In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin können Lef-1/Tcf gemeinsam mit Ko-Repressoren wie Groucho oder CtBP die Expression von Wnt-Zielgenen reprimieren (Brannon et al., 1999; Cavallo et al., 1998; Sharpe et al., 2001). Dies wird durch die Mutation von Tcf-3 im Zebrafisch („headless“-Mutante) illustriert: Die unkontrollierte Aktivierung von Wnt-Zielgenen durch die gestörte TCF-3-Repressoraktivität führt zu Fehlbildungen des Kopfes (Kim et al., 2000).

### **Der Axin/APC-Komplex**

Die Charakterisierung von Conductin und dem funktionell homologen Axin trug entscheidend zum Verständnis des  $\beta$ -Catenin-Abbaus bei. Conductin und Axin verbinden als „Gerüstmoleküle“ die für den  $\beta$ -Catenin-Abbau notwendigen Komponenten. Beide interagieren mit dem Tumorsuppressor-Protein APC, der Serin/Threonin-Kinase GSK3 $\beta$  und mit  $\beta$ -Catenin. Diese komplexen Interaktionen sind für die strikte Kontrolle von zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin verantwortlich und scheinen die effiziente N-terminale Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu ermöglichen (Ikeda et al., 1998; Yost et al., 1996). Während GSK3 $\beta$  Thr41, Ser37 und Ser33 im N-Terminus von  $\beta$ -Catenin phosphoryliert, wurde erst kürzlich die Phosphorylierung von Ser45 durch Casein-Kinasen gezeigt (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002; Schwarz-Romond et al., 2002). Diese „priming“-Phosphorylierung ist Voraussetzung für die nachfolgenden GSK3 $\beta$ -Phosphorylierungsschritte. So modifiziertes  $\beta$ -Catenin wird von der Ubiquitin-Ligase  $\beta^{\text{TRCP}}$  erkannt, ubiquityliert und in Proteasomen abgebaut (Aberle et al., 1997; Hart et al., 1998; Kitagawa et al., 1999). Die APC-, GSK3 $\beta$ - und die  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomänen von Conductin und Axin sind stark konserviert (siehe Abb. 3). N-terminal gelegene Bereiche mit Homologie zu RGS (Regulator of G-Protein-Signaling)-Proteinen vermitteln die Interaktion mit APC (Behrens et al., 1998). Die Strukturanalyse der RGS-Domäne von Axin zeigte, dass APC mit konservierten Aminosäuren außerhalb der für die Regulation von G-Proteinen notwendigen Aminosäuren interagiert (Spink et al., 2000). Entsprechend konnte keine Funktion der RGS-Domänen von Axin und Conductin in der Regulation von G-Proteinen nachgewiesen werden. Zwei zentrale Domänen von Axin und Conductin sind für die Interaktion mit GSK3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin verantwortlich. Im C-Terminus besitzen Axin und Conductin eine DIX (Dishevelled und Axin)-Domäne, die Homo- und Hetero-Dimerisierung bewirken kann (Hsu et al., 1999). Eine Vielzahl weiterer Axin/Conductin-Bindungspartner wurde in den letzten Jahren beschrieben. Die physiologische Relevanz dieser Interaktionen muss allerdings noch nachgewiesen werden. Eine Übersicht zur Domänen-Struktur von Axin/Conductin und den wichtigsten Bindungspartnern gibt die Abbildung 3.



**Abbildung 3: Strukturvergleich von Conductin und Axin und deren Bindungspartnern.** Die Zahlen repräsentieren die Aminosäureposition. Gemeinsame Bindungspartner sind schematisch zwischen den Molekülen dargestellt. Die C-terminalen Dix-Domänen vermitteln die Homo- und Heterodimerisierung von Axin und Conductin. Weitere spezifische Interaktionspartner von Axin und deren identifizierte Bindungsdomänen sind unterhalb von Axin angegeben.

Conductin wurde in unserem Labor als direkter  $\beta$ -Catenin-Interaktionspartner im Hefe-2-Hybrid-Screen isoliert (Behrens et al., 1998). Zeitgleich führte die Charakterisierung der natürlich vorkommenden "fused"-Mutation der Maus zur Klonierung von Axin (Zeng et al., 1997). Homozygoter Verlust von "fused"/Axin verursacht embryonale Lethalität etwa am Tag acht der Embryonalentwicklung. Interessanterweise zeigen „fused“-Embryonen die Anlage mehrfacher Primitivstreifen, Indiz für eine gestörte Anlage der Körperachse. Die Deletion von Conductin in der Maus zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp. Ursache dafür ist möglicherweise die funktionelle Redundanz zwischen Axin und Conductin. Interessanterweise verhindert die zusätzliche Deletion eines Axin-Allels in Conductin-homozygoten Mäusen die korrekte Anlage und Ausbildung der Gesichts- und Kopfstrukturen (Boris Jerchow und Walter Birchmeier, persönliche Mitteilung). Unterschiede zwischen Axin und Conductin zeigten sich auch im Expressionsmuster und in der transkriptionellen Regulation dieser Moleküle. Der Conductin-Promotor ist durch Wnt-Signale induzierbar, sodass Conductin offensichtlich an einem "Auto-Inhibitory-Loop" innerhalb des Wnt-Signalweges beteiligt ist (Lustig et al., 2002). Ähnliche Regulationsmechanismen konnten für Axin nicht nachgewiesen werden.

