

## 3. Diskussion

Aufgrund seines onkogenen Potentials und der immensen Bedeutung während der Embryonalentwicklung ist die Regulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs für den Organismus essenziell. Die Überwachung des freien, zytoplasmatischen Vorrats von  $\beta$ -Catenin ist dabei entscheidend und obliegt dem  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex. Funktioneller Verlust von essenziellen Komponenten des Komplexes wie Conductin/Axin oder APC durch Mutation führt zur Entstehung von Tumoren. Obwohl über die zentrale Bedeutung dieses Komplexes Einigkeit besteht, sind die molekularen Mechanismen, mit denen der Komplex reguliert wird, nur unscharf umrissen. In der vorliegenden Arbeit konnten neue Regulationsmöglichkeiten des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes identifiziert und charakterisiert werden.

### 3.1. Conductin/Axin

#### 3.1.1. Die Domänenstruktur von Conductin

Im Mittelpunkt der Arbeit steht das Gerüstprotein Conductin. Es stellt die Interaktionsoberfläche für GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin, APC und Diversin bereit und bringt dadurch diese Komponenten in unmittelbare räumliche Nähe. Dieses ist für die effiziente Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin von entscheidender Bedeutung.

Die Deletionsanalyse von Conductin zeigte, dass die konservierten Domänen funktionell identisch zu denen von Axin sind. Die RGS-Domäne ist für die Fähigkeit Conductins, das  $\beta$ -Catenin-Signal negativ zu regulieren, unabdingbar. Im *Xenopus*-System bewirkt der Verlust der RGS-Domäne von Axin die Bildung von Doppelachsen, was auf ein dominant-negatives Verhalten einer solchen Mutante hindeutet (Fagotto et al., 1999). Der Mechanismus dieser dominant-negativen Wirkung ist nicht bekannt. Möglicherweise führt die Expression von Axin $\Delta$ RGS zur Verdrängung endogenen APCs aus dem Abbaukomplex. Das freigewordene APC könnte nun  $\beta$ -Catenin binden und damit den verbliebenen Abbaukomplexen entziehen, was zu einer Stabilisierung  $\beta$ -Catenins führen könnte. Alternativ könnte die RGS-Domäne noch weitere, bisher uncharakterisierte Funktionen haben. Neuere Daten zeigen, dass Frizzled-Rezeptoren offenbar auch über heterotrimere G-Proteine das  $\beta$ -Catenin-Signal aktivieren können (Liu et al., 2001). Dabei sind vorzugsweise die G-Protein- $\alpha$ -Untereinheiten G $_{\alpha q}$  und G $_{\alpha o}$  involviert. Die RGS-Domänen Conductins und auch Axins zeigen einen hohen Ver-

wandtschaftsgrad mit dem G $\alpha$ -Regulator RGS8, der spezifisch G $\alpha_o$  aktiviert. Möglicherweise können die RGS-Domänen Conductins und Axins daher auch G-Protein-vermittelte Prozesse innerhalb der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade beeinflussen, wodurch sich die Effekte der entsprechenden Deletionsmutanten erklären ließen (vgl. auch Kapitel 1.3.1).

Interessanterweise ist auch APC nicht in der Lage, ohne Conductin/Axin-Bindung  $\beta$ -Catenin zu destabilisieren (von Kries et al., 2000). Die Expression von Conductin führt in APC-negativen SW480-Kolonkrebzellen zur Destabilisierung  $\beta$ -Catenins, und damit einhergehend zur Inhibition der Lef/TCF-abhängigen Transkription. Dies deutet daraufhin, dass APC möglicherweise für die Conductin-Funktion nicht zwingend erforderlich ist, in physiologischen Situationen jedoch als wichtiger Kofaktor im Conductin/Axin-Komplex fungiert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bindestelle für GSK3 $\beta$  ebenfalls für die Conductin-Funktion essenziell ist. Expression einer entsprechenden Deletionsmutante Conductins führt in höheren Dosen sogar zu einer Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals. Man geht davon aus, dass nur an die Gerüstproteine Conductin und Axin gebundene GSK3 $\beta$  zur Phosphorylierung und damit einhergehend zur Destabilisierung  $\beta$ -Catenins führt. Dies kann das beobachtete Verhalten von Conductin $\Delta$ GSK erklären: ein solches Protein verdrängt alle anderen essenziellen Komponenten (APC etc.) aus endogenen Abbaukomplexen, ohne jedoch die Interaktionsoberfläche für die erforderliche Kinase bereitzustellen.

Die Bindung von Conductin an  $\beta$ -Catenin scheint in dem gewählten System ebenfalls unabdingbar zu sein. Eine für die  $\beta$ -Catenin-Bindestelle deletierte Conductin-Mutante ist nicht mehr in der Lage, die Aktivierung der Lef/ $\beta$ -Catenin-abhängigen Transkription zu blockieren. Obwohl  $\beta$ -Catenin noch über APC mit dem Abbaukomplex interagieren kann, ist die generelle Bindung von  $\beta$ -Catenin an den Abbaukomplex offenbar nicht ausreichend für eine effiziente Degradation. Möglicherweise muss  $\beta$ -Catenin für eine effiziente Phosphorylierung in nächste Nähe zu GSK3 $\beta$  und CKI $\epsilon$  gebracht werden, was nur durch die Bindung an Conductin gewährleistet werden könnte.

Die carboxyterminal der GSK-Bindedomäne gelegenen Abschnitte Conductins, inklusive der DIX-Domäne, scheinen im verwendeten Zellsystem für die Funktion Conductins nicht essenziell zu sein. Im Konstrukt Conductin N fehlen die Bindestellen für PP2A, MEKK und CKI $\alpha$ . Von MEKK konnte bis jetzt noch keine Funktion innerhalb des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs nachgewiesen werden (Zhang et al., 1999). Ebenfalls scheint die Bindung von CKI $\alpha$  in diesem Bereich Conductins (Liu et al., 2002) für die Grundfunktion Conductins nicht entschei-

dend zu sein. Möglicherweise kann hier die über Diversin rekrutierte  $\epsilon$ -Isoform von CKI kompensieren (siehe auch Kapitel 3.3.6)

Für die am äußersten C-Terminus gelegene DIX-Domäne wurde die Beteiligung an der Interaktion mit Dvl und LRP5 gezeigt. Dvl bildet eine intrazelluläre Relaisstation des Wnt-Signals. Daher könnte man annehmen, dass die Interaktion von Dvl mit dem Abbaukomplex hauptsächlich zur dessen Inhibition infolge ankommender Signale dient. Die Interaktion von Axin mit LRP5 ist ebenfalls signalabhängig. Von diesen beiden Bindungspartnern ausgehend, könnte man daher vermuten, dass die DIX-Domäne Conductins hauptsächlich für die Aufnahme und Weiterleitung von stromaufwärts generierten Signalen wichtig und für die Grundfunktion des  $\beta$ -Catenin-Abbaus entbehrlich ist. Weiterhin wurde die DIX-Domäne mit der Oligomerisierung von Axin in Zusammenhang gebracht. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass im Fall von Conductin die DIX-Domäne für die Oligomerisierung nicht notwendig ist. Die Mutante Conductin N hingegen kann nicht mehr oligomerisieren. Trotzdem kann auch dieses Konstrukt die  $\beta$ -Catenin-Aktivierung effizient hemmen. Dies könnte bedeuten, dass die Di- oder Oligomerisierung ebenfalls für die Grundfunktion Conductins nicht notwendig ist. Die Befunde dieser Arbeit können sowohl der DIX-Domäne als auch der Oligomerisierung eine Rolle bei der synergistischen Aktivierung  $\beta$ -Catenins durch Frat-1 und Diversin zuweisen (siehe auch Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Unter der Annahme, dass die Synergie von Frat-1 mit Diversin ein regulierendes System darstellt, deuten auch diese Befunde auf eine eher regulative Rolle der DIX-Domäne sowie der Oligomerisierung hin.

