
4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung und Klassifizierung potentieller Conductin-Interaktionspartner

Bisherige Arbeiten beschrieben Axin/Conductin als zentrales „Gerüstprotein“ des β -Catenin-Abbaubookomplexes. Wie Wnt-Signale den Abbaubookomplex erreichen, dessen Aktivität kontrollieren und welche molekularen Abläufe effiziente β -Catenin-Phosphorylierung ermöglichen, ist wenig untersucht. Die komplexen Interaktionen von Axin und Conductin lassen auf weitere Funktionen innerhalb der Wnt-Signalübertragung schliessen. Ausserdem könnten bisher nicht identifizierte Bindungspartner Unterschiede zwischen Axin und Conductin aufklären. Deshalb habe ich mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems nach neuen Conductin-Bindungspartnern in einer Maus-Embryo cDNA-Bank gesucht. Als „bait“ wurde die vollständige Conductin-cDNA verwendet. Die cDNA potentieller Interaktionspartner wurde aus den Hefen isoliert und sequenziert. Die Spezifität und Stärke der im Screen identifizierten Interaktionen wurde durch direkte Transformation der isolierten cDNAs mit dem „bait“ bzw. dem Leervektor und in Ko-Immunpräzipitationen nach Überexpression in Zellkultur untersucht. Die potentiellen Conductin-Bindungspartner und die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Name der cDNA	Häufigkeit im Screen	Identität der Klone	Transformation/Bait	Transformation/Vektor	Interaktion in Zellen
Ubc-9	mehrfach	identisch	+	+/-	-
RNF-4	mehrfach	identisch	+	+/-	-
(EST AA538264)	1	/	+	+/-	-
APC	3	unabhängig	+++	-	+
Conductin	1	/	+++	-	+
Axin	1	/	+++	-	+
(EST AA476676)	1	/	+++	-	+

Tabelle 2: Im Hefe-System isolierte Conductin-Interaktionspartner. Name, Anzahl, Identität und das Bindungsverhalten in der Retransformation bzw. der Immunpräzipitation sind in der Tabelle angegeben. Positive Interaktionen sind durch (+) verdeutlicht, Anzahl (+) repräsentiert Bindungsstärke in der Hefe.

Ubc-9, RNF4 und der EST-AA538264 wurden aufgrund ihrer unspezifischen Aktivierung nach Transformation mit dem Leervektor im Hefe-2-Hybrid und fehlender Ko-Immunpräzipitation als falsch-positiv eingestuft. Im Gegensatz dazu konnten APC, Axin, Conductin und eine bisher nicht charakterisierte cDNA (EST-AA476676) als potentielle Conductin-Bindungspartner identifiziert werden. Die Interaktion von Conductin und APC wurde durch unser Labor bereits beschrieben (Behrens et al., 1998) und zeigt als interne Kontrolle die Qualität des durchgeführten Hefe-2-Hybrid-Screens. Die isolierten cDNA-Fragmente von Axin und Conductin entsprachen den jeweils C-terminal gelegenen Dimerisierungsdomänen beider Proteine. Die funktionelle Bedeutung der Homo- bzw. Heterodimerisierung von Axin und Conductin wurde von Christian Asbrand in unserem Labor untersucht (Asbrand, 2002). In der hier vorgelegten Arbeit wurde der neu-identifizierte Conductin-Bindungspartner (EST-AA476676) näher untersucht. Ausgehend von dem im 2-Hybrid-Screen isolierten cDNA-Fragment wurde das von uns als DIVERSIN bezeichnete Gen kloniert und dessen Funktion innerhalb der Wnt-Signalprozesse charakterisiert.

4.2 Klonierung der vollständigen Diversin cDNA

Zur Klonierung der vollständigen Diversin-cDNA wurde eine embryonale Phagen-cDNA-Bank (Maus, Tag 17,5 der Embryogenese) mit dem im 2-Hybrid-Screen isolierten cDNA-Fragment durchsucht. Nach Isolierung und Sequenzierung mehrerer partieller cDNA-Klone wurde ein offenes Leseraster von 2136 Basenpaaren identifiziert. Den Translationsstartpunkt definiert eine Kozaksequenz und mehrere davon 5' befindliche Stopcodons. Das Ende des kodierenden Bereiches wird durch ein Stopcodon und Polyadenylierungssequenzen bestimmt. Die murine Diversin-cDNA kodiert für ein Protein mit 712 Aminosäuren. Homologiesuche in der GenBankTM führte zur Entdeckung eines funktionell nicht charakterisierten Homologs im humanen Genom (Nagase et al., 1999). Ausserdem wurde ein Zebrafisch-EST mit signifikanter Homologie zum N-Terminus von Diversin gefunden. Sequenzanalyse eines vom Ressourcenzentrum Berlin zur Verfügung gestellten Zebrafisch EST-Klones ermöglichte die Identifizierung des Zebrafischhomologs von Diversin. Die vollständigen Sequenzen von Maus- und Zebrafisch-Diversin wurden von uns in der GenbankTM unter den Zugangsnummern AY026320 und AF395113 deponiert. Die Primärstruktur von Diversin und ein Vergleich zwischen Maus-, Zebrafisch- sowie humaner Aminosäuresequenz sind in Abb.2 dargestellt. Diversin enthält acht sogenannte Ankyrin-Repeats im N-Terminus (Aminosäure 1 bis 263 der Mausequenz). Die übrigen Bereiche zeigen keine Homologie zu bekannten

Strukturmotiven. Alle drei Proteine sind innerhalb der funktionell als Casein Kinase Iε- bzw. Axin/Conductin-Bindungsstelle charakterisierten Bereiche streng konserviert (Abb.7).

Mensch	1	MSQQDA--VAALSERLLVAAYKQGTENVVQLINKGARVAVTKHGRTPHLAANKGHLFPVV
Maus	1	MSQQDA--VAALSERLLIAAYKQGTENVVQLINKGAKVAVTKHGRTPHLAANKGHLFVSV
Zebrafisch	1	MSQRDASCVRALSERLLIASEKQADHVVQLINRGAKVATKNGRTPHLAANKGHLFVAV
Mensch	59	QILLKAGCDLDVQDDGDQALHRAIVVGNTEIIAALIHEGCALDRQDKDGNALHEASWH
Maus	59	QILLKAGCDLDVQDDGDQALHRAIVVGNTEIIITALIREGCALDRQDKDGNALHEAAWH
Zebrafisch	61	RILLAAGCDLDIEDDGDQALHRAIVVGNTEIIVISALVQEGCALDRQDKDGNALHEAAWH
Mensch	119	GFSQSAKLLVKAGANVLAKNKAGNTALHLAQNESHQSSTRVLLLAGSRADLKNNAGDTCL
Maus	119	GFSQSAKLLVKAGANVLAKNKAGNTALHLAQNESHQSSTRVLLLAGSRADLKNNAGDTCL
Zebrafisch	121	GFSQIVKLLVKAGANVHAKNKAGNTALHLAQNESHVQSCRVLLLAGSRADLKNNAGDTCL
Mensch	179	HVAARYNHLSIIRLLITAFCSVHEKNQAGDTALHVAALNHKKVAKILLEAGADTTIVNN
Maus	179	HVAARYNHLSVVRLLNNAFCSVHEKNQAGDTALHVAALNHKKVAVLLEAGADTTIVNN
Zebrafisch	181	HVSARYNHVSVIRALLGATCSVTDNRNHTGDALHTAASLNHRKTVRMLLEAGADSRKNN
Mensch	239	AGOTPLETARYHNNPEVALLLTKAP-----
Maus	239	AGOTPLETARYHNNPEVALLLTKAPPDLALQSWRSRKRKRERLKEERRAQSVPDEVAQS
Zebrafisch	241	TGETALDQARENNSEVALLLTKAPAEELQSRTHRE--ERRDKMKTEGRAQSVPDE----
Mensch	264	QGSVSAGDTPSSEQAVARKEEARERFLSASPEPRAKDRRRKSRPKVSASFSDPTPPADQQ
Maus	299	KGSVSAGDTPSSEQAVPOKEEARDCPPASQEPKDEERRKSRPEVSALSDPTPADQQ
Zebrafisch	295	MLPRKCDASPAQDTHGSDGSLRRDNDMFLTEPRANKNCHRKARDRLS---PSSDALIYR
Mensch	324	PGHQNLHAEHNPKKRNRHRGSSPPPPHFRAYQLYTLYRGKDGKVMQAPINGCRCEPLI
Maus	358	PGHQNLHSHHPKKSRRHCWSPPPPHGFRAYQLYTLYRGKDGKVMQAPIKGCRCEPLI
Zebrafisch	351	PNKQSD-PPKKSKTERRSPSAVPPPPPHNYKAYQLYTLYRGKDGKVMQAPINGCRCEPLI
Mensch	384	NKLENQLEATVEEIKAELGSVQDKMNTKLGQEMNKTOHQMRVLDKLMVERLSAERTECLN
Maus	418	NKLENQLEATVEEIKAELGSVQDKVNAKLGQEMSKTOHQMCVLDKLMVERLSAERTECMN
Zebrafisch	410	SKLENQLMATKEEMOSEIHTVQELMNSKIQMDRKSQHQRALDKMTERLSAERTECLH
Mensch	444	RLQQHSDTEKHEGKQIISLVDELKRWCMCLKIQNLEOKLSGD---SRACRAKSTPSTICES
Maus	478	RLQQHAAAEKQEGEKQMSLVDELKAWCMCLKIQSLELRLSGE---SRTFRAKSTPPPSDS
Zebrafisch	470	RIDKRAVOERLEAEKRQTSVVKDLKNWCLSKIQSLETRLGSERVGSRRLQSSSLTDTLSD
Mensch	501	STGVDQLVVTA---GPAAASDSSPPVVRPKKALNSTATQRVQOELSSSDCTGSRLRNVK
Maus	535	TPAVDQPVVAA---GPAAASDSSQVVRPKDKALNASAAHSHQOELPPSDCTGSGLRKIK
Zebrafisch	530	CTPVLEPSRAAPSPSPSAEPTDARETAAASSCAEDAPARYVIVIEVDASADKPSQNSQAP
Mensch	558	VQTALLPMNEAARS---DQQAQPCVNRGTQTKKSGSGPTR-HRAQQPAASSTCGQPPP
Maus	592	APGA-----SRC---DQQTGSCVNRGTQTKKSGRSGQTK-HRQOQPTASSPSGOQPS
Zebrafisch	590	QSPCLVRPKQRSRACSDPHQLRDESEERSVVEARPSAEHRTIRRHRAKSKPSAQSLTLQTC
Mensch	613	ATGSEQTGPHTRDTSQALELTQYFFFAVSTQMEKWYERKIEEARSQANOKAQODKATLKE
Maus	640	AASSD-----VRDASQALELTQYFFFAVSAQMEKWYERKIEEARSQASOKAQODEATLKE
Zebrafisch	650	PAAAEGAFAQERDNMHALEVTQYFFFAVTLQMERWYEREIEETRRQADHRVQADRELLLD
Mensch	673	HIKSLEEELAKLRTRVQKEN
Maus	695	HIRLEEELAKLRTRVQK--
Zebrafisch	710	RIQLEDELRLLRMNTQDG-

Abbildung 7: Vergleich der Aminosäuresequenz von Diversin-Orthologen aus Mensch, Maus und Zebrafisch.