Die Bindung des Tumorsuppressor-Proteins APC an  $\beta$ -Catenin deutete auf eine Funktion von APC in der Regulation von zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin hin (Huelsen et al., 1994;

Munemitsu et al., 1995; Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993). Unser Labor konnte zeigen, dass APC auch direkt mit Conductin interagiert. Diese Interaktion wird durch drei „SAMP-Repeats“ von APC vermittelt und stimuliert die Phosphorylierung und den Abbau von  $\beta$ -Catenin (Behrens et al., 1998; von Kries et al., 2000). Der Verlust der „SAMP-Repeats“ verhindert die Interaktion von APC mit Axin/Conductin, und führt zur Störung des  $\beta$ -Catenin-Abbaus (Kawahara et al., 2000; von Kries et al., 2000). APC wurde ursprünglich durch genetische Analysen von FAP-Familien (familiäre, adenomatöse Polyposis) identifiziert (Grodin et al., 1991; Kinzler et al., 1991). FAP-Patienten weisen Keimbahnmutationen in einem Allel des APC-Gens auf. Somatische Mutationen des zweiten APC-Allels erwiesen sich als geschwindigkeitsbestimmend für die Tumorgenese (Ichii et al., 1992). Ausserdem wurden in 80% aller sporadischen Kolon-Tumoren APC-Mutationen beobachtet (Kinzler & Vogelstein, 1996). Die Mehrzahl dieser Mutationen führt zur Verkürzung des APC-Proteins und dem Verlust der „SAMP-Repeats“ (Polakis, 1995). Die daraus resultierende Stabilisierung des Proto-Onkogens  $\beta$ -Catenin bewirkt die unkontrollierte Expression von Wnt-Zielgenen. Der Verlust von APC führt auch in der Maus zu intestinalen Tumoren (Moser et al., 1992). Im Gegensatz dazu entwickelten Mäuse, die ein längeres APC mit einem „SAMP-Repeat“ exprimieren, keine intestinalen Neoplasien (Smits et al., 1999). APC wirkt auch auf andere zelluläre Prozesse ein, wie die epitheliale Migration, die Orientierung der mitotischen Spindel, die genomische Stabilität und den intrazellulären Transport (für eine Übersicht siehe Seidensticker & Behrens, 2000). Dass APC auch durch andere zelluläre Vorgänge als Tumorsuppressor wirkt, kann daher nicht ausgeschlossen werden.

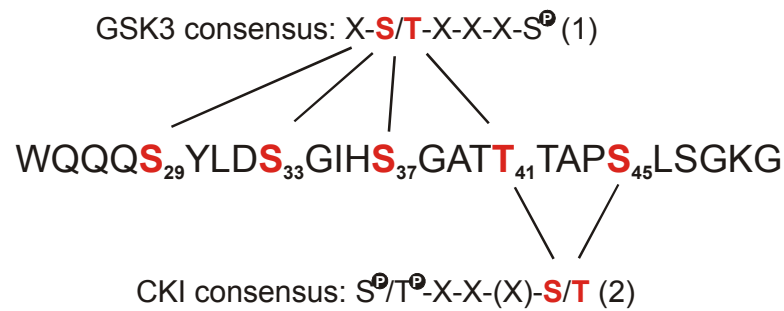
Eine weitere wichtige Komponente des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes ist die Serin/Threonin-Kinase Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3). GSK3 wurde ursprünglich als regulatorische Kinase der Glykogen-Synthase identifiziert (Embi et al., 1980). Zu ihren spezifischen Substraten gehören auch Zytoskelettproteine und Transkriptionsfaktoren. Die Proteine der GSK3-Familie sind stark konserviert: In Vertebraten wurden zwei GSK-3 Gene,  $\alpha$  und  $\beta$ , identifiziert (Plyte et al., 1992). GSK3 $\beta$  spielt einerseits eine wichtige Rolle innerhalb der Insulin-gesteuerten metabolischen Homöostase (Cross et al., 1995). Andererseits weist die Beteiligung des Drosophila-Orthologs shaggy/zeste-white-3 auf eine zentrale Funktion von GSK3 $\beta$  innerhalb der Wnt-Signaltransduktion hin. Innerhalb des metabolischen Signalweges steuert Insulin über AKT/PKB die Aktivität von GSK3 $\beta$ . Ser9-Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  erzeugt ein intramolekulares Pseudosubstrat, welches die Substrat-Bindung von GSK3 $\beta$  verhindert (Dajani et al., 2001; Frame et al., 2001). Innerhalb der Wnt-Kaskade ist  $\beta$ -Catenin das wichtigste Substrat der GSK3 $\beta$ . Die Konsequenz dieser GSK3 $\beta$ -vermittelten

