

## 5 Diskussion

CK1 und CK2 sind zwei hochkonservierte Serin/Threonin-Proteinkinasen, die ubiquitär in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Beide Kinasen besitzen eine Vielzahl gut charakterisierter Substrate, deren Zahl ständig steigt. Aufgrund ihrer breiten Substratspezifität können CK1 und CK2 äußerst vielfältige Funktionen in der Zelle beeinflussen (Gross und Anderson, 1998; Guerra *et al.*, 1999).

Trotz dieses Wissens sind die genauen Mechanismen der Regulation der Aktivitäten von CK1 und CK2 bis zum heutigen Zeitpunkt weitgehend unverstanden.

CK1 besitzt unter anderem eine Funktion bei der Reparatur der DNA, der Kontrolle des Zell-Zyklus, sowie der Kontrolle des Biorhythmus (Eide und Virshup, 2001; Gross *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1996).

Die Familie der CK1 Proteinkinasen weist 5 verschiedene Isozyme auf: CK1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ . Diese Isozyme unterscheiden sich besonders in ihren terminalen Sequenzbereichen. CK1 $\alpha$  und CK1 $\beta$  besitzen kurze amino- bzw. carboxy-terminale Domänen, wohingegen CK1 $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  durch kurze N-Termini und relativ lange carboxy-terminale Domänen gekennzeichnet sind. Die genaue Funktion der carboxy-terminalen Domäne ist dabei noch ungeklärt (Fish *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurden CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  eingesetzt. Beide Isozyme zeigen eine sehr große Homologie zueinander. Ihre Kinasierungsdomänen sind auf Aminosäureebene zu 98 % und ihre C-terminalen Domänen zu 53 % identisch.

Einige Isozyme der CK1 unterliegen einem alternativen Splicing. Das alternative Splicing kann zu einer starken Variation der biochemischen Eigenschaften sowie der allgemeinen Funktion führen, was die Charakterisierung dieser Familie erschwert.

CK2 wurde als regulatorische Komponente verschiedener Signalwege beschrieben und besitzt, neben der Regulation von Transkriptions- und Translationsprozessen, eine entscheidende Bedeutung bei der Kontrolle des Zell-Zyklus (Pinna, 1990). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine transgene Expression der CK2 in Mäusen zur verstärkten Proliferation und Transformation von Zellen und zur Entstehung von Tumoren führt (Landesman-

Bollag *et al.*, 2001; Seldin und Leder, 1995). Zudem konnte in einer Vielzahl menschlicher Tumore eine gesteigerte Aktivität von CK2 nachgewiesen werden (Ahmed und Tawfic, 1994; Münstermann *et al.*, 1990; Pistorius *et al.*, 1991; Stalter *et al.*, 1994). Es wird daher vermutet, dass CK2 ein Proto-Onkogen darstellt. Die Ergebnisse neuester Untersuchungen, nach denen CK2 eine anti-apoptotische Funktion besitzt (Ahmed *et al.*, 2002; Litchfield, 2003), bestärken diese Vermutung. Eine Fehlregulation von CK2 würde so die unkontrollierte Proliferation und Transformation von Zellen zusätzlich begünstigen.

CK2 ist ein konstitutiv aktives, heterotetrameres Enzym, bestehend aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten (CK2 $\alpha_2\beta_2$ ). Die zwei katalytischen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  weisen eine sehr hohe Homologie zueinander auf und sind nahe verwandt mit CDK2 (cyclin-dependent kinase 2), einer Kinase, die an der Regulation des Zell-Zyklus beteiligt ist. Im Gegensatz dazu ist die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit relativ einzigartig mit keiner erkennbaren Homologie zu anderen Proteinen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl CK1 als auch CK2 an den Transkriptionsfaktor LEF-1 binden und diesen phosphorylieren. Die Phosphorylierung von LEF-1 führt dabei zu strukturellen Änderungen im LEF-1/DNA Komplex. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse im Zusammenhang mit früheren Erkenntnissen, nach denen LEF-1 ein Transkriptionsfaktor mit architektonischer Funktion ist. So konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass LEF-1 an den TCR $\alpha$  (T-Cell Receptor  $\alpha$ ) Enhancer bindet und eine Krümmung der DNA in diesem Bereich induziert (Travis *et al.*, 1991). Dadurch wird eine stabile Interaktion von LEF-1 mit den Transkriptionsfaktoren CREB/ATF, PEBP2a und Ets am TCR $\alpha$  Enhancer ermöglicht, die für eine effiziente Transkriptionsaktivierung von TRC $\alpha$  benötigt wird (Giese *et al.*, 1995).

Meine Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von LEF-1 durch CK1 oder CK2 zu einer Konformationsänderung von LEF-1 und damit zu einer Veränderung der DNA-Struktur führt. Die durch die CK1- und CK2-abhängige Phosphorylierung hervorgerufenen, strukturellen Änderungen können den Aufbau von hochmolekularen Nukleoproteinkomplexen an LEF-1-abhängigen

Promotoren beeinflussen und so deren Transkriptionsaktivität regulieren. Die strukturellen Änderungen können dabei Protein-Protein Interaktionen entweder direkt mit dem LEF-1/DNA oder LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex oder aber auch an entfernter liegenden Gen-regulatorischen Sequenzen ermöglichen oder inhibieren.