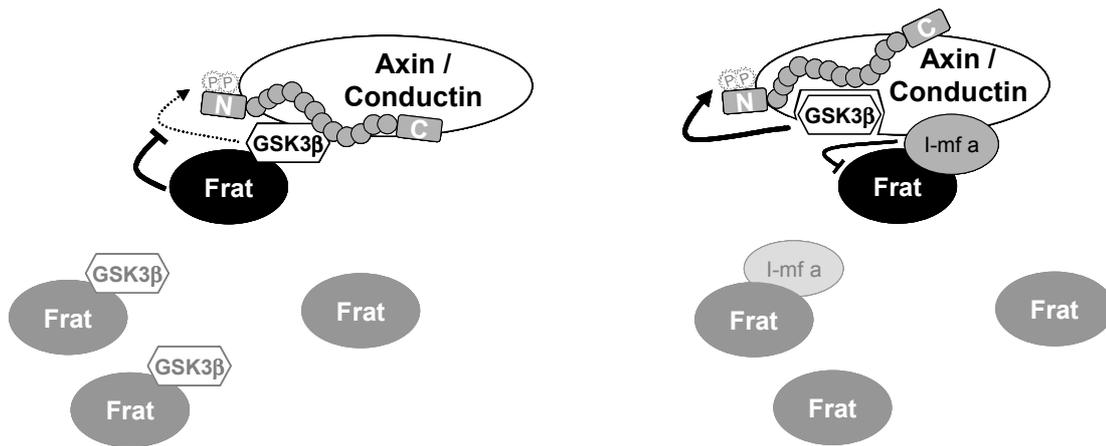
## 3.2. I-mf

Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems konnte I-mf a als Bindungspartner von Conductin identifiziert werden. I-mf bindet C-terminal der  $\beta$ -Catenin-Bindedomäne an Conductin.

### 3.2.1. Mechanismus der I-mf Wirkung

I-mf a bindet sowohl Conductin als auch Frat-1 und regelt die Verteilung von GSK3 $\beta$  zwischen den beiden antagonistischen Molekülen. Dabei wird in Anwesenheit von I-mf a der Verbleib von GSK3 $\beta$  an Conductin favorisiert. Die Tatsache, dass I-mf a auch an Frat-1 bindet, deutet auf einen kompetitiven Mechanismus hin. Die Deletionskartierung der Interaktion zeigt, dass I-mf a dieselbe Bindestelle an Frat-1 wie GSK3 $\beta$  belegt. Zudem können keine Tripelkomplexe aus I-mf a, Frat-1 und GSK3 $\beta$  detektiert werden, was auf eine sich gegenseitig ausschließende Interaktion hinweist. Vorstellbar ist daher ein Mechanismus, in dem Conductin-ständiges I-mf a die GSK3 $\beta$  von Frat-1 abschirmt. Frat-1 bindet an Stelle von GSK3 $\beta$  an I-mf a, welches in diesem Zusammenhang ein Pseudosubstrat für Frat-1 darstellt.

Conductin und Frat-1 kompetieren um GSK3 $\beta$ : Frat-1 verringert den GSK3 $\beta$ -Gehalt in Conductin-Immunkomplexen, und umgekehrt verdrängt Conductin ebenso GSK3 $\beta$  aus Frat-1-Immunkomplexen. Interessanterweise ist die I-mf a-vermittelte Modulation dieser Konkurrenz gerichtet: GSK3 $\beta$  bindet in Anwesenheit von I-mf a präferenziell an Conductin. Umgekehrt ist I-mf a per se nicht in der Lage, GSK3 $\beta$  von Frat-1 zu verdrängen (vgl. Abbildung 2-7B, Spur 6). Vermutlich hat die Domäne III von Frat-1 eine ungleich höhere Affinität zu GSK3 $\beta$  wie zu I-mf a. Daher könnte man annehmen, dass die Interaktion von I-mf a mit Conductin-Abschnitten in unmittelbarer Nachbarschaft zur GSK3 $\beta$ -Bindestelle die Affinität von Conductin für GSK3 $\beta$  erhöht. Damit erhielte die Bindung von I-mf a an Conductin zwei Implikationen. Erstens könnte I-mf a eine genau platzierte GSK3 $\beta$ -„Attrappe“ für Frat-1 darstellen. Zweitens könnte die Anwesenheit von I-mf a die Bindung von GSK3 $\beta$  an Conductin verstärken, beispielsweise über eine bindungsinduzierte Konformationsänderung der benachbarten GSK-Bindedomäne. Eine solche Modellvorstellung der I-mf-Wirkung ist in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3-1:** Schematische Übersicht der Modellvorstellung zum I-mf a-Mechanismus im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

### 3.2.2. I-mf und $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription

Ein solcher Mechanismus der I-mf-Wirkung könnte teilweise auch die beobachteten Effekte von I-mf in den Reporter-Experimenten erklären. Die Frat-1-vermittelte Aktivierung des Wnt-Reporters wird von I-mf a nicht beeinflusst, da die Affinität zu Frat-1 für eine effiziente Konkurrenz mit GSK3 $\beta$  nicht ausreicht. Die Fähigkeit Conductins, Wnt- und Dvl-induzierte Transaktivierung zu blockieren wird durch I-mf a ebenfalls nicht eingeschränkt, da diese beiden Wnt-Agonisten vermutlich nicht über Frat-1 auf den Conductin-Komplex wirken. Man könnte allerdings erwarten, dass I-mf a die negative Wirkung auf Frat-1-vermittelte Reporteraktivierung verstärkt, was jedoch nicht der Fall ist. Vermutlich ist das verwendete Überexpressionssystem zu insensitiv, um feine regulatorische Schwankungen zu detektieren. Große Mengen von Conductin für sich erlauben bereits eine optimale Blockade von Frat-1, so dass ein zusätzlicher Schutz der GSK3 $\beta$  vor Frat-1 in diesem Testsystem keine sichtbaren Konsequenzen hat.