Phosphorylierung ist der proteasomale Abbau von  $\beta$ -Catenin. Axin und APC wurden ebenfalls als Substrate von GSK3 $\beta$  identifiziert (Ikeda et al., 2000; Jho et al., 1999; Willert et al., 1999; Yamamoto et al., 1999). Die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierungen ist jedoch noch weitgehend unklar. Die Substratspezifität von GSK3 $\beta$  wird durch die Einbindung in spezifische Proteinkomplexe gewährleistet (Cohen & Frame, 2001). So kann GSK3 $\beta$ , die nicht an Axin/Conductin gebundenen ist,  $\beta$ -Catenin nur sehr schlecht phosphorylieren (Yamamoto et al., 1999). Umgekehrt ist an Axin gebundene GSK3 $\beta$  nicht durch AKT/PKB regulierbar. Entsprechend führt AKT/PKB-Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  nicht zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin (Ding et al., 2000).

### ***$\beta$ -Catenin- und Axin/Conductin- Mutationen in Tumoren***

Das häufige Auftreten von APC-Mutationen in Kolontumoren deutet auf eine Beteiligung von  $\beta$ -Catenin-Signalen an der Tumorentstehung hin. Der negative Wnt/ $\beta$ -Regulator APC wirkt dabei als Tumorsuppressorgen. Auch anderen Regulatoren der Wnt-Signaltransduktion wurde eine Funktion als Tumorsuppressor-Gen bzw. Proto-Onkogen nachgewiesen. Die Identifizierung inaktivierender Mutationen von Axin und Conductin in Tumoren bestätigte deren inhibitorische Funktion in der Wnt-Signaltransduktion (Liu et al., 2000; Satoh et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurden aktivierende Mutationen von  $\beta$ -Catenin in Tumoren charakterisiert (Polakis, 2000; siehe auch Tabelle 1). Betroffen sind hier N-terminale Serin- und Threoninreste (Ser33, Ser37, Thr41, Ser45), deren Beteiligung am proteasomalen Abbau nachgewiesen werden konnte. Mutationen dieses Bereiches verhindern die den  $\beta$ -Catenin-Abbau einleitende Phosphorylierung und die anschließende Erkennung durch die Ubiquitinligase  $\beta^{\text{TRCP}}$ . Daraus resultiert die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und Zellkern, was zur unkontrollierten Aktivierung von Wnt-Zielgenen und zur neoplastischen Transformation führt (Behrens, 1999; Morin, 1999; Rubinfeld et al., 1997). Experimentell bewiesen wurde das onkogene Potential von N-terminal deletiertem  $\beta$ -Catenin durch die Überexpression in der Haut: Transgene Mäuse entwickeln Tumore in betroffenen Hautderivaten (Gat et al., 1998). Wie bereits erwähnt stellen Thr41, Ser37 und Ser33 von  $\beta$ -Catenin typische GSK3 $\beta$ -Phosphorylierungsstellen dar. Jedoch benötigt GSK3 $\beta$  im Allgemeinen eine „priming“-Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten, die vier Positionen C-terminal von der zu phosphorylierenden Aminosäure gelegen sind (Abb. 4).





**Abbildung 4: Schematische Darstellung der N-terminalen  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierungsstellen.** Im Gegensatz zu den putativen GSK3 $\beta$ -Erkennungssequenzen Ser29, Ser33, Ser37 und Thr41 stellt Ser45 eine CKI-Erkennungssequenz dar [modifiziert nach Kennelly & Krebs, 1991 (1) und Pinna & Ruzzene, 1996 (2)].

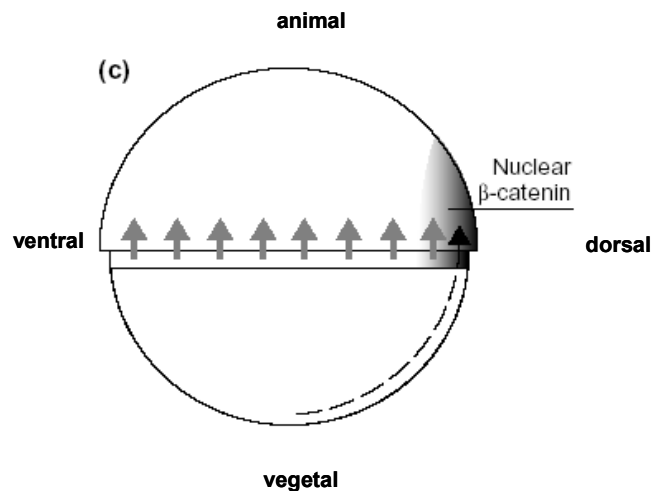
Ser45 entspricht eher einer Casein-Kinase-Erkennungssequenz (vergleiche Abb. 4), und tatsächlich konnte kürzlich die Beteiligung von Casein-Kinasen an der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung gezeigt werden (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002; Schwarz-Romond et al., 2002). Diese Autoren schlagen ein Modell vor, in dem Casein-Kinasen durch „priming“-Phosphorylierung von Ser45 die schrittweise Phosphorylierung von Thr41, Ser37, Ser33 und Ser29 durch GSK3 $\beta$  einleiten. Die hier vorgestellten Befunde zur Interaktion von Diversin mit Axin/Conductin und Casein-Kinase Ie waren die Voraussetzung für die Identifizierung der postulierten „Axin-assoziierten Ser-45-Kinase“ durch Amit et al. (Amit et al., 2002). Die in Tumoren identifizierten  $\beta$ -Catenin-Mutationen stehen mit diesem Modell in Einklang. Statistisch gesehen ist Ser45 ebenso häufig von Mutationen betroffen, wie die übrigen am  $\beta$ -Catenin-Abbau beteiligten Serin- und Threoninreste (Tabelle 1).