4.3 Diversin interagiert mit Conductin und CKIε im zellulären Kontext

Die Interaktion von Diversin und Conductin wurde in Immunpräzipitations-Experimenten ausführlich charakterisiert. FLAG- bzw. HA-Epitop-markierte Versionen von Conductin bzw. Diversin wurden in Neuro2A-Zellen exprimiert. Nach Immunpräzipitation mit spezifischen

Antikörpern (anti-Flag, anti-HA) wurden die Immunkomplexe in Western-Blots analysiert. Conductin wurde in der Tat in Diversin-Immunpräzipitaten nachgewiesen (Abb. 8B), was die zelluläre Interaktion beider Proteine bestätigte. Mit Hilfe der in Abb. 8A dargestellten Diversin-Deletionskonstrukte wurde die für die Bindung an Conductin verantwortliche Region von Diversin identifiziert. In diesen Experimenten war die im Hefe-2-Hybrid-Screen isolierte C-terminale Region von Diversin (Aminosäuren 583 bis 712) für die Interaktion mit Conductin verantwortlich (Abb. 8B).

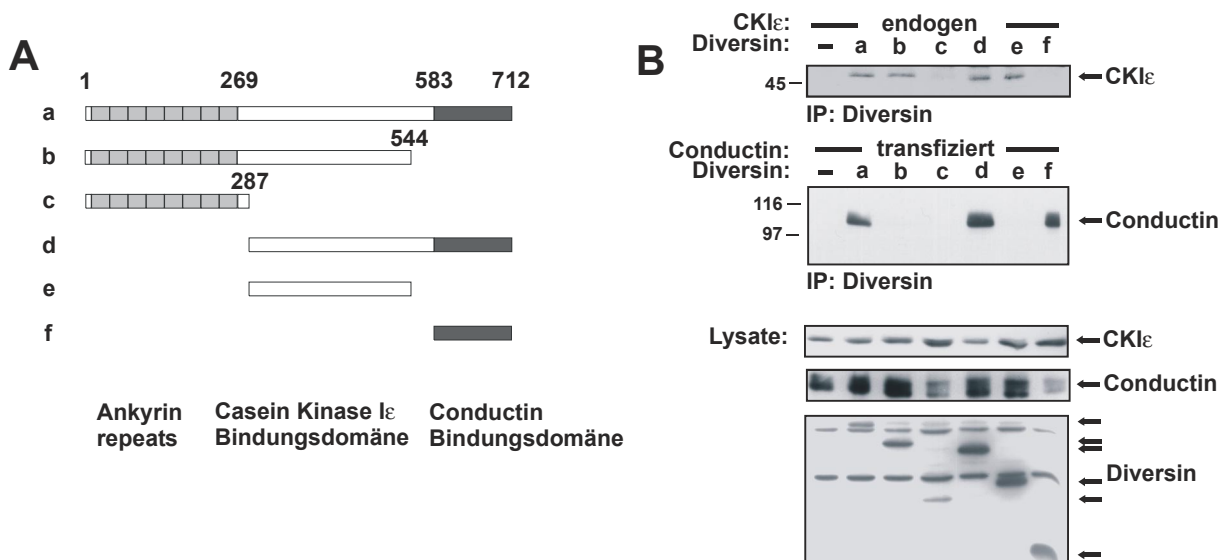


Abbildung 8: Diversin interagiert mit CKIε und Conductin über zwei unabhängige Domänen. Bindungsverhalten von CKIε und Conductin gegenüber Diversin-Deletionskonstrukten (siehe Schema in A) in Ko-Immünpräzipitationen nach Expression in murinen Neuro2A-Zellen (B).

Eine mögliche Interaktion von Diversin mit anderen Komponenten des Wnt-Signalweges wurde ebenfalls in Immunpräzipitationen getestet. Diese Experimente zeigten, dass Diversin auch mit CKIε spezifisch interagierte (Abb. 8B). Im Gegensatz dazu war keine Interaktion mit CKIα, APC oder GSK3β nachweisbar (nicht gezeigt). Zur Identifizierung der CKIε-Bindungsstelle von Diversin wurden die bereits erwähnten Diversin-Deletionskonstrukte verwendet. Diese Analysen definierten die zentrale Domäne von Diversin (Aminosäuren 287 bis 544) als CKIε-Bindungsdomäne (Abb. 8B). Die direkte Interaktion von Diversin und CKIε konnte in Hefe-2-Hybrid-Experimenten bestätigt werden.

4.4 Diversin bindet an die GSK3 β -Bindungsdomäne von Conductin und Axin

Diversin wurde, wie oben beschrieben, im Hefe-2-Hybrid-Screen mit der vollständigen Conductin-cDNA als „bait“ isoliert. Zur Identifizierung der genauen Diversin-Bindungsdomäne von Conductin diente eine Reihe von Conductin-Deletionskonstrukten (siehe Abb. 9A). Diversin interagierte im Hefe-2-Hybrid-System mit der als GSK3 β -Bindungsstelle definierten Region von Conductin (Aminosäuren 343 bis 396; grün in Abb. 4A). Innerhalb der GSK3 β -Bindungsdomäne sind Conductin und das funktionell-homologe Protein Axin stark konserviert. Deshalb wurde zusätzlich die Bindung von Diversin an die entsprechende Region von Axin im Hefe-2-Hybrid-System untersucht. Diese Analyse zeigte, daß Diversin auch mit Axin spezifisch interagiert. Bestätigt wurden diese Resultate durch Ko-Immunpräzipitationen. Während Diversin mit vollständigem Conductin ko-präzipitierte, verhinderte die Deletion der GSK3 β -Bindungsstelle von Conductin die Interaktion mit Diversin (Abb. 9B).

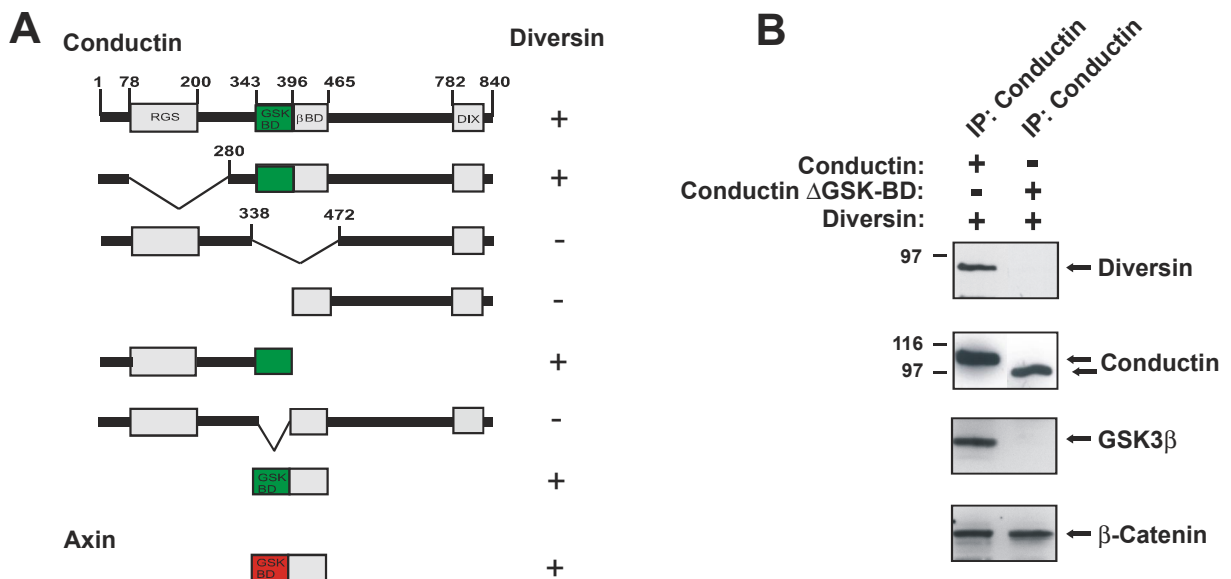


Abbildung 9: Die GSK3 β -Bindungsstelle von Conductin vermittelt die Interaktion mit Diversin. Bindungsverhalten von Diversin gegenüber den schematisch dargestellten Conductin-Deletionskonstrukten in der Hefe (A) bzw. in Koimmunpräzipitationen nach Expression in murinen Neuro2A-Zellen (B).

Diese Resultate deuten daraufhin, dass Diversin mit Axin und Conductin interagiert. Ausserdem nutzen Diversin und GSK3 β überlappende oder identische Bereiche für die Bindung an Axin und Conductin. Die Möglichkeit einer Kompetition zwischen Diversin und GSK3 β um die Conductin-Bindung wurde von Christian Asbrand in unserem Labor

ausführlich studiert. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass (i) Diversin und GSK3 β identische Bereiche von Conductin zur Interaktion benutzen und dass (ii) Diversin und GSK3 β im zellulären Kontext nicht um die Conductin-Bindung kompetieren. So waren Diversin, Conductin und GSK3 β nach Diversin-Immunpräzipitation in „Dreifach“-Komplexen nachweisbar. (iii) Über die C-terminale DIX-Domäne dimerisiertes Conductin ermöglichte die gleichzeitige Anwesenheit von Diversin und GSK3 β im Conductin-Komplex (Asbrand, 2002). Diese Resultate definieren einerseits die Aminosäuren 343 bis 396 von Conductin als Diversin- und GSK3 β -Bindungsdomäne. Sie belegen andererseits die gemeinsame Existenz von Diversin und GSK3 β im Axin/Conductin-Komplex.