Für die Region des Conductin-Polypeptids, an die I-mf a bindet, sind bereits regulative Interaktionen beschrieben worden, wie beispielsweise die Protein Phosphatase PP2A (Hsu et al., 1999) oder Axam (für Axin associated molecule), ein kürzlich identifiziertes Protein mit Homologien zum desumoylierenden Enzym Senp1 (Kadoya et al., 2000; Nishida et al., 2001). Überdies konnte die Interaktion der entsprechenden Regionen von Axin und Conductin mit dem TGF $\beta$ -Effektor Smad 3 gezeigt werden (Furuhashi et al., 2001). All diese Interaktionspartner scheinen nach vorliegender Datenlage nicht für die Basisfunktion von Conductin/Axin

notwendig zu sein. Jedoch eröffnen sie neue Regulationsmöglichkeiten, im Falle von Smad 3 möglicherweise die Wechselwirkung von Wnt- und TGF $\beta$ -Signalweg. Zusammengenommen lässt dies die Hypothese zu, nach der die zwischen  $\beta$ -Catenin- und DIX-Domäne gelegene Region von Conductin/Axin eine generelle Interaktionsoberfläche für Regulatoren darstellt. Die grundsätzliche Funktionalität von Axin/Conductin wird im Einklang mit der durchgeführten Deletionskartierung von den N-terminalen Domänen vermittelt.

### 3.2.3. Die mögliche Bedeutung von I-mf *in vivo*

Weiteren Aufschluss über eine mögliche Bedeutung von I-mf für den Wnt-Signalweg ergibt der Phänotyp der I-mf-knockout-Maus. Verlust des I-mf-Gens führt, abhängig von dem genetischen Hintergrund, zu Fehlentwicklung der Plazenta und zu Abnormalien des Skeletts (Kraut et al., 1998).

Die Plazentadefekte resultieren aus der Unterentwicklung eines bestimmten Nährzelltyps, den sogenannten Trophoblasten-Riesenzellen. Den gegenteiligen Effekt, nämlich die ektopische Entstehung zusätzlicher Trophoblasten-Riesenzellen, hat der knockout von Wnt 2 zur Folge (Monkley et al., 1996). I-mf a könnte also bei der Entwicklung dieses Zellsystems das Wnt 2-Signal durch Stabilisierung der Conductin/Axin-GSK3 $\beta$ -Interaktion limitieren.

Der Skelettphänotyp birgt ebenfalls Implikationen für eine Rolle von I-mf a als negativer Modulator von Wnt-Signalen. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist für die dorsale Musterung der Somiten verantwortlich und induziert die Expression des muskelspezifischen Transkriptionsfaktors MyoD (Fan et al., 1997; Tajbakhsh et al., 1998). Der skelettbildende Sklerotom-Teil und der ventrale Teil der Somiten ist eine Hauptexpressionsdomäne von I-mf. In beiden Kompartimenten ist die Eindämmung des Wnt-Signals für die korrekte Musterung von kritischer Bedeutung. Diese Hypothese wird unterstützt durch den Befund, dass Überexpression von Wnt-1 im Somiten die gleichen Konsequenzen hat wie der Verlust von I-mf a, nämlich die Inhibition der Chondrogenese (Capdevila et al., 1998). Insbesondere im Sklerotom-Teil des Somiten muss sichergestellt werden, dass kein muskelspezifisches Differenzierungsprogramm abläuft. I-mf a kann dort eine Doppelrolle erfüllen, da es auch in der Lage ist, durch Bindung an MyoD dessen Aktivität zu inhibieren (Chen et al., 1996).

Mit HIC (Human I-mf a-domain containing protein) ist kürzlich ein Protein isoliert worden, welches eine hohe Homologie zum Isoform a-spezifischen C-Terminus von I-mf aufweist (Thebault et al., 2000). Das *Xenopus*-Homologe von HIC, XIC, ist in der Lage, Wnt-Signale zu blockieren (Snider et al., 2001). Diese Befunde eröffnen die Möglichkeit, dass I-mf-

ähnliche Moleküle auch in anderen Geweben bei der Kontrolle von Wnt-Signalen eine Rolle spielen. So wird HIC beispielsweise im Darmepithel exprimiert, einem Gewebe, in dem der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg wichtig ist und zudem auch Frat-1 exprimiert ist.

L. Snider und Kollegen konnten zeigen, dass I-mf a und das verwandte XIC an Xtcf-3 binden und dessen DNA-Bindung verhindern können (Snider et al., 2001). Die Konsequenz ist die Blockade von  $\beta$ -Catenin in *Xenopus laevis*. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass I-mf a auch in Säugerzellen mit dem Transkriptionsfaktor Lef-1 koimmunpräzipitiert. Dieser Umstand ist insofern verwunderlich, da mit HA- oder Flag-markierten I-mf Molekülen nur eine zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden konnte (C.Asbrand, unveröffentlichte Beobachtung). Ein Grund hierfür könnte die Verwendung von heterologen Epitopen (HA und Flag) sein, die möglicherweise einen Kerntransport verhindern. Kürzlich konnte im *Xenopus*-System gezeigt werden, dass ein erheblicher Anteil des zellulären Xtcf-3 Vorrats zytoplasmatisch vorliegt und im Wnt-Signal involviert ist (Lee et al., 2001). Möglicherweise ist diese Teilmenge von Xtcf-3 das Ziel der I-mf a bzw. XIC Interaktion.

Zusammengenommen ergibt sich ein Bild von I-mf a als ein negativer Regulator des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges. Dieses Ziel wird durch Stärkung der Bindung von Conductin an GSK3 $\beta$  und möglicherweise auch durch die Blockierung von HMG-Box-Transkriptionsfaktoren erreicht.

### **3.3. Diversin**

Mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid Screens wurde Diversin in unserer Arbeitsgruppe von Thomas Schwarz-Romond als Interaktionspartner von Conductin identifiziert (Schwarz-Romond et al., 2002). Diversin bindet auch an Axin. Für die Interaktion mit Conductin/Axin ist sind die C-terminalen 130 Aminosäuren von Diversin verantwortlich. Mit seiner zentralen Domäne von Position 280 bis 580 bindet Diversin zudem an Casein Kinase I $\epsilon$ . Von CKI $\epsilon$  konnte gezeigt werden, dass sie unterhalb von Dvl an der Weiterleitung des Wnt-Signals beteiligt ist (Peters et al., 1999; McKay et al., 2001). Diese Befunde deuten auf eine zentrale Rolle von Diversin innerhalb des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges hin.

Insbesondere die initiale Beobachtung, dass Diversin mit der GSK3 $\beta$ -Bindungsdomäne von Conductin interagiert, deutet auf eine Regulationsmöglichkeit der Conductin-ständigen GSK3 $\beta$  hin und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersucht.