Gewebe	Frequenz	D32	S33	G34	I35	H36	S37	T41	S45	S47	Andere <sup>1</sup>	$\Delta^2$
kolorektal	21/450		1	2				6	9			3
kolorektal <sup>3</sup>	20/85		2	1				3	6			8
kolorektal (HNPCC)	14/42	2		2			1	2	7			
kolorektal mit MSI	13/86							2	9			2
desmoid, sporadisch	26/56							11	14		1	
endometrial	89/335	12	12	11			28	14	11			1
Ovar	23/105	3	3	2			10	2		2	1	
Magen und GI-Trakt	127/305	20	26	11			57	7			3	3
Gallenblase	11/37	1	3	1			5	1				
hepatozellulär	143/906	25	14	13	3	4	10	22	35	1		16
Hepatoblastom	91/147	5	2	10	1		2	7	2			62
Wilm's tumor (Niere)	27/175		1			2		2	19			3
Lunge	6/213						4		1		1	
Medulloblastom	7/154		4	1			2					
Pilomatrikom	15/27	5	4	3			2	1				
Pankreas	39/76	13	5	9			10	2				
Prostata	12/242	3	3					3	2			1
Melanom	1/65								1			
Biliary Trakt	12/114		1				2	5	4			
Harnwege	1/4								1			
<b>Total</b>	<b>698/3624</b>	<b>89</b>	<b>81</b>	<b>66</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>133</b>	<b>90</b>	<b>121</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>99</b>

**Tabelle 1:  $\beta$ -Catenin Mutationen in humanen Tumoren.** Die ursprünglich von P. Polakis zusammengestellten Mutationen (Polakis, 2000) wurden um die im Zeitraum September 2000 bis Juni 2002 publizierten Daten ergänzt. <sup>1</sup>Mutationen, die hier nicht aufgeführte Aminosäurereste betreffen. <sup>2</sup>Mutationen, die zur Deletion des gesamten dritten Exons von  $\beta$ -Catenin und damit sämtlicher für den Abbau notwendiger Aminosäurereste führt. <sup>3</sup>Mutationen in kolorektalen Karzinomen, in denen keine APC-Mutation nachgewiesen werden konnte.

### ***Wnt-Signale in der Embryogenese von Frosch, Fisch und Maus***

In *Xenopus*, Zebrafisch und der Maus sind Wnt-Signale an der Etablierung der dorso-ventralen Identität des frühen Embryos beteiligt (De Robertis et al., 2000; Schier, 2001; Huelsken & Birchmeier, 2001). Das erste sichtbare Zeichen dieser Prozesse ist der gerichtete Transport von Membranvesikeln entlang der Mikrotubuli zur zukünftigen dorsalen Seite des Embryos. Dieser Transport „dorsal“ determinierender Agenzien korreliert mit der Aktivierung des klassischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges: in *Xenopus* und Zebrafisch wurden Stabilisierung und Kernlokalisierung von  $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit des Vesikeltransportes beschrieben (Larabell et al., 1997; Miller et al., 1999; siehe Abb. 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der frühen, zur Etablierung des dorsalen Organizers führenden Prozesse im Vertebraten-Embryo.** Der Transport einer „dorsalen“ Komponente korreliert mit der Stabilisierung und Kernlokalisierung von  $\beta$ -Catenin (modifiziert nach Schier, 2001).