Der zentrale Schritt für die Transkriptionsaktivierung von Wnt-Zielgenen ist die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie. In diesem Zusammenhang lag die Vermutung nahe, dass eine Phosphorylierung von LEF-1 durch CK1 oder CK2 die Transkription von LEF-1/ $\beta$ -Catenin-regulierten Zielgenen beeinflusst.

Mit Hilfe von Reporter- und Shift-Assays wurden die Auswirkungen der Phosphorylierung auf den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Transkriptionskomplex analysiert. Dabei konnte in Gegenwart von CK1 eine Inhibition der Reporter-Gen-Aktivität detektiert werden, während in Gegenwart von CK2 eine Aktivierung der Transkription beobachtet wurde. Die CK1-abhängige negative Regulation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Transkriptionskomplexes konnte mit den Ergebnissen der Shift-Assays bestätigt werden. So resultierte die durch CK1 katalysierte Phosphorylierung in einer Dissoziation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes.

CK2 zeigte dagegen in Shift-Assays keinen Einfluss auf den Transkriptionskomplex. Der stimulierende Effekt von CK2 im Reporter-Gen-Assay kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die durch CK2 induzierten, strukturellen Änderungen des LEF-1/DNA Komplexes zur Bildung eines Nukleoproteinkomplexes führten, der die Transkription am Siamois Promotor verstärkt. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, dass CK2 die Affinität der LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren an die DNA erhöht (Pukrop *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten diese Beobachtung nicht eindeutig bestätigen, was möglicherweise auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen ist. Die Transkriptionsaktivierung kann andererseits aber auch durch andere CK2-vermittelte Effekte im Wnt-Signalweg bedingt sein, die letztlich zur Erhöhung der im Siamois-Luziferase Reporter-Gen-System gemessenen Promotoraktivität führen.

In den letzten Jahren haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass CK1 und CK2 an der Regulation des Wnt-Signalwegs beteiligt sind. Dabei führte die

Überexpression von CK1 in *Xenopus* Embryonen zur Ausbildung einer doppelten Körperachse, zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und zur Transkription von Wnt-Zielgenen (Peters *et al.*, 1999; Sakanaka *et al.*, 1999). Ferner konnte gezeigt werden, dass CK1 einen Komplex mit Dishevelled und Axin bildet und CK1 neben Dishevelled auch APC, Axin und  $\beta$ -Catenin phosphoryliert. Die Folge ist eine Destabilisierung des  $\beta$ -Catenin Degradationskomplexes (Gao *et al.*, 2002; Kishida *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 1999). Zudem wurde eine Interaktion von CK1 $\epsilon$  mit *Xenopus* XTCF-3 beschrieben. Dabei führte die CK1 $\epsilon$ -vermittelte Phosphorylierung von XTCF-3 zu einer stärkeren Bindung an  $\beta$ -Catenin (Lee *et al.*, 2001). In Reportergen-Assays resultierte die Transfektion von Zellen mit CK1 in einer gesteigerten Transkriptionsaktivität (Sakanaka *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen galt CK1 als ein positiver Regulator des Wnt-Signalwegs.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen jedoch eindeutig eine negative Regulation durch CK1 auf der Ebene des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Transkriptionskomplexes. Die Unterschiede in der Regulation der Reportergen-Aktivität können entweder als Folge der Co-Transfektion von LEF-1,  $\beta$ -Catenin und CK1 oder der Verwendung eines anderen Reportergen-Systems erklärt werden.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Reportergen-Assays wurde ein Siamois-Luziferase Reportergen-Konstrukt verwendet. Siamois ist ein endogenes Wnt-Zielgen, dessen Expression durch den LEF-1/TCF- $\beta$ -Catenin Komplex kontrolliert wird (Brannon *et al.*, 1997).

In den zuvor erwähnten Studien wurde das Topflash/Fopflash System eingesetzt. Hier wird die Transkription des Luziferase-Reportergens durch einen artifiziellen Promotor reguliert, der aus 4 aufeinanderfolgenden LEF-1/TCF-Bindungsstellen besteht (Sakanaka *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002).

Um zu analysieren, ob die unterschiedlich beschriebenen Effekte für CK1 im Reportergen-Assay Promotor-spezifisch sind, wurden von mir auch Reportergen-Assays mit dem Topflash/Fopflash System durchgeführt. Die Transfektion von Zellen mit CK1 allein resultierte dabei in der Tat in einer Transkriptionsaktivierung ähnlich zu der in der Literatur beschriebenen Aktivierung der Reportergen-Aktivität. Bei einer Co-Transfektion von LEF-1 wurde die Reportergen-Aktivität allerdings durch CK1 inhibiert. CK2 zeigte hingegen weder allein, noch bei

Co-Transfektion mit LEF-1 einen Effekt auf die Transkriptionsaktivität. In Gegenwart von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin hatten weder CK1 noch CK2 einen signifikanten Einfluss auf die Reporter-gen-Aktivität.