#### **3.3.1. Auswirkungen von Diversin und Frat-1 auf GSK3 $\beta$**

Im einfachsten Fall wäre Diversin aufgrund der mit GSK3 $\beta$  überlappenden Bindestelle in der Lage, GSK3 $\beta$  aus dem  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex zu verdrängen. Ist dies der Fall, so sollte Diversin und insbesondere auch die Conductin-Bindedomäne von Diversin das  $\beta$ -Catenin-Signal aktivieren. Im Reporter-Experiment konnte eine Diversin-vermittelte Aktivierung jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache mag in einer geringeren Conductin/Axin-Affinität von Diversin im Vergleich zu GSK3 $\beta$  liegen. Daher wurde untersucht, ob Diversin mit Frat-1, welches direkt GSK3 $\beta$  angreift, kooperieren kann. In der Tat führt die Koexpression von Diversin zu einer Vervielfachung der Frat-1 vermittelten  $\beta$ -Catenin-Aktivität. Dieser Effekt ist als Synergie zu bezeichnen, da die durch das Zusammenspiel beider Moleküle erreichte Signalaktivität größer ist als die Summe der jeweiligen Einzelaktivitäten.

Entsprechend einem erwarteten Verdrängungsmechanismus erweist sich die Conductin-Bindedomäne als notwendig für den Synergieeffekt. Überdies vermittelt eine Diversin-Mutante, die nur die Conductin-Bindedomäne beinhaltet und quantitativ am stärksten an Conductin bindet, zusammen mit Conductin die weitaus größte Synergie (siehe Abbildung 2-23). Ebenso unterstützt die vergleichende Feinanalyse der Bindungsstellen von Diversin und GSK3 $\beta$  an Conductin im Hefe-2-Hybrid-System eine solche Modellvorstellung. In diesen

Experimenten konnten die jeweiligen Bindedomänen von Diversin bzw. GSK3 $\beta$  im Conductin-Protein nicht separiert werden, was einen gegenseitigen Ausschluss der beiden Interaktionen mit Conductin nahe legt.

Im Gegensatz dazu zeigt sich in der Koimmunpräzipitation jedoch, dass Diversin die Menge an Conductin-gebundener GSK3 $\beta$  nicht beeinflusst. Dieser Befund steht im Einklang mit den Daten aus den Reporter-Experimenten, in denen Diversin alleine das  $\beta$ -Catenin-Signal nicht aktiviert (siehe oben). Darüber hinaus zeigen die Immunpräzipitationsexperimente, dass Diversin die durch Frat-1 erreichte Verdrängung von GSK3 $\beta$  aus dem Conductin-Komplex nicht nochmals steigern kann. Unbeschadet davon könnte Diversin trotzdem die Frat-1-vermittelte Verdrängung von GSK3 $\beta$  aus dem Abbaukomplex erhöhen. So ist denkbar, dass die Bindung von Diversin die Kinetik der Frat-1-vermittelten Dissoziation von GSK3 $\beta$  beschleunigt und damit die Effizienz von Frat-1 erhöht.

Von Frat-1 konnte in dieser Arbeit und von anderen gezeigt werden, dass es die Dissoziation von GSK3 $\beta$  aus dem Conductin/Axin-Komplex fördert (Li et al., 1999a; Farr, III et al., 2000). Dies führte zur Ansicht, dass dies den Mechanismus der GSK3 $\beta$ -Inaktivierung durch Frat-1 oder GBP darstellt. Allerdings gibt es auch Befunde, die zeigen, dass Frat-1 in der Lage ist, die Kinaseaktivität von GSK3 $\beta$  zu blockieren (Yost et al., 1998; Thomas et al., 1999; Culbert et al., 2001). So führt beispielsweise die adenovirale Expression von Frat-1 in PC12 Zellen sowohl zur Stabilisierung  $\beta$ -Catenins als auch zur Dephosphorylierung von tau, einem GSK3 $\beta$ -Substrat außerhalb des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (Culbert et al., 2001). Dies deutet daraufhin, dass Frat-1 möglicherweise auch die Aktivität von GSK3 $\beta$ -Molekülen, welche nicht an Conductin oder Axin gebunden sind, inhibieren kann. Diversin synergisiert mit Frat-1, ohne jedoch dessen Fähigkeit zur GSK3 $\beta$ -Verdrängung zu steigern. Dieser Befund deutet daraufhin, dass Diversin möglicherweise die Frat-1-vermittelte Inhibition der katalytischen Aktivität von GSK3 $\beta$  unterstützen kann. Zur genaueren Klärung einer solchen Möglichkeit empfehlen sich *in vitro* Kinase Experimente.

### **3.3.2. Die Rolle Conductins bei der Synergie von Diversin und Frat-1**

Trotz der überlappenden bzw. möglicherweise identischen Bindestellen an Conductin können Diversin und GSK3 $\beta$  gleichzeitig mit Conductin interagieren. Dies beweisen die *in vivo* beobachteten Tripelkomplexe aus Diversin, Conductin und GSK3 $\beta$ . Da Diversin alleine nicht mit GSK3 $\beta$  interagieren kann, deuten die Befunde auf eine Brückenfunktion Conductins zwischen

den beiden Molekülen hin. Conductin und auch Axin können oligomerisieren (Hsu et al., 1999), was einen möglichen Mechanismus für das Zustandekommen der Tripelkomplexe darstellt. In der Tat kann in Anwesenheit eines Oligomerisierungs-defizienten Conductin-Fragments keine indirekte Interaktion zwischen Diversin und GSK3 $\beta$  beobachtet werden. Analog dazu blockiert Conductin N (ebenfalls Oligomerisierungs-defizient) den Synergieeffekt von Diversin und Frat-1, was die funktionelle Relevanz der Tripelkomplexe für den Synergieeffekt unterstreicht. Die Überexpression von wildtypischem Conductin hingegen erhöht im Reportersystem das Ausmaß der Synergie. Diesem Effekt liegen wahrscheinlich die Stöchiometrie der beteiligten Komponenten zugrunde. Ohne exogenes Conductin liegt vermutlich mehr Diversin als Conductin/Axin-Komplexe vor. So mögen zwar alle Komplexe mit Diversin für den Angriff von Frat-1 optimal konfiguriert sein, das überschüssige Diversin jedoch bleibt ungenutzt. Die Vermutung, dass die endogenen Conductin-Komplexe limitierend sind, findet Unterstützung bei der Betrachtung der absoluten Reporteraktivitäten. Diese sind ohne exogenes Conductin mit Abstand am höchsten. In Anwesenheit von überexprimiertem Conductin hingegen ist die Absolutaktivität wesentlich, etwa um den Faktor 3, kleiner, im Einklang mit einer höheren Gesamtanzahl von Conductin-Komplexen und nun möglicherweise limitierenden Frat-1-Mengen. In diesem Fall aber kann nun auch das zuvor überschüssige Diversin mit Frat-1 kooperieren. Dadurch wird das relative Ausmaß der Synergie erheblich gesteigert (von 3-fach auf 7,5-fach, vgl. Abbildung 2-22). Das Vorhandensein von Tripelkomplexen aus Diversin, Conductin und GSK3 $\beta$  scheint also für den Synergieeffekt grundsätzlich essenziell zu sein. Steigerung der Tripelkomplex-Bildung (durch wildtypisches Conductin) steigert auch die Synergie von Diversin und Frat-1, Blockade der Tripelkomplexe (durch Conductin N) blockiert auch die Synergie.