Nukleäres  $\beta$ -Catenin kontrolliert in der frühen Embryogenese die Expression von Genen wie z.B. *Siamois*, *Xtwin*, *Nodal-related 3* im Frosch bzw. *Bozozok* und *Squint* im Fisch. Damit trägt  $\beta$ -Catenin zur Etablierung der als Nieuwkoop-Center im Frosch bzw. Blastula-Organizer im Fisch bezeichneten dorsalen Strukturen des Embryos bei. In *Xenopus* kontrolliert maternales  $\beta$ -Catenin, in Kooperation mit anderen, endodermalen Faktoren wie z.B. *VegT* oder *Vg1*, die graduelle Expression von *Nodal* und *Nodal-related* Faktoren, was zur Induktion von dorsalem und ventralem Mesoderm führt. Die frühe induktive Funktion von  $\beta$ -Catenin ist unumstritten: Der Verlust von maternalem  $\beta$ -Catenin ventralisiert *Xenopus*-Embryonen, d.h. dorso-anteriore Strukturen werden nicht ausgebildet (Heasman et al., 1994). Umgekehrt induziert die ventrale Überexpression von  $\beta$ -Catenin die Ausbildung einer zweiten vollständigen Körperachse. Dies gestattet ein relativ einfaches Studium von Komponenten des Wnt-Signalweges im sogenannten „Achsen-Duplikationstest“ (Sokol et al., 1991; Smith & Harland, 1991). Blockierende, mit der Funktion von  $\beta$ -Catenin interferierende Komponenten können nach dorsaler Injektion die Ausbildung der endogenen Körperachse verhindern (Ventralisierung). Die ventrale Injektion von aktivierenden, d.h.  $\beta$ -Catenin stabilisierenden Komponenten in frühe Embryonalstadien induziert die Ausprägung einer zweiten Körperachse (Dorsalisierung). Wnt-Komponenten unterschiedlicher Spezies verhielten sich innerhalb dieses biologischen Systems in der Regel funktionell komplementär, was den hohen Konservierungsgrad dieser Signalkaskade bestätigt.

Auch im **Zebrafisch** gibt es weitere experimentelle Hinweise für die Beteiligung von Komponenten des klassischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges an der Etablierung dorso-ventraler Identität, obwohl das formale Experiment zum Nachweis der  $\beta$ -Catenin-Funktion, die Blockade des maternalen Proteins hier noch aussteht. Stärkstes Indiz für die Notwendigkeit von maternalem  $\beta$ -Catenin für die Etablierung des Blastula-Organisers im Zebrafisch liefert die Mutation von Ichabod. Maternal bereitgestelltes Ichabod ist für die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern verantwortlich. Der Verlust von Ichabod blockiert die Signalfunktion von  $\beta$ -Catenin, was zur Ventralisierung der Embryonen führt (Kelly et al., 2000). Einen wichtigen Hinweis auf die Beteiligung weiterer Wnt-Komponenten an diesen frühen, musterbildenden Prozessen gab die experimentelle Blockade von endogenem Axin durch Antisense-Morpholinos. Injizierte Embryonen waren durch die fehlende Anlage des Blastula-Organizers stark dorsalisiert (Heisenberg et al., 2001). Dies kann durch die Expansion bzw. ektopische Expression dorsal-exprimierter Gene wie Goosecoid und Floating head bzw. durch den Verlust ventral-exprimierter Gene wie Eve1 oder Gata2 während der Embryogenese sichtbar gemacht werden.

Der  $\beta$ -Catenin-„knockout“ in der **Maus** belegt die maßgebliche Beteiligung von Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalen an der Etablierung der embryonalen Körperachse. Der Verlust von  $\beta$ -Catenin arretiert Maus-Embryonen im Einzylinder-Stadium und verhindert später die Mesoderminduktion. Die falsch lokalisierte bzw. fehlende Expression anteriorer Markergene am Tag 5,5 der Embryogenese zeigt, dass  $\beta$ -Catenin eine Funktion in der Etablierung der anterior-posterioren Körperachse zukommt (Huelsen et al., 2000).

## 2.2 Der Wnt/JNK-Signalweg

Morphologie, Teilungsebene, Funktion und Bewegung von Zellen werden entscheidend durch ihre Polarität bestimmt. Im Gegensatz zur gut untersuchten apikal-basalen Polarität in Epithelien, ist über die als „planare Zellpolarität“ (PCP) bezeichnete zelluläre Ausrichtung innerhalb eines epithelialen Verbandes sehr wenig bekannt (Adler, 1992; Gubb, 1993). Die Flügelentwicklung in *Drosophila* stellt ein sehr gut untersuchtes Modell zum Studium planarer Zellpolarität dar. Dieses Gewebe entwickelt sich aus einer epithelialen Zellschicht, die zu Beginn nur entlang ihrer apikal-basalen Achse polarisiert ist. Mit fortschreitender Entwicklung wird jede einzelne Zelle innerhalb des epithelialen Verbandes polarisiert, was durch die distale Ausbildung eines Aktin-reichen Trichoms manifestiert wird. Bemerkenswert ist die systematische, parallele Ausrichtung dieser Trichome (für eine Übersicht siehe Mlodzik, 1999; Mlodzik, 2000). Ähnliche Beispiele planarer Zellpolarität sind die gerichtete