4.5 Diversin vermittelt die Interaktion von CKI ϵ mit dem Axin/Conductin-Komplex

Diversin interagiert über unabhängige Domänen mit Axin/Conductin und CKI ϵ , und Conductin-Dimere erlauben die gleichzeitige Anwesenheit von Diversin und GSK3 β im Komplex. Funktionell könnte Diversin demnach als „Brückenmolekül“ CKI ϵ an den Axin/Conductin/GSK3 β -Komplex rekrutieren. Diese Möglichkeit wurde in Immunpräzipitationen näher analysiert. Dazu wurde Conductin zusammen mit Diversin bzw. der C-terminalen Axin/Conductin-Bindungsdomäne von Diversin exprimiert. Nach Immunpräzipitation und Western-Blot wurde die an Conductin gebundene CKI ϵ quantifiziert. Erst in Anwesenheit von Diversin war endogene CKI ϵ in Conductin-Komplexen nachweisbar (Abb. 10). Die C-terminale Axin/Conductin-Bindungsdomäne von Diversin konnte die Interaktion von CKI ϵ mit Conductin nicht vermitteln. Diese Resultate zeigen, dass Diversin durch seine voneinander-unabhängigen Domänen CKI ϵ an den Axin/Conductin-Komplex rekrutieren kann. Diese Interaktionen sind schematisch in Abb. 10 dargestellt.

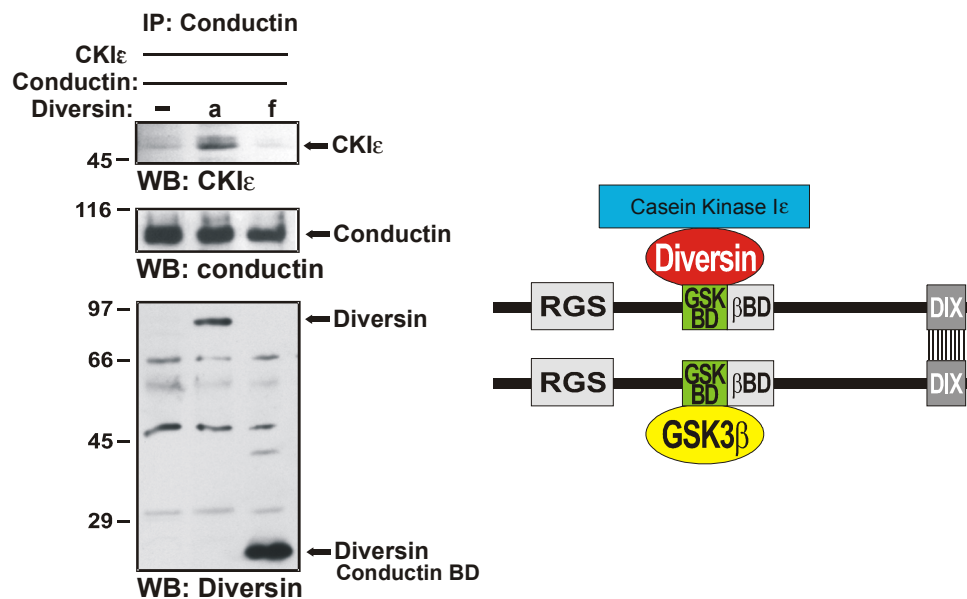


Abbildung 10: Diversin rekrutiert CKIε an den Axin/Conductin-Komplex. Endogene CKIε ist nur nach Ko-Transfektion von Diversin in Conductin-Immunkomplexen nachweisbar. Die C-terminale Domäne von Diversin ist nicht in der Lage, diese Interaktion zu vermitteln (links). Schema des funktionellen Protein-Komplexes, bestehend aus dimerisiertem Conductin und den direkt assoziierten Komponenten GSK3β und Diversin/CKIε (rechts).

4.6 Diversin stimuliert den Abbau von β-Catenin

Die vorgelegten biochemischen Befunde verweisen auf eine Funktion von Diversin innerhalb der Wnt-Signaltransduktion. Ziel der Wnt/β-Catenin-Signalübertragung ist die Kontrolle des zyttoplasmatischen Effektormoleküls β-Catenin. Die Funktion von Diversin in der Regulation zyttoplasmatischer β-Catenin-Mengen wurde in 293-Zellen analysiert. Zu diesem Zweck wurden aufsteigende Mengen von Diversin-cDNA in 293-Zellen transfiziert und endogenes, zyttoplasmatisches β-Catenin in Western-Blots quantifiziert. Diversin induzierte den Abbau zyttoplasmatischen β-Catenins, und dieser Effekt war abhängig von der Menge transfizierter Diversin-cDNA (Abb. 11A, oberer Blot). Die Transfektion von Dishevelled-cDNA induziert Stabilisierung endogenen β-Catenins. Zusätzlich transfiziertes Diversin konnte diese Aktivität von Dishevelled blockieren (Abb. 11A). Die Stärke der von Diversin und Dishevelled induzierten β-Catenin-Regulation war jeweils von der Menge transfizierter cDNA abhängig (Abb. 11A). Der β-Catenin-Abbau erfolgt nach Phosphorylierung/Ubiquitylierung in Proteasomen (Aberle et al., 1997; Hart et al., 1998; Kitagawa et al., 1999). Die pharmakologische Blockade des Proteasoms sollte dementsprechend den durch Diversin induzierten β-Catenin-Abbau blockieren. In der Tat inhibierte der spezifische Proteasomen-

inhibitor MG132 vollständig den durch Diversin induzierten β -Catenin-Abbau (Abb. 11B). Die durch Diversin induzierten Effekte waren bis ca. 16 Stunden nach Abbruch der transienten Transfektion nachweisbar (Abb. 11B).

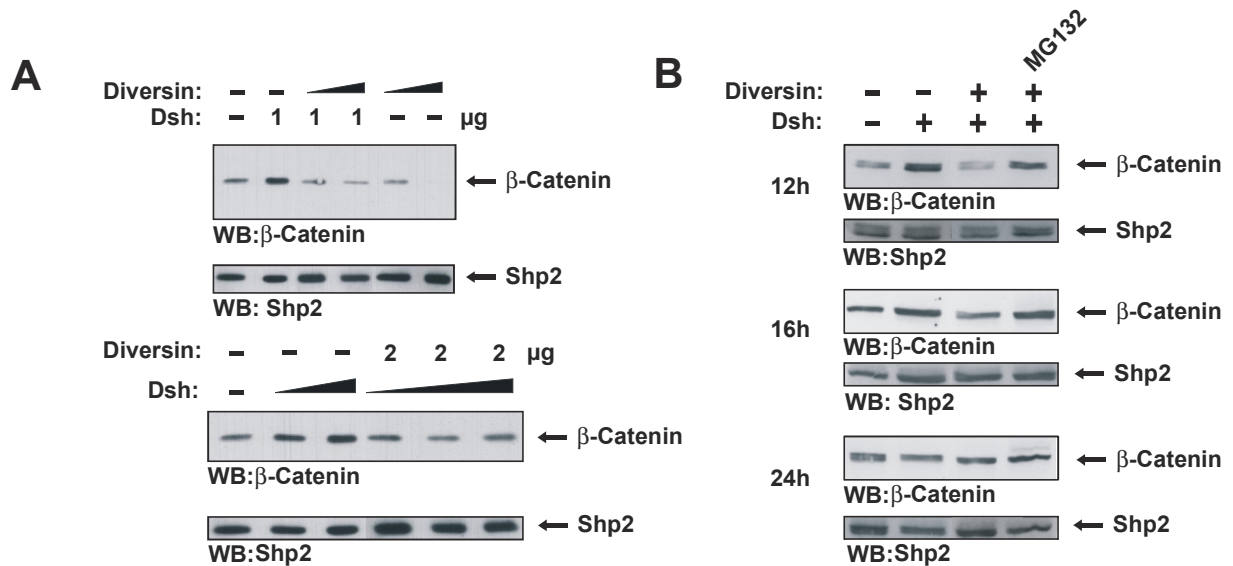


Abbildung 11: Diversin stimuliert dosisabhängig den β -Catenin-Abbau in 293-Zellen, dargestellt durch Western-Blot-Analyse. Transfektion von Diversin-cDNA induziert den Abbau von endogenem β -Catenin und des durch Transfektion von Dishevelled stabilisiertem β -Catenin in 293-Zellen (A, oben: 1 μ g Dishevelled und 1 bzw. 3 μ g Diversin; unten: 0,5-2 μ g Dishevelled und 2 μ g Diversin). Der Diversin-vermittelte β -Catenin-Abbau kann durch Inhibition des Proteasoms (4 Stunden Inkubation mit 40 μ M MG132) blockiert werden und ist nach transienter Transfektion bis zu 16 h nachweisbar (B). Western-Blots für Shp2 dienen als Ladekontrolle in (A) und (B).

4.7 Diversin blockiert die Signalfunktion von β -Catenin in 293-Zellen

Die Funktion von Diversin in der β -Catenin-Signalübertragung wurde zusätzlich in Lef-1/Tcf-abhängigen Reporterassays analysiert. Ein synthetisches Lef-1/Tcf-Reporterkonstrukt ermöglicht die Quantifizierung von Wnt/ β -Catenin-Signalen. Dieses Konstrukt enthält drei Lef-1/Tcf-Bindungsstellen vor einem minimalen fos-Promotor, der die Expression eines Luziferasegens kontrolliert (Korinek et al., 1997). Transfektion von Dishevelled- bzw. Wnt3a-cDNA stimuliert Lef-1/Tcf-abhängige Transkription. Im Gegensatz dazu blockierte Diversin durch Dishevelled- bzw. Wnt3a- induzierte Signaltransduktion. Die Stärke der durch Diversin induzierten Signalblockade war abhängig von der Menge transfizierter Diversin-

cDNA (Abb. 12A,B). Diese Ergebnisse zeigen, dass Diversin eine inhibitorische Rolle in der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung ausübt.