### 3.3.3. Die Bedeutung der DIX-Domäne von Conductin

Im Zusammenhang mit den beobachteten Tripelkomplexen ist die DIX-Domäne Conductins von besonderem Interesse. Einige Arbeiten zu Axin konnten zeigen, dass diese Domäne für die Oligomerisierungsfunktion notwendig ist (Kishida et al., 1999; Sakanaka & Williams, 1999). Zunächst kann Conductin $\Delta$ DIX, im Gegensatz zu wildtypischem Conductin, die Synergie von Diversin und Frat-1 nicht steigern. Dies ist im Einklang mit einer möglicherweise reduzierten oder gar fehlenden Oligomerisierungsfähigkeit dieser Conductin-Mutante. Andererseits verhält sich Conductin $\Delta$ DIX nicht dominant-negativ wie Conductin N. Dies wiederum ist im Einklang mit den gewonnenen biochemischen Daten, die zeigen, dass Conduc-

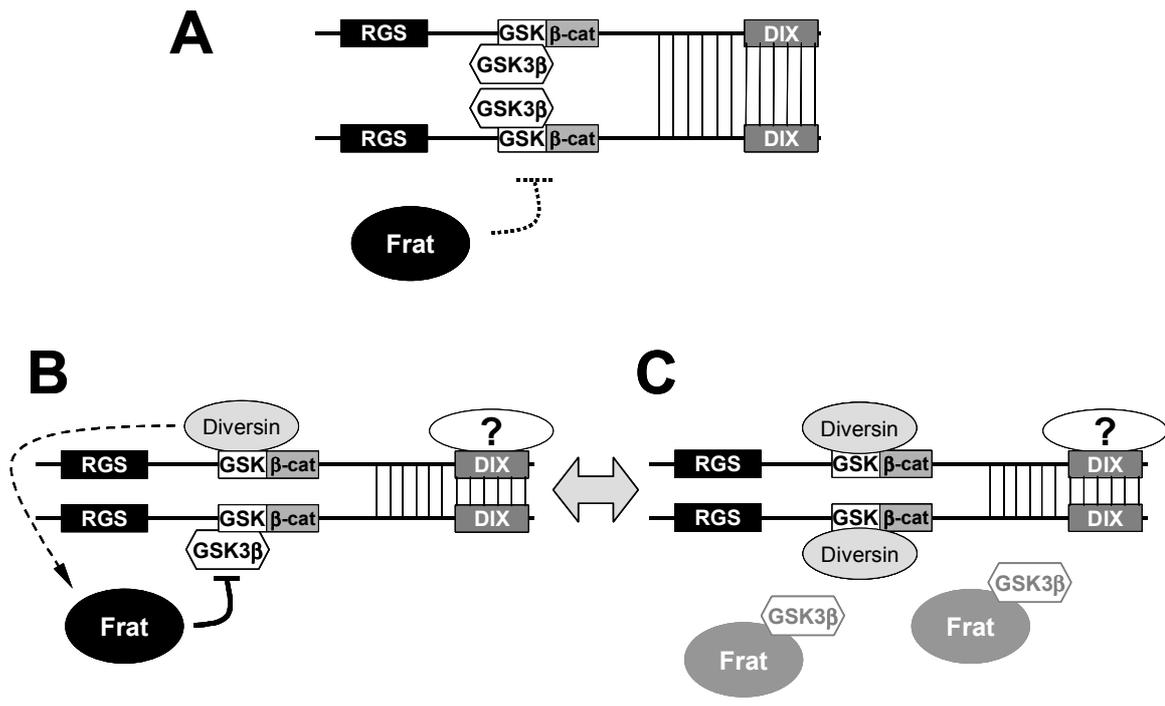
tin $\Delta$ DIX, im Gegensatz zu Conductin N, noch oligomerisieren kann. Daher kann Conductin $\Delta$ DIX auch die indirekte Interaktion von Diversin mit GSK3 $\beta$  vermitteln. Jedoch ist diese Brückenfunktion von Conductin $\Delta$ DIX im Vergleich zu Conductin nur ineffizient. Conductin N dagegen kann diese Brückenfunktion nicht mehr wahrnehmen (vgl. Abbildung 2-25). Um zu überprüfen, ob die Conductin $\Delta$ DIX-vermittelten Tripelkomplexe aufgrund schwächerer Oligomerisierung nur ineffizient zustande kommen, wurde Conductin $\Delta$ DIX mit einer heterologen Dimerisierungsdomäne, tpr, versehen. Das Konstrukt Conductin-tpr oligomerisiert, kann aber ebenfalls nur ineffizient zwischen Diversin und GSK3 $\beta$  überbrücken (vgl. ebenfalls Abbildung 2-25). Analog dazu verhält sich Conductin-tpr, wie Conductin $\Delta$ DIX, im Reporter-Experiment neutral. Solche Conductin-Konstrukte, welche nur ineffizient Tripelkomplexe vermitteln können (Conductin $\Delta$ DIX und Conductin-tpr), führen auch nicht zu einer Steigerung der Synergie.

Die DIX-Domäne hat, zumindest im Hinblick auf die Synergie, offenbar mehr Funktionen als die Oligomerisierung. Die Natur solcher erweiterten Funktionen bleibt an diesem Punkt Spekulation. Sowohl in dieser Arbeit als auch von anderen konnte gezeigt werden, dass diese Domäne für die grundsätzliche Fähigkeit Conductins, den Abbau  $\beta$ -Catenins einzuleiten, nicht notwendig ist (Hedgepeth et al., 1999; Fagotto et al., 1999). Andererseits berichten zwei Studien von beeinträchtigter Axin-Funktion nach Verlust der DIX-Domäne in SW480 Kolonkarzinomzellen (Kishida et al., 1999; Sakanaka & Williams, 1999), ein Befund, der für Conductin in diesem System jedoch nicht reproduziert werden konnte (J. Behrens, persönliche Mitteilung). Li et al. konnten zeigen, dass Überexpression der Axin-DIX-Domäne allein Wnt-Stimulation blockieren kann, was auf die grundsätzliche Beteiligung dieser Domäne an der Signalweiterleitung zum  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex hinweist (Li et al., 1999a). Eine solche Rolle der DIX-Domäne wäre im Einklang mit den Befunden, dass Dvl mit der DIX-Domäne von Axin interagieren kann. Neuere Daten beschreiben den Wnt-Korezeptor LRP5 als weiteren Bindungspartner der Axin-DIX-Domäne (Mao et al., 2001). Axin wird durch diese Interaktion mit dem intrazellulären Teil von LRP5 an die Zellmembran transportiert. Dieser Transport ist abhängig von extrazellulärem Wnt-Liganden und verläuft außerordentlich schnell. Domänen von LRP5, welche für diesen Effekt verantwortlich sind, sind ebenso für die Fähigkeit zur Signaltransduktion des Korezeptors notwendig. Diese Erkenntnisse deuten auf eine zusätzliche Funktion der DIX-Domäne von Conductin/Axin innerhalb der Signalweiterleitung. Der  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex wird demnach signalabhängig in unmittelbarer Nähe der Rezeptoren verbracht und damit die Voraussetzung für seine schnelle Inaktivierung ge-