Anordnung der Ommatidien im Insektenauge bzw. Hautderivate in Vertebraten wie Fischschuppen, Vogelfedern oder Stereozilien von Sinneszellen innerer Organe. Störungen planarer Polarität, z.B. im Innenohr-Epithel des Menschen, führen zur Taubheit (Eaton, 1997). Genetische Screens in *Drosophila* definierten eine Kern-Gruppe sogenannter PCP-Gene, von denen Frizzled, Dishevelled und Flamingo bisher am Besten charakterisiert sind und einen von Wnt/ $\beta$ -Catenin unabhängigen Signalweg repräsentieren (Adler, 1992; Gubb, 1993; Eaton, 1997). Mittlerweile sind mehr als ein Dutzend PCP-Gene mit zum Teil unbekannter Funktion beschrieben, z.B. Fuzzy, Inturned, RhoA, Rho-Kinase, Flamingo, van Gogh/Strabismus, Diego (Shulman et al., 1998), was auf die grosse Komplexität dieser Prozesse hinweist. Extrazelluläre Liganden des PCP-Signals sind im Gegensatz zum Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg derzeit noch unbekannt. Biochemische Experimente implizieren bisher nicht charakterisierte Wnt-Moleküle (Bhanot et al., 1996). Genetische und biochemische Befunde zeigen, dass PCP-Signale unterhalb von Frizzled und Dishevelled über Daam1 an RhoA, einer GTPase der Rho-Familie, gekoppelt sind (Habas et al., 2001; Fanto et al., 2000). Zusätzlich konnten Komponenten der JNK-Kaskade, d.h. DJNKK, DJNK und Jun, den Verlust von Dishevelled in genetischen Experimenten kompensieren (Boutros et al., 1998; Strutt et al., 1997). Übereinstimmend mit diesen genetischen Daten aktivieren Frizzled und Dishevelled in biochemischen Experimenten RhoA und JNK-abhängige Transkription (Habas et al., 2001; Li et al., 1999). Abb. 6 gibt eine schematische Übersicht zu den bisher charakterisierten Komponenten des Wnt/JNK-Signalweges. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die planare Zellpolarität kontrollieren, noch weitgehend ungeklärt.

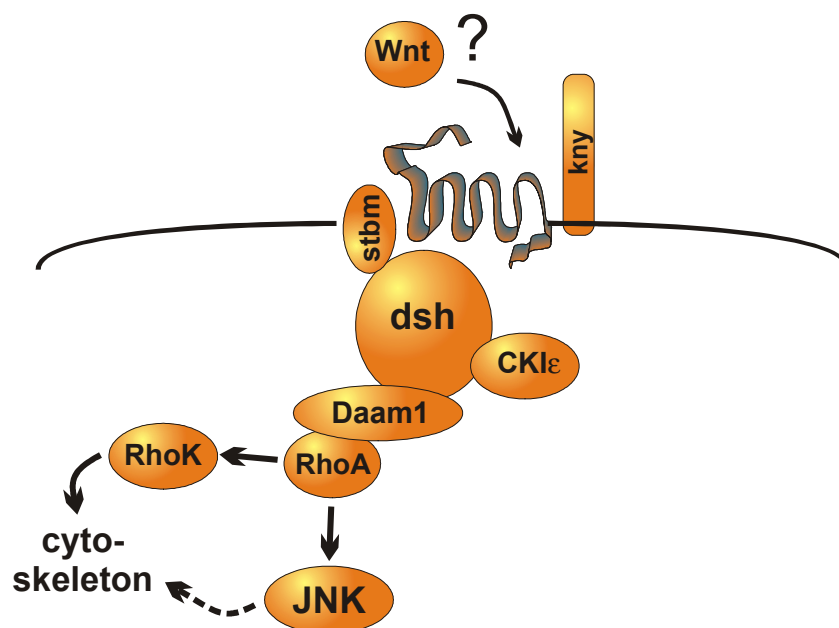


Abbildung 6: Schematische Darstellung der an der Wnt/JNK-Signalübertragung beteiligten Komponenten. (siehe Huelsken & Behrens, 2000).

Während der Gastrulation des Vertebratenembryo kontrollieren Wnt/JNK-Signale morphogenetische Zellbewegungen, die als Konvergenz und Extension bezeichnet werden (Tada & Smith, 2000). Eine genauere Analyse dieser Prozesse führte zu der Schlussfolgerung, dass planare Zellpolarität in *Drosophila* und die Gastrulationsbewegungen in Vertebraten von ähnlichen Signalwegen kontrolliert werden (für eine Übersicht siehe Sokol, 2000). Im Zebrafisch bewies die Charakterisierung der Mutationen von Silberblick (Wnt11)- und Knypek- (ein extrazellulärer Kofaktor von Wnt-Liganden) die Beteiligung von Wnt/JNK-Komponenten an der Gastrulation in Vertebraten (Heisenberg et al., 2000; Topczewski et al., 2001). Im Weiteren störten strukturell identische Dishevelled-Konstrukte sowohl planare Zellpolarität in *Drosophila* als auch die Zellwanderungsbewegungen in *Xenopus* (Djiane et al., 2000; Wallingford et al., 2000).