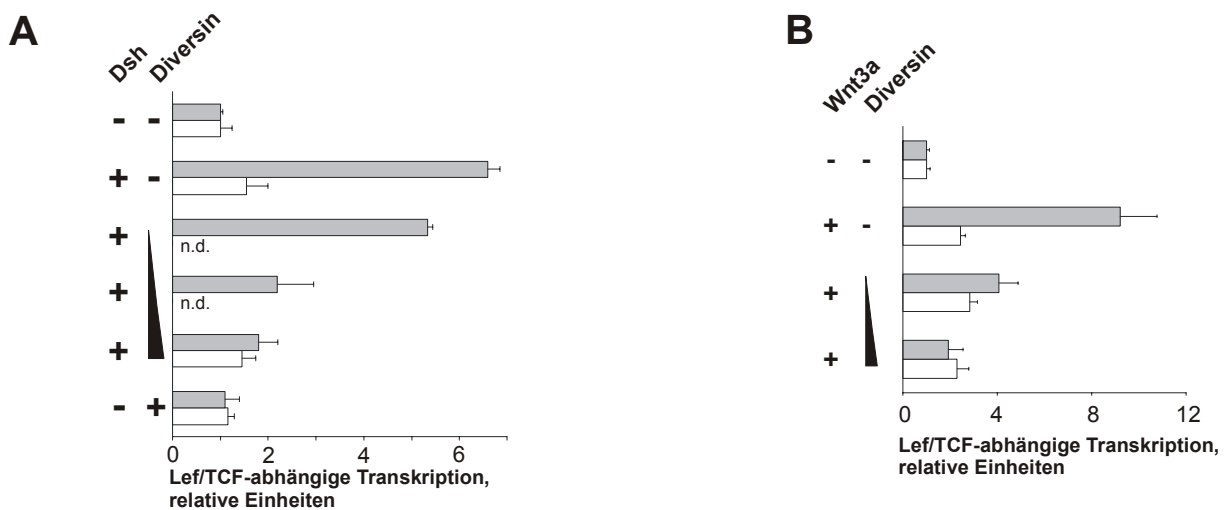


Abbildung 12: Diversin blockiert dosisabhängig β -Catenin-vermittelte Transkription in 293 Zellen. Ko-transfektion von Diversin-cDNA blockiert die durch Dishevelled- (A) bzw. Wnt3a- (B) induzierte Expression eines Lef/Tcf-abhängigen Reporterkonstruktes (TOP-Reporter, graue Balken), beeinflusst jedoch nicht die Expression des Kontrollreporters (FOP-Reporter mit mutierten Lef/Tcf-Bindungsstellen, weisse Balken).

Die für die Ausschaltung des Wnt-Signals verantwortlichen Domänen von Diversin wurden in Lef-1/Tcf-abhängigen Reporterassays charakterisiert. Hierzu wurden Diversin-Deletionskonstrukte hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität untersucht. Der Verlust der Ankyrin-Repeats hatte keinen Einfluss auf die Funktion von Diversin in diesem Assay (Abb. 13). Im Gegensatz dazu waren die einzelnen Domänen von Diversin signifikant schwächer oder überhaupt nicht in der Lage, das Wnt/ β -Catenin-Signal zu blockieren. Einzig das aus CKIe- und der Axin/Conductin-Bindungsdomäne von Diversin bestehende Konstrukt blockierte Wnt/ β -Catenin-Signale so effektiv wie vollständiges Diversin (Abb. 13). Diese Experimente zeigen, dass beide, die CKIe- gemeinsam mit der Axin/Conductin-Bindungsdomäne von Diversin bei der Blockade des Wnt/ β -Catenin-Signals zusammenwirken.

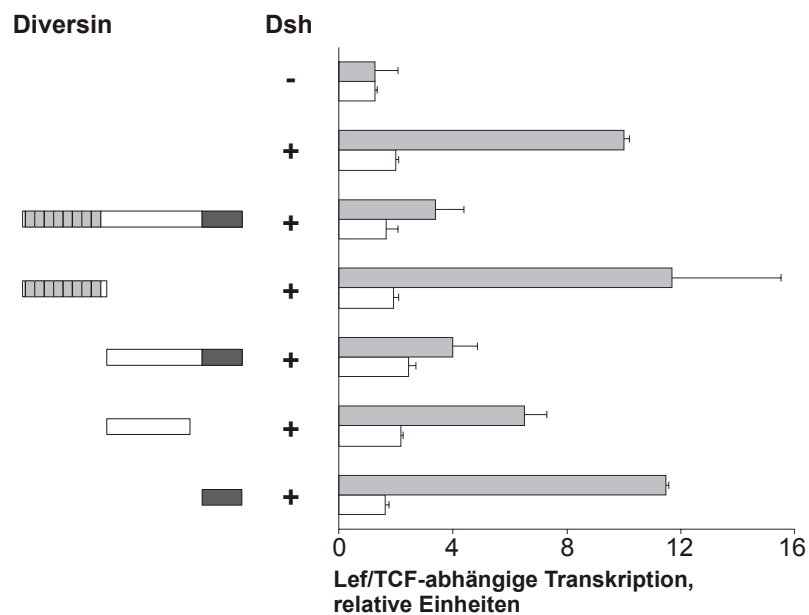


Abbildung 13: Die CKIe- und die Axin/Conductin-Interaktionsdomänen von Diversin sind für die Blockade von β -Catenin-Signalen notwendig. Deletionsanalyse von Diversin in Lef-1/Tcf-abhängigen Reporterassays. Nur Konstrukte, die sowohl mit CKIe- als auch mit Axin/Conductin interagieren, können Lef-1/Tcf-abhängige Transkription blockieren (TOP-Reporter, graue Balken). Die Expression des Kontrollreporters wird nicht beeinflusst (FOP-Reporter, weisse Balken).

4.8 Diversin fördert die β -Catenin-Phosphorylierung *in vitro*

Die N-terminale Phosphorylierung von β -Catenin durch den Axin/Conductin-Komplex ist Voraussetzung für dessen proteasomalen Abbau (Cohen & Frame, 2001). Diversin ist Bestandteil dieses Abbau-Komplexes und stimuliert den proteasomalen β -Catenin-Abbau in 293-Zellen (siehe Abb. 11). Deshalb wurde der Einfluß von Diversin auf den Phosphorylierungsstatus von β -Catenin analysiert. Hierzu wurde Conductin zusammen mit aufsteigenden Mengen von Diversin in 293-Zellen exprimiert. Conductin-Immunkomplexe wurden nach Zugabe von rekombinant hergestelltem β -Catenin und radioaktiv markiertem ATP einer Kinasereaktion ausgesetzt. In diesen Experimenten führte die Anwesenheit von Diversin zur 10-fach gesteigerten Phosphorylierung von β -Catenin. Dabei korrelierte die Stärke der Stimulation mit der Menge transfizierter Diversin-cDNA (Abb. 14). Diese Daten weisen auf eine Beteiligung von Diversin an der β -Catenin-Phosphorylierung hin.

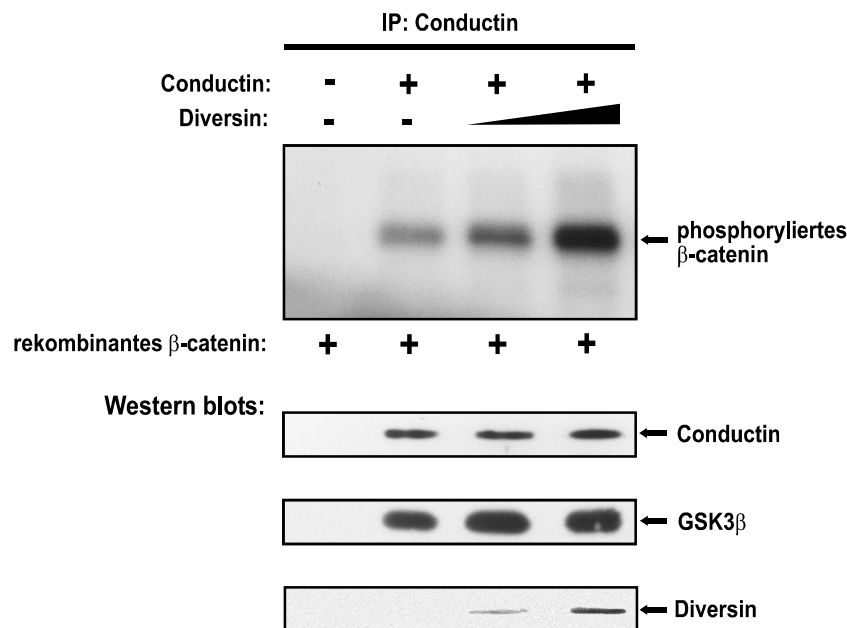


Abbildung 14: Diversin stimuliert dosisabhängig die Phosphorylierung von rekombinatem β -Catenin durch den Axin/Conductin-Komplex. *In vitro*-Phosphorylierung von rekombinatem β -Catenin nach Isolierung von Conductin-Immunkomplexen aus transient-transfizierten 293-Zellen. Oben: Phosphorylierung von β -Catenin, dargestellt durch den Nachweis von eingebautem, radioaktiv-markiertem ATP. Unten: Zusammensetzung der Immunkomplexe, dargestellt durch Western-Blots für die entsprechenden Komponenten.

4.9 Diversin verbindet katalytisch-aktive CKI ϵ mit dem β -Catenin-Abbaukomplex

Wie oben gezeigt, stimuliert Diversin die Phosphorylierung und den Abbau von β -Catenin in 293-Zellen. Zur Blockade von Wnt-Signalen durch Diversin sind die CKI ϵ - und die Axin/Conductin-Bindungsstelle von Diversin notwendig (siehe Abbildungen 11-14). Entsprechend dieser Resultate könnte Diversin als „Brückenmolekül“ die Verbindung von CKI ϵ mit dem Axin/Conductin-Komplex herstellen und dadurch eine zusätzliche Kinase an den β -Catenin-Abbaukomplex rekrutieren. Zur Testung dieser Hypothese wurde die katalytische Untereinheit der CKI ϵ an die C-terminalen Domänen von Maus- bzw. Zebrafisch-Diversin fusioniert. Diese Fusionskonstrukte wurden in Lef-1/Tcf-abhängigen Reporterassays funktionell analysiert. Beide Fusionskonstrukte blockierten Lef-1/Tcf-abhängige Transkription und verhielten sich damit funktionell-identisch zu Diversin (Abb. 15). Die Notwendigkeit der Kinase-Aktivität der beschriebenen Fusionsproteine konnte durch eine inaktivierende Mutation in der Kinasedomäne bzw. dem Einsatz eines spezifischen CKI-Inhibitors (CKI-7) bewiesen werden (Abb. 15). Die separaten Domänen der CKI ϵ /Diversin-

Fusionsproteine waren vollkommen inaktiv. Diese Resultate deuten daraufhin, dass Diversin durch Einbindung katalytisch-aktiver CKI ϵ in den β -Catenin-Abbaukomplex die Wnt-Signaltransduktion beeinflusst.