schaffen. Wnt-gesteuerte Regulation des Abbaukomplexes könnte also auch dessen spezifische Lokalisation beinhalten. Im Hinblick auf das Diversin/Frat-Synergiesystem wäre es beispielsweise vorstellbar, dass die korrekte Positionierung des Conductin/Axin-Komplexes durch die Interaktion mit LRP5 die Fähigkeit zur Tripelkomplex-Bildung mit Diversin und GSK3 $\beta$  begünstigt und damit einen nicht unerheblichen Einfluss auf den Synergieeffekt haben könnte. Unabhängig von LRP5 könnten natürlich auch noch unbekannte Faktoren, die mit der Conductin-DIX-Domäne interagieren, Einfluss auf das Diversin/Frat-1-Synergiesystem nehmen. Eine solche Vorstellung wäre im Einklang mit dem beobachteten Verhalten von Conductin $\Delta$ DIX bzw. Conductin-tpr. Im Gegensatz zu Conductin N verdrängen sie aufgrund ihrer Oligomerisierungsfähigkeit Diversin nicht aus vorhandenen Tripelkomplexen. Man könnte vermuten, dass Conductin $\Delta$ DIX bzw. -tpr in bereits bestehende, endogene Komplexe integriert wird. Dabei könnte sogar endogenes Conductin freigesetzt werden. Dessen Menge wiederum könnte aber zu gering sein, um neue, über die DIX-Domäne korrekt positionierte bzw. gefaltete, Tripelkomplexe herzustellen. Im Gegensatz zu Conductin $\Delta$ DIX und -tpr besitzt wildtypisches Conductin mit seiner DIX-Domäne die Kompetenz, zusätzliche, optimal konfigurierte Tripelkomplexe bereitzustellen. Im Einklang damit führt die Überexpression von wildtypischem Conductin auch zu einer erheblichen Steigerung des relativen Ausmaßes der Synergie von Diversin und Frat-1.

#### **3.3.4. Der Mechanismus der Synergie von Diversin und Frat-1**

Aus den gewonnenen Erkenntnissen über das Synergiesystem aus Diversin und Frat-1 im Zusammenspiel mit Conductin lässt sich eine Modellvorstellung des Synergie-Mechanismus ableiten, die in Abbildung 3-2 schematisch dargestellt ist.



**Abbildung 3-2:** Schematische Modellvorstellung der Diversin/Frat-1-Synergie

In Abwesenheit von Diversin (Abbildung 3-2A) sind an den GSK-Bindedomänen eines Conductin/Axin-Dimers jeweils GSK3β-Moleküle gebunden. Der Zugang von Frat-1 zu diesen könnte aber durch die Konformation des, im einfachsten Fall dimeren, Conductin/Axin-Komplexes beschränkt sein. Bindung von Diversin an ein Conductin/Axin-Molekül (Abbildung 3-2B) könnte nun die Konformation des Komplexes verändern und so Frat-1 den Zugang zur GSK3β erleichtern. Die Stöchiometrie des Systems kann zudem eine Rolle spielen, denn die Bindung eines oder weniger Moleküle Diversin an einen oligomeren Conductin/Axin-Komplex könnte bereits für die Synergie mit Frat-1 ausreichen.

Die biochemischen Analysen konnten zeigen, dass Diversin die Frat-vermittelte Verdrängung von GSK3β nicht befördert. Dies könnte bedeuten, dass die durch Diversin hergestellte Konformationsänderung des β-Catenin-Abbaukomplexes den Zugang für Frat-1 zwar erleichtert, die Dissoziation von GSK3β jedoch nicht. In diesem Fall könnte der Inhibition der GSK3β-Kinaseaktivität durch Frat-1 eine größere Bedeutung zukommen.

Trotzdem gibt es wichtige Indizien, die auf eine durch Diversin gesteigerte Verdrängung von GSK3β hinweisen: beispielsweise die nicht separierbaren Bindestellen von Diversin und GSK3β an Conductin oder die maximale Effizienz der Synergie, die durch die am stärksten an

Conductin bindende Diversin-Mutante. Wie bereits erwähnt, könnte Diversin durch die Konkurrenz mit GSK3 $\beta$  um die Bindung an Conductin auch die Kinetik der Frat-1-vermittelten Dissoziation von GSK3 $\beta$  aus dem Abbaukomplex beschleunigen (Abbildung 3-2C). Daher ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete Synergie von Diversin und Frat-1 aus dem Zusammenspiel von Erleichterung des Frat-1-Angriffes auf GSK3 $\beta$  (Konformationsänderung des oligomeren Conductin-Komplexes) einerseits und gesteigerter Verdrängung von GSK3 $\beta$  durch Diversin andererseits resultiert.

Die DIX-Domäne Conductins könnte über die Dimerisierung Conductins hinaus eine Rolle spielen, indem sie an weitere Faktoren (wie z.B. LRP5 oder noch unbekannte Proteine) bindet, welche ihrerseits Parameter wie Positionierung, Konformation oder Zusammensetzung des Conductin-Komplexes beeinflussen könnten.

### **3.3.5. Diversin und Frat stellen ein evolutionär junges Synergiesystem dar**

Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit ergeben sich neue Sichtweisen auf die Funktion von Frat-1. Die Positionierung von Frat/GBP innerhalb der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Kaskade ist umstritten. Es bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Frat könnte zum einen ein integraler Bestandteil der klassischen Signaltransduktion unterhalb von Dvl sein. Dafür sprechen biochemische Erkenntnisse, nach denen Frat-1 mit der PDZ-Domäne von Dvl interagieren kann (Li et al., 1999a). In einem solchen Modell würde Dvl den Abbaukomplex dadurch hemmen, dass es den GSK3-Inhibitor Frat in unmittelbare räumliche Nähe der Conductin/Axin-ständigen GSK3 $\beta$  bringt. Gegen die Generalität eines solchen Mechanismus spricht jedoch das Fehlen von Frat-homologen Genen in Invertebraten.