### **2.3 Verbindungen zwischen dem Wnt/ $\beta$ -Catenin- und dem Wnt/JNK- Signalweg**

Die Vielfältigkeit der durch Wnt-Liganden induzierten Effekte zeigt, dass Zellen die Fähigkeit zur differentiellen Interpretation von Signalen besitzen müssen. Die Spezifizierung und Diversifizierung dieser Signale findet auf allen Ebenen der Signalweiterleitung statt. Bereits im extrazellulären Milieu wird die Ligand/Rezeptor-Interaktion durch sezernierte Wnt-Antagonisten wie z.B. Cerberus, Frzbs, Dkk1, und Kofaktoren wie z.B. Proteoglykane beeinflusst (Piccolo et al., 1999; Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997; Lin & Perrimon, 1999; Tsuda et al., 1999). Die Existenz von bis zu zwanzig verschiedenen Wnt-Liganden und acht Frizzled-Rezeptoren im menschlichen Genom erhöht die Variabilität der Signalübertragung (Miller, 2002; siehe auch Wnt-Homepage). Mitglieder der Wnt-Familie werden funktionell in zwei Klassen unterteilt. Das sind auf der einen Seite „transformierende“ Wnts, zu denen neben dem prototypischen Wnt1 auch Wnt3a und Wnt8 gehören. Demgegenüber stehen die „nicht-transformierenden“ Wnts, zu denen Wnt5a oder Wnt11 gehören (Shimizu et al., 1997). Transformierende Wnts aktivieren den  $\beta$ -Catenin-Weg, und Wnt5a und Wnt11 übertragen ausschliesslich alternative Wnt-Signale (innerhalb des Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. Wnt/JNK-Signalweges). Die Signalspezifizierung setzt sich auf der Rezeptorebene fort. So führte der Verlust von Frizzled in *Drosophila* ausschliesslich zu Störungen der planaren Zellpolarität. Erst der kombinierte Verlust von Frizzled und dFz2 verursachte einen zur Wingless-Mutation identischen Segmentpolaritäts-Phänotyp (Bhanot et al., 1996; Bhanot et al., 1999). Weitergehende Befunde etablierten Dishevelled als „Knotenpunkt“, von dem sich der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Wnt/JNK-Weg abzweigen (für eine Übersicht siehe Sokol, 2000).

Interessanterweise wird Dishevelled, die erste intrazelluläre Signalstation in Abhängigkeit des Liganden modifiziert. „Nicht-transformierende“ Wnt-Moleküle induzieren Membranlokalisation von Dishevelled. Im Gegensatz dazu führen sowohl „transformierende“ als auch „nicht-transformierende“ Wnt-Liganden zur Phosphorylierung von Dishevelled (Axelrod et al., 1998; Rothbacher et al., 2000; Wallingford et al., 2000). Innerhalb des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges inaktiviert Dishevelled über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Serin/Threonin-Kinase GSK3 $\beta$ ; im Wnt/JNK-Signalweg aktiviert Dishevelled, wie bereits beschrieben, die Aktivität der JNK bzw. von RhoA/Rho-Kinase. Für diese duale Funktion werden separate Domänen von Dishevelled verantwortlich gemacht (Rothbacher et al., 2000; Yanagawa et al., 1995; Sokol, 1996). Im N-Terminus enthält Dishevelled eine Dix-Domäne, welche dessen Homodimerisierung vermittelt und von einigen Autoren auch als Axin-Interaktionsdomäne beschrieben wurde (Kishida et al., 1999; Smalley et al., 1999). Der Verlust der Dix-Domäne blockiert die Signalfunktion von Dishevelled innerhalb des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges. Die zentrale PDZ-Domäne von Dishevelled vermittelt eine Vielzahl von Protein-Interaktionen (siehe unten) und ist für die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalübertragung essentiell. Die weiter C-Terminal gelegene DEP-Domäne von Dishevelled spielt eine Rolle in der Wnt/JNK-Signalübertragung (Li et al., 1999; Wong et al., 2000).

Die nähere Betrachtung einer Reihe kürzlich identifizierter Dishevelled-Interaktionspartner unterstreicht die enge Verknüpfung der ursprünglich als unabhängig voneinander betrachteten Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Wnt/JNK-Signaltransduktionswege. Die Genprodukte Naked-cuticle und Par-1 wirken jeweils als Aktivator des einen, bei gleichzeitiger Blockade des anderen Signalweges (Rousset et al., 2001; Sun et al., 2001; Yan et al., 2001; Zeng et al., 2000). Zusätzlich zu diesen, die unterschiedlichen Signalkaskaden wechselseitig regulierenden „Signal-Integratoren“, wirken Frat-1/GPB und Frodo ausschliesslich als Aktivatoren des Wnt/ $\beta$ -Catenin-, und vanGogh/Strabismus wirkt als Aktivator des Wnt/JNK-Signalweges (Gloy et al., 2002; Yost et al., 1998; Park & Moon, 2002). Das erst kürzlich charakterisierte Protein Dapper inhibiert beide Zweige des Wnt-Signalweges (Cheyette et al., 2002). Wie alle diese Faktoren molekular wirken, d.h. ob es sich hier um streng-regulierte bzw. konstitutive oder transiente Interaktionen zwischen Dishevelled und den genannten Molekülen handelt, ist derzeit noch ungeklärt.