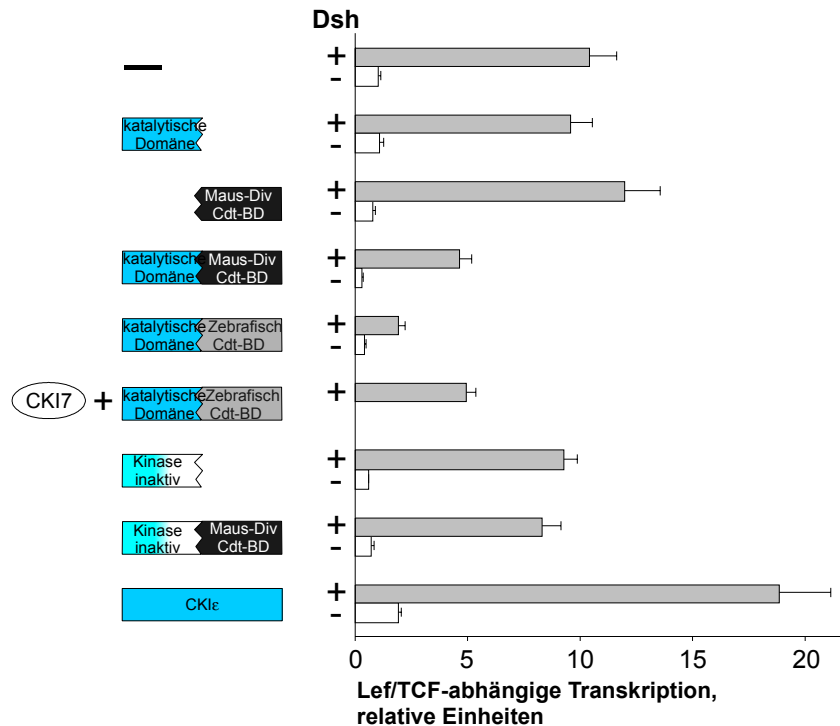


Abbildung 15: Diversin reguliert β -Catenin-Signale durch Rekrutierung von CKI ϵ an den Axin/Conductin-Komplex. Fusionskonstrukte bestehend aus der katalytischen Domäne humaner CKI ϵ und der C-terminalen Domänen von Maus- und Zebrafisch-Diversin blockieren die Signalfunktion von β -Catenin. Die separaten Domänen sind inaktiv. Die Fusion der Kinase-inaktiven Domäne bzw. die Verwendung eines spezifischen CKI-Inhibitors (CKI-7, 4h, 50 μ mol) demonstrieren die Notwendigkeit der katalytischen Aktivität von CKI ϵ in den Fusionskonstrukten. Graue Balken: TOP-Reporter in der Gegenwart von Dishevelled; weisse Balken: TOP-Reporter ohne Dishevelled.

4.10 Diversin kontrolliert die Ausprägung der Körperachse in *Xenopus laevis*

Klassische Wnt/ β -Catenin-Signale spielen in *Xenopus* eine wichtige Rolle bei der Etablierung der dorso-ventralen Körperachse (siehe Einleitung). Die ektopische Expression aktivierender Komponenten des Wnt-Signalweges auf der ventralen Seite des Krallenfrosches induziert sekundäre Körperachsen. Im Gegensatz dazu verhindert die dorsale Expression inhibierender Komponenten die Ausbildung der endogenen Körperachse. In diesem System wurde der Einfluss von Diversin auf die Achsenbildung studiert. Ko-Injektionen von Diversin mit

Dishevelled, CKI ϵ , dominant negativer-GSK3 β oder β -Catenin ermöglichten zusätzlich die Positionierung von Diversin im Gefüge der Wnt-Signaltransduktion. Die ventrale Injektion von Dishevelled-mRNA induzierte die Bildung sekundärer Körperachsen. Die Ko-Injektion von Diversin-mRNA blockierte diese Aktivität von Dishevelled (Abb. 10A,B). In gleicher Weise blockierte Diversin-mRNA die durch CKI ϵ -induzierte Achsenbildung. Im Gegensatz dazu konnte Diversin die durch dominant negative-GSK3 β bzw. β -Catenin verursachte Achsenbildung nicht blockieren (Abb. 10A). Diese Ergebnisse belegen die inhibitorische Funktion von Diversin innerhalb des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in einem gut charakterisierten, biologischen System. Die dargestellten epigenetischen Experimente positionieren Diversin in der Signalkaskade zwischen Dishevelled/CKI ϵ und GSK3 β / β -Catenin.

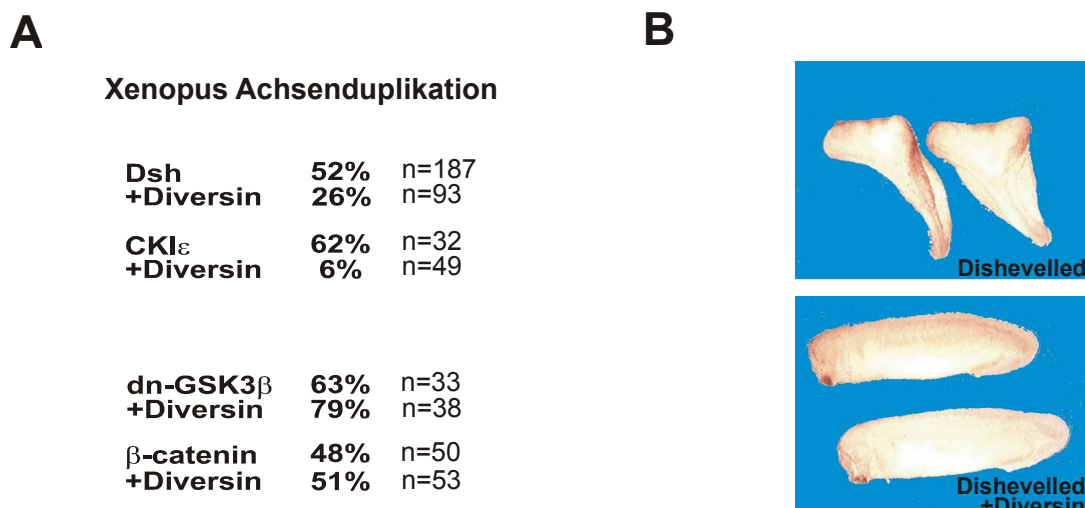


Abbildung 16: Diversin blockiert die Achsenbildung in Xenopus-Embryonen und inhibiert Signalübertragung auf der Stufe zwischen Dishevelled/CKI ϵ und GSK3 β / β -Catenin. Diversin (3ng mRNA) blockiert die durch Dishevelled und CKI ϵ , aber nicht die durch dn-GSK3 β und β -Catenin (jeweils 1ng mRNA) induzierte sekundäre Körperachsen (A, Angaben in Prozent injizierter Embryonen). Repräsentative Beispiele für die Induktion sekundärer Körperachsen nach Injektion von Dishevelled bzw. Blockade dieses Effektes durch Diversin sind in (B) gezeigt.

4.11 Diversin kontrolliert frühe Prozesse der Embryogenese in *Danio rerio*

Zur Charakterisierung der *In vivo*-Funktion einzelner Gene bietet das experimentelle System des Zebrafisches *Danio rerio* eine Vielzahl von Vorteilen. Das sind u.a. die kurze Generationsdauer, die leichte Manipulierbarkeit und die Transparenz der Embryonal- und

frühen Adultstadien, die eine lichtmikroskopische Analyse ermöglichen (Driever et al., 1994). Desweiteren erlaubt die kürzlich etablierte Antisense-Morpholino-Oligonukleotid-Technologie eine schnelle und effiziente Analyse der *In vivo*-Funktion spezifischer Gene (Nasevicius & Ekker, 2000). Antisense-Morpholino-modifizierte Oligonukleotide (MO), die gegen den Translationsstartpunkt bzw. die 5'-untranslatierte Region des zu analysierenden Transkripts gerichtet sind, wirken als dosisabhängige, spezifische Inhibitoren der Translation und erlauben somit die Ausschaltung von Genen während der Embryogenese.

Die Identifizierung der vollständigen Zebrafisch-Diversin-cDNA (siehe Abb. 7) erlaubte die Charakterisierung endogener Diversinfunktion im Zebrafisch-Embryo. Wie bereits in der Einleitung beschrieben sind Komponenten des Wnt-Signalweges an der Etablierung des Blastula-Organizers und der anschliessend durch dieses Signalzentrum induzierten dorso-ventralen Identität in Vertebraten maßgeblich beteiligt (De Robertis et al., 2000; Huelsken & Birchmeier, 2001; Schier, 2001). Eine detaillierte Analyse des Diversin-Expressionsmusters durch *In situ*-Hybridisierungen zeigte maternale Expression von Diversin (Abb. 17A-C). Während des Blastula- und frühen Gastrulastadiums ist Diversin ubiquitär exprimiert. Sehr hohe Expressionslevel zeigten sich in Strukturen, die an achsen- und mesodermbildenden Prozessen beteiligt sind, z.B. im Grenzbereich zwischen Dotter und Blastoderm (Pfeile in Abb. 17C). Diese Befunde weisen auf eine sehr frühe Funktion von Diversin hin und gestatten den Einsatz von Antisense-MOs zur funktionellen Charakterisierung von Diversin. Zu späteren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung (72 Stunden nach der Fertilisierung) wurde ein sehr spezifisches Expressionsmuster von Diversin beobachtet. So wurde Diversin in Retinalganglien, den Gehörvesikeln, der "roofplate" des Gehirns und den Grenzen von Vorderhirn-Mittelhirn und Mittelhirn-Hinterhirn nachgewiesen. Das Expressionsmuster von Diversin in späten Embryonalstadien deckt sich mit dem von Wnt1 und Wnt8, was auf mögliche Wnt-abhängige Funktionen von Diversin zu diesen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung hinweist (Abb. 17D).