Vorstellbar ist auch, dass Frat eine späte Entwicklung der Evolution darstellt und ausschließlich Vertebraten einen alternativen Mechanismus zur GSK3 $\beta$ -Inaktivierung bietet. Dafür sprechen z.B. die Epistase in *Xenopus*. Verlust von GBP inhibiert dort die Bildung der Körperachse (Yost et al., 1998), Blockade von Dvl durch dominant-negative Mutanten hingegen nicht (Sokol, 1996). Außerdem konnte ebenfalls in *Xenopus* gezeigt werden, dass sich GBP und Dvl hinsichtlich der Art und Weise der GSK3 $\beta$ -Inhibition unterscheiden. Interessanterweise entspricht der im Nieuwkoop-Zentrum aktive Modus dem von GBP (Dominguez & Green, 2000).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass das Molekül Diego aus *Drosophila* keine Synergie mit Frat-1 bewirken kann. Bei Diego handelt es sich um ein putatives Homolog von Diversin (Feiguin et al., 2001). Diego besitzt wie Diversin eine N-terminale Ankyrin-Domäne. Die Aminosäureidentität zu Diversin beträgt in diesem Abschnitt etwa 35%. In restlichen Bereichen von Diego und Diversin sind die Aminosäuren nur zu etwa 18% identisch. Zudem kann Diego weder an Conductin noch an *Drosophila* Axin binden (T. Schwarz-Romond, persönliche Mitteilung). Daher liegt der Schluss nahe, dass entweder Diego kein wirkliches Homolog von Diversin ist oder, dass der Synergiemechanismus in *Drosophila* evolutionär nicht entwickelt ist. Weiterhin konnte im vollständig sequenzierten Genom des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* vorläufig kein Diversin Homolog identifiziert werden, was ebenfalls die Vertebraten-Spezifität des Synergiesystems unterstreicht. Daher ist es nach vorliegender Datlage sehr wahrscheinlich, dass sich mit Frat/GBP erst in Vertebraten ein alternativer, von Wnt-Liganden unabhängiger, Mechanismus der  $\beta$ -Catenin-Aktivierung entwickelt hat. Jedoch ist bis heute völlig unklar, wie die Frat/GBP-Aktivität, wenn nicht durch Wnt via Dvl, reguliert wird.

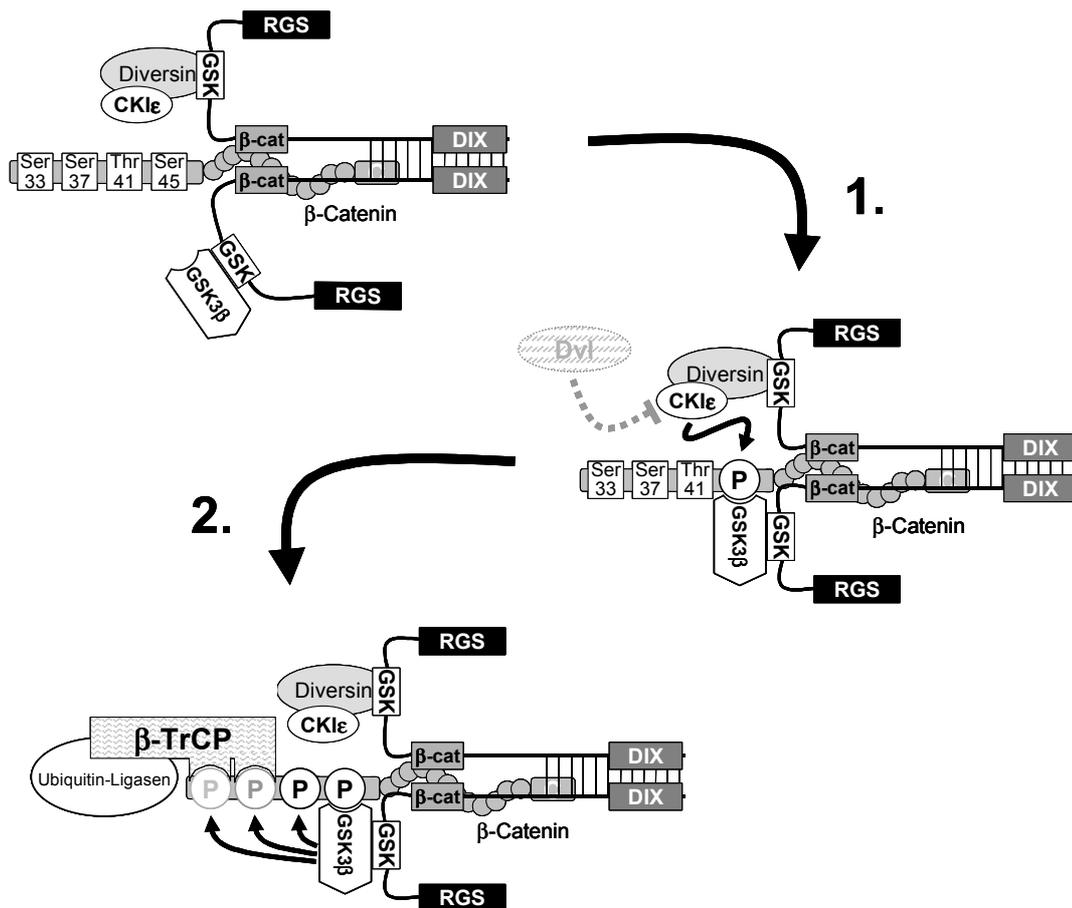
### 3.3.6. Diversin: Regulator der Frat-Aktivität

Die Identifikation von Diversin und die Charakterisierung der funktionellen Synergie mit Frat-1 könnte zur Aufklärung dieser Frage beitragen. Mit Diversin existiert nunmehr ein idealer Kandidat für einen putativen Frat/GBP-Regulator. Als solcher kann Diversin wesentliche Aufgaben erfüllen. Diversin erhöht die Spezifität von Frat/GBP hinsichtlich des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges. Zweitens verfügt Diversin mit seiner N-terminalen Ankyrin-Domäne über eine *bona fide* Proteininteraktionsoberfläche. Dort könnten weitere, noch zu identifizierende Regulatoren über Diversin auf die Frat-1-Aktivität Einfluss nehmen. Bei der Achsenbildung in *Xenopus* beispielsweise ist eine Dorsaldeterminante postuliert worden, welche nach der kortikalen Rotation des Ooplasmas zur lokalen Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führt (Moon & Kimelman, 1998), siehe auch 1.5.1). Ein solches Molekül könnte Diversin spezifisch aktivieren, Diversin wiederum aktiviert das ubiquitär vorliegende Frat/GBP (Yost et al., 1998). Im Einklang mit einer solchen Hypothese ist die ubiquitäre, maternal bereitgestellte Expression im frühen Zebrafisch-Embryo (Schwarz-Romond et al., 2002). Diversin selbst könnte natürlich auch die postulierte Dorsaldeterminante darstellen. Gegen eine solche Funktion Diversins sprechen allerdings Befunde aus der frühen Embryogenese des Zebrafisches *Danio rerio*. T. Schwarz-Romond konnte durch antisense-Ablationsexperimente nach-

weisen, dass der Verlust von endogenem Diversin zu einer Hyperdorsalisierung der Embryonen, also einer Überaktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signals, führt (Schwarz-Romond et al., 2002, siehe auch Kapitel 3.3.7). Überexpression von Diversin führt in diesem System zum gegenteiligen Phänotyp. Allerdings könnte das Diversin/Frat-System auch in anderen Geweben von Bedeutung sein. Beispielsweise wird Diversin im Zebrafisch in spezifischen Hirnarealen exprimiert, murines Frat-1 und-3 ebenfalls (Jonkers et al., 1999).