Dishevelled wird nach Wnt-Stimulation phosphoryliert, und zwei Serinkinasen, Casein-Kinase I und Casein Kinase II wurden in diesem Zusammenhang als Bindungspartner von Dishevelled identifiziert (Peters et al., 1999; Sakanaka et al., 1999; Willert et al., 1997). Überexpressions-Experimente in *Xenopus* etablierten CKIe als positive Komponente der Wnt-

Signaltransduktion. Im Gegensatz dazu unterstützen genetische Analysen in *Drosophila* eher eine inhibitorische Funktion von Casein-Kinasen in der Wnt-Signalübertragung. Die Ausschaltung endogener CKI $\epsilon$  und CKI $\alpha$  durch doppelsträngige Antisense-RNA (RNAi) führte zur  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung. CKI $\alpha$ -defiziente Fliegen zeigten einen für  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung typischen „naked phenotype“, identisch dem Verlust von Shaggy/Zeste-White-3, eines etablierten Inhibitors der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade (Liu et al., 2002; Yanagawa et al., 2002). Experimente zur Epistase belegten, dass CKI $\epsilon$  an der Signalübertragung von Dishevelled zur GSK3 $\beta$  beteiligt ist. CKI $\epsilon$  konnte in Immunpräzipitaten von Axin nachgewiesen werden. Für diese Interaktion wurde die C-terminale Domäne der CKI $\epsilon$  verantwortlich gemacht (Sakanaka et al., 1999). Der CKI $\epsilon$  wird zusätzlich eine Funktion innerhalb des Wnt/JNK-Signalweges zugeschrieben. Dominant-negative CKI $\epsilon$  bzw. durch Antisense-Morpholinos verursachter Verlust von CKI $\epsilon$  stören die Gastrulation in *Xenopus*-Embryonen. Weiterhin aktiviert dominant-negative CKI $\epsilon$  bzw. ein spezifischer CKI-Inhibitor (CKI-7; Chijiwa et al., 1989) JNK-abhängige Transkription in Zellkulturexperimenten (McKay et al., 2001). Die Beteiligung von Casein-Kinasen an der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Wnt/JNK-Signalübertragung unterstreicht die bisher wenig verstandene Rolle dieser Enzyme im Verlauf der Wnt-Kaskade. Als potentielle Substrate von Casein-Kinasen wurden Dishevelled, APC, GSK3 $\beta$  und Tcf-3 vorgeschlagen (Lee et al., 2001; Peters et al., 1999; Rubinfeld et al., 2001). Das damit verbundene regulatorische Potential heben diese Kinasen deutlich von anderen Dishevelled-Interaktionspartnern ab.



---

### 3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von Axin und Conductin unter Verwendung des Hefe-2-Hybrid-Systems. Conductin ist eine in unserer Arbeitsgruppe identifizierte und funktionell gut charakterisierte Kern-Komponente des Wnt-Signaltransduktionsweges. Unser Labor besitzt nachgewiesene Erfahrung bei der Identifizierung und Validierung funktionell wichtiger Protein/Protein-Interaktionen mit dem Hefe-2-Hybrid-System (Behrens et al., 1996; Fujita et al., 2002; Grimm et al., 2001; Weidner et al., 1996). Von der Identifizierung neuer Interaktionspartner erwarteten wir weiteren Aufschluss über die molekulare Zusammensetzung und die physiologische Regulation des funktionell-aktiven Axin/Conductin-Komplexes. Bisher nicht charakterisierte Interaktionen könnten einen Einblick in die bisher noch wenig verstandenen Prozesse des Signalflusses von Dishevelled über Casein-Kinasen zum Axin/Conductin-Komplex geben. Ausgehend von Conductin-Deletions-Konstrukten sollten verschiedene cDNA-Banken systematisch nach potentiell neuen bzw. bisher unbekanntem Interaktionspartnern durchsucht werden. Die Stärke und die Spezifität identifizierter Bindungspartner sollte in Ko-Immünpräzipitationen verifiziert werden. Im nächsten Schritt sollte die Bindung dieser Proteine an Axin bzw. weiterer, bekannter Komponenten des Wnt-Signalweges analysiert werden. Im Fall der Isolierung unbekannter cDNAs sollte die vollständige cDNA kloniert werden. Die funktionelle Relevanz identifizierter Conductin-Interaktionspartner sollte in Zellkulturexperimenten und, je nach Zugänglichkeit der entsprechenden cDNAs, in *Xenopus* bzw. Zebrafisch überprüft werden.