Die Injektion von Diversin Antisense-MOs, die gegen den Translationsstartpunkt bzw. die 5'-untranslatierte Region von Diversin gerichtet sind, induzierte eine starke Dorsalisierung betroffener Embryonen. Ein typisches Zeichen dieser Dorsalisierung ist das Fehlen ventraler Strukturen, z.B. der ventralen Schwanzflosse, bzw. stark aufgewundene Körper (Abb. 17F,G). Dieser Phänotyp wurde durch *In situ*-Hybridisierungen entsprechender Markergene auf molekularer Ebene verifiziert. Frühe, mit Diversin MOs injizierte Embryonen zeigten eine verbreiterte Expression des dorsal-exprimierten Genes Goosecoid, bzw. die ektopische

Goosecoid-Expression in ventralen Bereichen des Embryos (Abb. 17I,K). Zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese war das Expressionsmuster des ventrolateral-exprimierten Genes *Tbx6* stark ausgedehnt (Abb. 17M,N) und eine ventrale Expansion des normalerweise dorsal-exprimierten Genes *Pax2.1* sichtbar (Abb. 17O,P). Diese Veränderungen deuten ebenfalls auf eine Dorsalisierung hin und zeigen die Persistenz der durch die Diversin MOs induzierten Effekte. Die Blockade der *In vivo*-Funktion von Diversin verstärkt demzufolge Signale, die zur Induktion dorsaler Strukturen beitragen bzw. fördert die Anlage ektopischer Organizer in ventralen Bereichen des Embryos. Die Injektion von Kontroll-Morpholinos mit vier nicht komplementären Basenpaaren hatte keinen Einfluß auf die Embryonalentwicklung injizierter Embryonen (nicht gezeigt). Ko-Injektion der Diversin MOs mit Diversin-mRNA der Maus (diese wird von den gegen Zebrafisch-Diversin gerichteten MOs nicht erkannt) hob die durch Diversin MOs-induzierten Effekte vollständig auf (Abb. 17L).

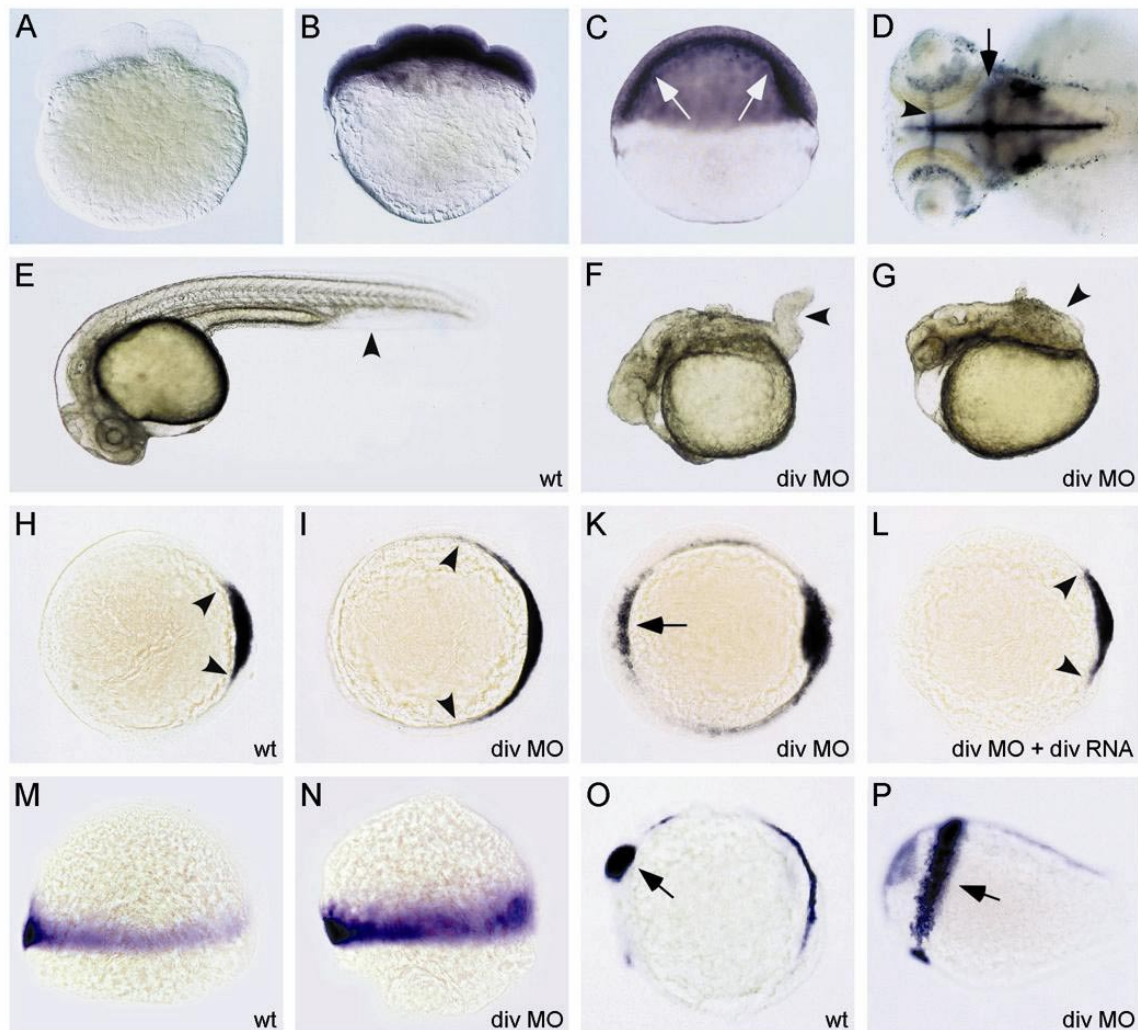


Abb. 17: Diversin beeinflusst die Ausprägung des dorsalen Organisers während der Embryogenese des Zebrafisches. (A-D) *In situ*-Hybridisierung von *Diversin* in Zebrafisch-Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. *Diversin* ist ubiquitär in den Blastomeren des 4-8 Zellstadium (B) und im Shield-Stadium (C) von Zebrafischembryonen exprimiert. (A) zeigt die Sense-Kontrolle. (D) Spezifische Expression von *Diversin* in der Dachplatte des Hirns und der Vorderhirn-Mittelhirn- (Pfeilspitze) sowie der Mittelhirn-Nachhirngrenze (Pfeil) 72 Stunden nach der Fertilisation. (E-P) Blockade von endogenem Diversin durch Antisense-Morpholinos induziert die Dorsalisierung von Zebrafisch-Embryonen bzw. die Verbreiterung der Expressionsdomänen dorsal-exprimierter Gene. (E) Wildtyp-Embryo 30 Stunden nach Fertilisation (dorsal ist oben, die Pfeilspitze markiert die ventrale Schwanzflosse). (F,G) Mit Diversin-MOs injizierte Embryonen (*divMO*) zeigen 30 Stunden nach Fertilisation eine starke Dorsalisierung. (H-L) *In situ*-Hybridisierung von *gsc* im Shield-Stadium (dorsal ist rechts, die Pfeilspitze markiert die *gsc*-Expressions-Domäne; der Pfeil zeigt die ektopische *gsc*-Expression auf der ventralen Seite). (H) Nichtinjizierte Kontrolle; (I,K) Diversin MOs-injizierte Embryonen; (L) Ein mit Diversin-MOs und *Diversin*-mRNA der Maus injizierter Embryo. (M,N) *In situ*-Hybridisierung von *tbx6* im 70% Epiboly-Stadium (laterale Ansicht, anterior ist oben, dorsal ist rechts). (M) Nichtinjizierte Kontrolle; (N) Ein mit Diversin-MOs injizierter Embryo mit Expansion der *tbx6*-Expressionsdomäne. (O,P) *In situ*-Hybridisierung von *pax2.1* im 5-Somiten-Stadium (laterale Ansicht, anterior ist links, dorsal ist oben; die Pfeilspitze markiert die Mittelhirn-Hinterhirngrenze). (O) Nichtinjizierte Kontrolle; (P) ein mit Diversin-MOs injizierter Embryo mit ventraler Expansion der *pax2.1*-Expressionsdomäne.

Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von Maus- und Zebrafisch-Diversin-mRNA zu einer starken Ventralisierung. Injizierten Embryonen fehlte der Kopf und Strukturen der dorsalen Mittellinie, typische Merkmale einer Ventralisierung (Abb. 18A,B). *In situ*-Hybridisierungen früher Embryonalstadien bestätigten diesen Phänotyp und zeigten den vollständigen Verlust der Goosecoid-Expression sowie eine extreme Ausdehnung des normalerweise ventral-exprimierten Gens *Eve1* (Abb. 18D,F).