### 3.3.7. Diversin bildet eine Schaltstation im Wnt-Netzwerk

Die von Thomas Schwarz-Romond durchgeführten Analysen zur Funktion Diversins im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg unterhalb von Dishevelled konnten zeigen, dass Diversin Signale von Wnt-Liganden über Dvl blockieren kann (Schwarz-Romond et al., 2002). Diversin bindet zugleich an Conductin/Axin und an CKI $\epsilon$  und stellt damit ein Brückenmolekül zwischen dem  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex und CKI $\epsilon$  dar. Die durch Diversin an den Abbaukomplex rekrutierte CKI $\epsilon$  könnte dort das Serin 45 im N-Terminus von  $\beta$ -Catenin phosphorylieren und damit dessen proteasomalen Abbau einleiten. Diese Befunde sind im Einklang mit neuen Daten, dass CKI im Allgemeinen (Liu et al., 2002; Yanagawa et al., 2002) und CKI $\delta$  und CKI $\epsilon$  im Besonderen (Amit et al., 2002) auch als negative Komponente im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg wirken (siehe Kapitel 1.4.2). Dadurch ergibt sich ein neues Konzept der Phosphorylierung  $\beta$ -Catenins sowie der Signalweiterleitung von Dvl zu dem Conductin/Axin-Komplex, welches in Abbildung 3-3 schematisch dargestellt ist. In Abwesenheit von Wnt-Signalen phosphoryliert die über Diversin korrekt positionierte CKI $\epsilon$  den Serinrest 45 von  $\beta$ -Catenin. Dieses Phosphoserin kann als „priming“-Phosphat vermutlich von GSK3 $\beta$  gebunden werden. Nun können die Reste Thr41, Ser37 und Ser33 in einem zweiten Schritt durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert werden, was die Erkennung  $\beta$ -Catenins durch  $\beta$ -TrCP ermöglicht. Das konzertierte Wirken beider Kinasen gewährleistet die effiziente, N-terminale Phosphorylierung  $\beta$ -Catenins. In diesem Zusammenhang sind auch die in dieser Arbeit charakterisierten Tripelkomplexe aus Diversin, Conductin und GSK3 $\beta$  von besonderem Interesse. Sie erlauben theoretisch die gleichzeitige Anwesenheit der beiden  $\beta$ -Catenin-Kinasen CKI $\epsilon$  und GSK3 $\beta$  am Abbaukomplex, eine wichtige Voraussetzung für die effiziente Phosphorylierung  $\beta$ -Catenins.



**Abbildung 3-3:** Modellvorstellung der Rolle Diversins bei der β-Catenin-Phosphorylierung

Amit et al. konnten zeigen, dass die CKIe-vermittelte Phosphorylierung β-Catenins von Axin abhängig ist und durch Wnt-Liganden und Dvl blockiert werden kann. Dadurch kann der zweite Schritt, die Phosphorylierung der Reste Thr41, Ser37 und Ser33 β-Catenins durch GSK3β, nicht mehr stattfinden, und β-Catenin wird stabilisiert (Amit et al., 2002). Diese Tatsache eröffnet eine interessante Möglichkeit, wie Diversin die über Dvl eingehenden Signale blockieren könnte. In einem Konzept, in dem Dvl speziell die CKIe-vermittelte Phosphorylierung β-Catenins negativ beeinflusst, führt Diversin dazu, dass mehr CKIe an den Conductin/Axin-Komplex rekrutiert werden kann. CKIe phosphoryliert wiederum Ser45 von β-Catenin mit den bereits diskutierten Folgen. Möglicherweise hat Diversin in diesem Zusammenhang sogar eine aktive Rolle, indem es nicht nur CKIe korrekt positioniert, sondern auch den Zugriff von Dvl auf CKIe regulieren und so auch an der Weiterleitung von Signalen von Dvl an den Conductin/Axin-Komplex beteiligt sein könnte.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Diversin ebenfalls den Wnt/JNK-Signalweg beeinflussen kann. Diese Eigenschaft hat es mit Diego aus *Drosophila* gemeinsam. Diversin kann die Wnt11-vermittelte Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinase stimulieren, wobei die molekularen Details noch unklar sind (Schwarz-Romond et al., 2002).

Diversin kommt damit eine herausragende Rolle im Wnt-Netzwerk zu. Im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg kann Diversin auf der einen Seite laterale Frat-Signale amplifizieren, auf der anderen Seite Signale von Wnt-Liganden über Dvl durch die Rekrutierung von CKI $\epsilon$  blockieren. Diese Eigenschaften Diversins ermöglichen eine differentielle Interpretation eingehender Signale am  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex. Gleichzeitig kann Diversin eingehende Wnt-Signale präzise den korrekten intrazellulären Verzweigungen des Wnt-Netzwerks zuordnen, in dem es den Wnt/JNK-Zweig stimuliert. Diese Eigenschaften Diversins fügen dem Wnt-Netzwerk eine neue Ebene der regulatorischen Komplexität hinzu.

### 3.3.8. Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Diversin und Frat-1 beruhen im wesentlichen auf Überexpressionssystemen. Die Untersuchung der *in vivo*-Funktionen in einem Mausmodell sind aber aller Voraussicht nach sehr komplex, da aufgrund der in Zebrafisch-Embryonen gewonnenen Daten (Schwarz-Romond et al., 2002) von einem sehr frühen, embryonal lethalen Phänotyp einer Diversin-knock out-Maus ausgegangen werden kann. Daher sind konditionelle Mausmodelle, insbesondere mit Hinblick auf die Synergie von Diversin mit Frat, vermutlich informativer. Verlust von Diversin in adulten Geweben, in denen Mitglieder der Frat/GBP-Familie koexprimiert sind, könnten die Rolle der hier charakterisierten Funktion erhellen.

Weiterhin ist der Phänotyp des kombinierten Verlustes von Frat-1 und -3 von großem Interesse und könnte, zumindest indirekte, Erkenntnisse über das Diversin/Frat-System liefern. Die Arbeiten an diesem Mausmodell sind bereits angelaufen (Jonkers et al., 1999).

Der Zebrafisch stellt ein vergleichsweise einfach zu manipulierendes Tiermodell dar. Sowohl Diversin- als auch Frat-Homologe konnten dort bereits isoliert werden (Sumoy et al., 1999). Durch antisense-Ablation können auch hier wertvolle Erkenntnisse über die Funktion von Frat/GBP im Zusammenhang mit Diversin gewonnen werden.

Von herausragendem Interesse ist auch die Frage, wie Diversin selbst reguliert wird und ob die Funktionen Diversins, nämlich Blockade von Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalen durch die Rekrutie-

zung von CKIε, Synergie mit Frat-1 und Aktivierung des Wnt/JNK-Zweiges, gleich einem Schalter selektiv aktiviert werden können. Dabei ist die Ankyrin-Domäne Diversins ein vielversprechender Kandidat für einen Angriffspunkt regulativer Interaktionen mit noch zu identifizierenden Partnern.