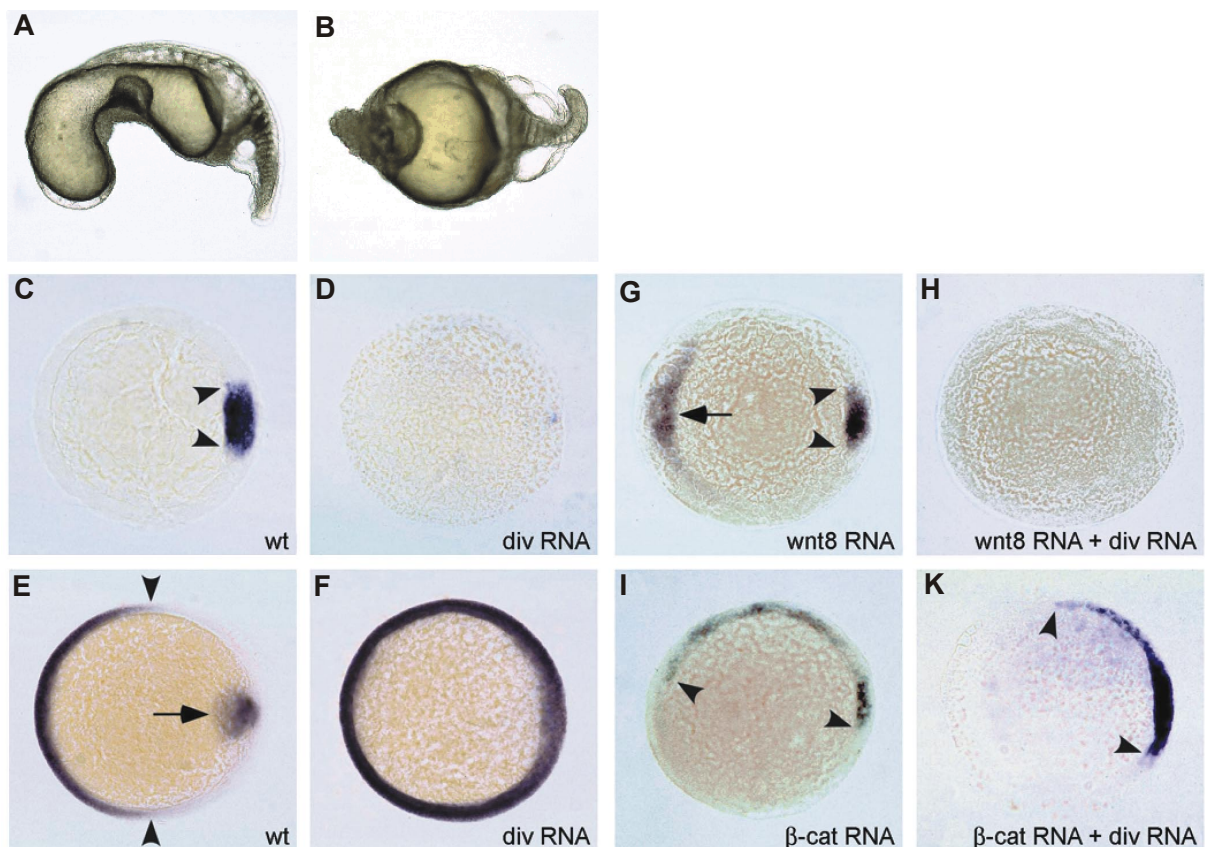


Abb. 18: Überexpression von Diversin ventralisiert Zebrafischembryonen. (A,B) Durch Injektion von Diversin-mRNA stark ventralisierte Embryonen 30 Stunden nach Fertilisierung (A Klasse 3, B Klasse 4 (Mullins et al., 1996)). (C,D) *In situ*-Hybridisierung für *gsc* von Embryonen im Shield-Stadium. (C) Kontrolle; (D) Diversin-mRNA-injizierter Embryo. (E, F) *In situ*-Hybridisierung für *eve1* im ventralen Mesoderm (Pfeilspitzen) und *gsc* in der „prechordal plate“ von Embryonen im 70%-Epiboly-Stadium; (E) Kontrolle; (F) Diversin-mRNA-injizierter Embryo mit Expansion der *eve1*-Expression und Verlust der *gsc*-Expression. (G-K) Analyse der *gsc*-Expression zeigt, dass Diversin die durch Wnt8-, aber nicht die durch β -Catenin-induzierte Signaltransduktion im Zebrafischembryo blockiert. (G) Wnt8-injizierter Embryo. Der Pfeil demonstriert ektopische *gsc*-Expression auf der ventralen Seite. (H) Mit Wnt8- und Diversin-mRNA injizierter Embryo. (I) Mit β -Catenin-mRNA injizierter Embryo. (K) Mit β -Catenin- und Diversin-mRNA injizierter Embryo. Pfeilspitzen verweisen auf die lateralen Grenzen der *gsc*-Expression. Alle Embryonen in animaler Ansicht, dorsal ist rechts.

Zur epigenetischen Einordnung von Diversin wurde dessen Einfluss auf die Aktivität anderer Wnt-Komponenten während der Embryogenese des Zebrafisches untersucht. Die Injektion von Wnt8- und β -Catenin-mRNA induzierte einen zur Diversin-MOs-Injektion identischen Phänotyp: Dorsalisierung und eine verbreiterte- oder ektopische Expression von Goosecoid (Abb.18G,I). In Ko-Injektionsexperimenten blockierte Diversin Wnt8, aber nicht β -Catenin (Abb.18H,K). Diese Experimente belegen eine Funktion von Diversin als Inhibitor des β -Catenin-Signals während der Embryogenese des Zebrafisches. Sie zeigen weiterhin, dass Diversin im Zebrafisch unterhalb des Wnt-Liganden und oberhalb von β -Catenin in den Signalfluss eingreift.

4.12 Diversin aktiviert Wnt/JNK-Signale und beeinflusst die Konvergenz und Extension im Zebrafisch

Mit Diego wurde kürzlich in *Drosophila* ein Regulator planarer Zellpolarität charakterisiert, der strukturelle Verwandtschaft zu Diversin aufweist (Feiguin et al., 2001). Genauere Vergleiche der Primärstruktur von Diego und Diversin ergaben 35% Identität in der Region der Ankyrin-Repeats und nur 18% Identität in den übrigen Domänen. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Diego und Diversin zu charakterisieren, wurden beide Moleküle in biochemischen und funktionellen Analysen miteinander verglichen. In Immunpräzipitations-Experimenten interagierten Diego und Diversin mit CKI ϵ (Abb.19). Im Unterschied zu Diversin war Diego aber nicht in der Lage, mit *Drosophila*-Axin oder Maus-Conductin zu interagieren (Daten nicht gezeigt).

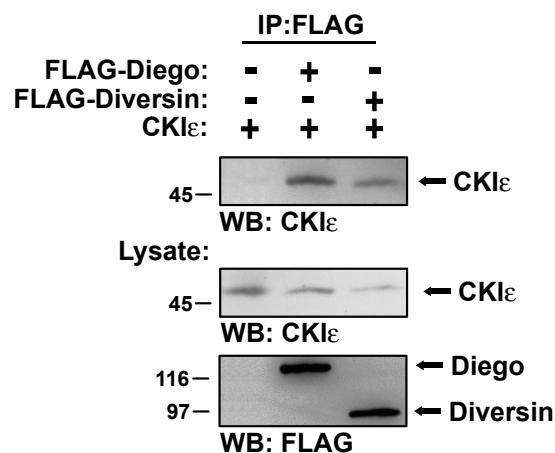


Abbildung 19: Diego und Diversin interagieren mit CKI ϵ . Diego und Diversin interagieren mit humaner CKI ϵ in Ko-Immunpräzipitationen nach Expression in 293-Zellen.

Eine mögliche Funktion von Diversin in der Wnt/JNK-Signalkaskade wurde in JNK-abhängigen Reporterassays untersucht. Transfektion von Diversin-cDNA in 293-Zellen aktivierte die JNK-abhängige Transkription. Dabei war die Aktivität von Diversin abhängig von der Menge transfizierter cDNA (Abb. 20). Ausserdem verstärkte Diversin die Aktivität von Wnt11 und Dishevelled, zweier etablierter Aktivatoren des Wnt/JNK-Signalweges. Im Gegensatz dazu hatte Diversin keinen Einfluss auf die durch MEKK induzierte JNK-Aktivierung (Abb. 20). Transfektion von Wnt1-cDNA, eines spezifischen Liganden des Wnt/ β -Catenin-Weges, hatte keinen Einfluss auf die JNK-abhängige Transkription. Gleiche Mengen Wnt1-cDNA aktivierten dagegen Lef-1/Tcf-abhängige Transkription (Abb. 20, rechtes Diagramm), was die Spezifität der analysierten Signalverläufe und der darin getesteten Komponenten beweist.

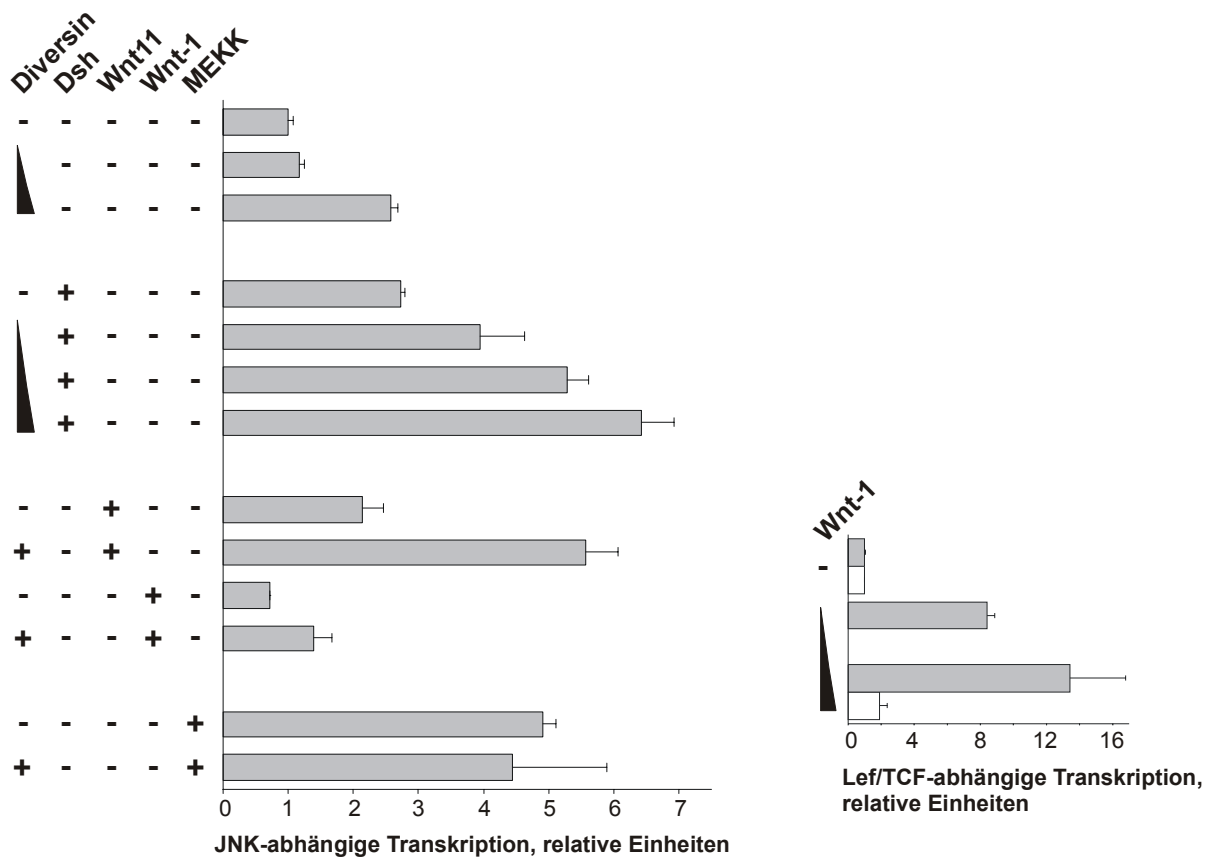


Abbildung 20: Diversin stimuliert JNK-abhängige Transkription in 293-Zellen. Transfektion von Diversin aktiviert die Expression eines JNK-abhängigen Reporterkonstruktes (Pathdetect-Kit, Stratagene) und kooperiert mit Dishevelled- und Wnt11- bei der Aktivierung JNK-abhängiger Transkription. Transfektion von MEKK diente als Kontrolle (links). Transfektion von Wnt1 führte nicht zur Aktivierung JNK-abhängiger Transkription. In Kontrolleexperimenten stimulierte Wnt1 die Lef-1/Tcf-abhängige Transkription (rechts).

Diego ist funktionell an der Ausprägung planarer Zellpolarität in *Drosophila*-Epithelien beteiligt (Feiguin et al., 2001). Die Polarität und Migration dorsal-mesodermaler Zellen des gastrulierenden Vertebraten-Embryos wird offenbar durch ähnliche Signale gesteuert, die planare Zellpolarität kontrollieren (Sokol, 2000). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Diego und Diversin auf Zellwanderungsprozesse während der Gastrulation im Zebrafisch untersucht. Die Induktion dorsaler Strukturen ist Voraussetzung für deren anschließende Wanderung während der Gastrulation des Vertebraten-Embryos. Die frühe ventralisierende Aktivität von Diversin könnte also eine spätere Funktion im gastrulierenden Embryo überdecken. Deshalb wurden verschiedene Konzentrationen von Diversin MOs bzw. Diversin- und Diego-mRNA in Zebrafisch-Embryonen injiziert und die Embryonen hinsichtlich Störungen der Gastrulationsbewegungen analysiert. Embryonen, in denen geringere Mengen von Diversin MOs keine Dorsalisierung mehr induzierten, zeigten typische Störungen der Konvergenz und Extension (Abb. 21D). Die Embryonen waren in *In situ*-Hybridisierungen für MyoD lateral verbreitert und die Abstände zwischen den Somiten waren verringert (vergleiche Abb. 21D mit der Kontrolle in C). Die korrekte Anlage der dorso-ventralen Identität wurde durch *In situ*-Hybridisierung für Krox20, einem dorso-anterior exprimierten Gen, verifiziert. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Gastrulationsstörungen durch die fehlerhafte Anlage dorsaler Strukturen verursacht wurde. Identische Gastrulationsstörungen während der Zebrafisch-Embryogenese konnten auch durch die Injektion von Diversin- und Diego-mRNA hervorgerufen werden (Abb. 21E,F). Injizierte Embryonen wiesen ein wellenförmiges Notochord und die dadurch verursachte Verkürzung der anterior-posterioren Körperachse auf (Abb. 21A,B).

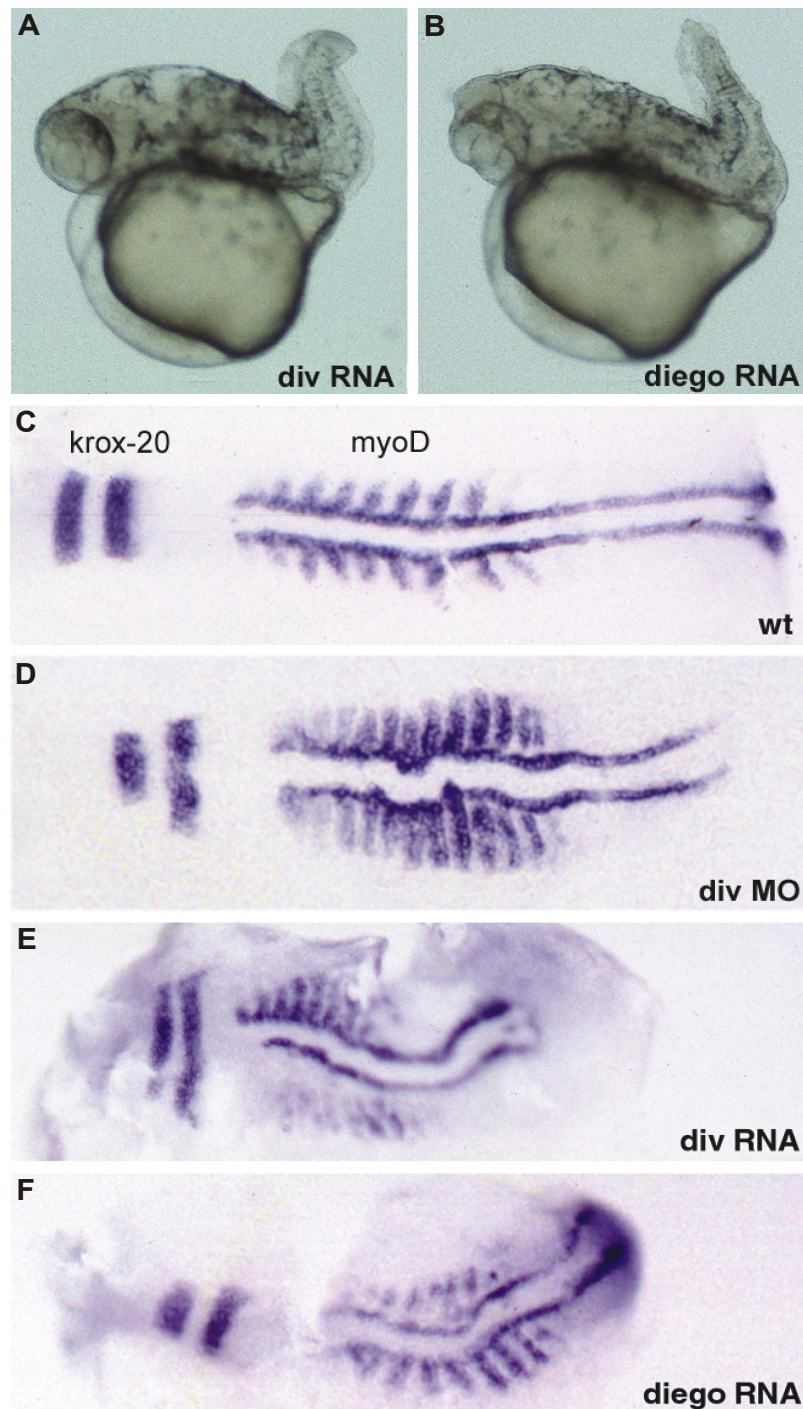


Abbildung 21: Diversin verursacht Störungen in der Konvergenz und Extension in Zebrafischembryonen. Zebrafischembryonen wurden mit 0,1ng Diversin-mRNA (A) bzw. 0,4ng Diego-mRNA injiziert und zeigen 30 Stunden nach Fertilisation Defekte, die typisch für Störungen der Gastrulationsbewegungen sind. (C-F) *In situ*-Hybridisierung für *krox20* und *myoD* in gestreckten Embryonen nach Injektion von Diversin MOs, Diversin- bzw. Diego-mRNA (D-F). *In situ*-Hybridisierung für *myoD* verdeutlicht die für Störungen in Konvergenz und Extension typische Verkürzung der intersomitischen Abstände, die laterale Expansion der Somiten und ein wellenförmiges Notochords. Die dadurch bedingte anterior-posteriore Verkürzung des Embryos ist im Vergleich zur Kontrolle in (C) deutlich sichtbar.

Die durch Diversin verursachten Effekte waren abhängig von der Menge injizierter mRNA. Hohe Dosen von Diversin-mRNA (0,4 ng) ventralisierten 63% der Embryonen (Tabelle 3). Konzentrationen von Diversin, die keine Ventralisierung hervorriefen, ermöglichten die Funktionsanalyse von Diversin während der Gastrulation. So wiesen 51% der Embryonen nach Injektion von 0,1ng Diversin-mRNA Gastrulationsstörungen auf. Nur noch 18% konnten durch diese Konzentration von Diversin ventralisiert werden (siehe Tabelle 3).

Phänotyp der Diversin injizierten Embryonen:

ng mRNA	(Anzahl)	Störung der Gastrulation	Ventralisierung	Wildtyp
0.1	(n=84)	51%	18%	31%
0.2	(n=128)	23%	47%	30%
0.4	(n=94)	14%	63%	23%

Tabelle 3: Diversin induziert in geringen Konzentrationen Gastrulationstörungen und in höheren Konzentrationen Ventralisierung in Zebrafischembryonen. Phänotypanalyse (30 Stunden nach Fertilisierung) nach Injektion verschiedener Konzentrationen von Diversin-mRNA in Zebrafisch (Angaben in Prozent).

Die Injektion identischer Konzentrationen von Diego-mRNA beeinflusste ausschliesslich die Konvergenz und Extension des gastrulierenden Zebrafisch-Embryos. In keiner der getesteten Konzentrationen beeinflusste Diego-mRNA die Etablierung dorso-ventraler Identität. Ausserdem konnte Diego die durch Diversin MOs-induzierte Dorsalisierung nicht blockieren (nicht gezeigt). Diese Experimente sind im Einklang mit den biochemischen Befunden zu Diego und Diversin. Einerseits interagieren beide Proteine mit CKIε, einer ebenfalls an der Wnt/JNK-Übertragung beteiligten Komponente. Andererseits bindet Diego nicht an *Drosophila*-Axin bzw. Maus-Conductin. Diese Daten deuten daraufhin, dass Diego und Diversin innerhalb des Wnt/JNK-Signalweges ähnliche Funktionen ausüben, dass aber die Beteiligung an der Wnt/β-Catenin-Signalübertragung eine spezifische Eigenschaft von Diversin darstellt.