Es ist daher anzunehmen, dass die Effekte der CK1- und CK2-abhängigen Phosphorylierung zu spezifischen architektonischen Veränderungen im Kontext des jeweiligen Promotors führen. Die Konformationsänderungen wirken sich in der Folge auf die Interaktion mit Gen-Regulatorproteinen aus, die für die Transkriptionsregulation von LEF-1/ $\beta$ -Catenin-regulierten Wnt-Zielgenen von Bedeutung sind.

Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass die gemessene Reporter-gen-Aktivität nicht erlaubt zwischen den Effekten von CK1 oder CK2 auf den  $\beta$ -Catenin Degradationskomplex und/oder den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Transkriptionskomplex zu differenzieren.

Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen wurden in den letzten Monaten jedoch mehrere Studien veröffentlicht, die CK1 ebenfalls eine Rolle als negativer Regulator im Wnt-Signalweg zuschreiben.

CK1 besitzt danach eine entscheidende regulatorische Bedeutung für den Abbau von  $\beta$ -Catenin. So konnte gezeigt werden, dass CK1 $\alpha$  in einem dualen Kinasemechanismus eine Vorphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an Ser45 katalysiert, die eine Voraussetzung für die nachfolgend vollständige Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  an Thr41, Ser37 und Ser33 ist (Amit *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002).  $\beta$ -Catenin wird auf diese Weise dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasomen System zugeführt. Die CK1 $\alpha$ -vermittelte Phosphorylierung an Ser45 wird durch einen Axin-CK1 Komplex induziert (Amit *et al.*, 2002). Axin unterstützt auch die CK1-abhängige Phosphorylierung von APC und führt dadurch vermutlich zu einem verstärkten Abbau von  $\beta$ -Catenin (Rubinfeld *et al.*, 2001).

In diesem Zusammenhang konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Ankyrin-Repeat Protein Diversin CK1 $\epsilon$  an den Axin/Conductin-GSK3 $\beta$  Komplex rekrutiert und so den Abbau von  $\beta$ -Catenin unterstützt (Schwarz-Romond *et al.*, 2002). Experimente in *Drosophila*, in denen durch RNA Interferenz CK1 $\alpha$  und  $\epsilon$  inaktiviert wurden, zeigten einen erhöhten Level an Armadillo Protein und liefern einen

weiteren Hinweis auf eine negative regulatorische Funktion von CK1 im Wnt/Wg Signalweg (Yanagawa *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu CK1 galt die regulatorische Rolle von CK2 in den letzten Jahren als weniger umstritten. So zeigten Untersuchungen in *Drosophila*, dass Dishevelled durch CK2 phosphoryliert wird und eine Überexpression des Wingless Rezeptor DFz2 die Phosphorylierung von Dishevelled zusätzlich stimuliert (Willert *et al.*, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass Wnt-transfizierte Zellen eine erhöhte Menge und Aktivität von CK2 aufweisen. In diesen Zellen konnte eine Interaktion von CK2 mit  $\beta$ -Catenin und Dishevelled gezeigt werden. Eine Inhibition von CK2 mit Apigenin führte dabei zu einem beschleunigten Abbau von  $\beta$ -Catenin und Dishevelled (Song *et al.*, 2000). CK2 galt daher als positiver Regulator des Wnt-Signalwegs.

Übereinstimmend damit sprechen die Ergebnisse meiner Untersuchungen ebenfalls für eine positive regulatorische Rolle von CK2. So zeigte sich in den durchgeführten Reporter-Gen-Assays, dass eine Co-Transfektion von Zellen mit CK2 und LEF-1 bzw. CK2, LEF-1 und  $\beta$ -Catenin eine Steigerung der Transkriptionsaktivität zur Folge hat. Zusammen mit der Beobachtung, dass CK2 im Shift-Assay den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex nicht negativ beeinflusst, sprechen diese Ergebnisse für einen aktivierenden Effekt von CK2 im Wnt-Signalweg.

In diesem Zusammenhang wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt, dass TCF-4 ebenfalls durch CK2 phosphoryliert wird und die Phosphorylierung keinerlei Einfluss auf die Interaktion von TCF-4 und  $\beta$ -Catenin hat (Miravet *et al.*, 2002).

Auf eine positive Rolle von CK2 im Wnt-Signalweg lässt auch die Beobachtung schliessen, dass die C-terminale Domäne von APC die CK2 Aktivität hemmt (Homma *et al.*, 2002). Diese Domäne ist in vielen colorectalen Carcinomen deletiert und resultiert in einer anhaltend, gesteigerten Aktivität von CK2 und einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs.

Neuste Beobachtungen lassen aber darauf schliessen, dass CK2 auch als negativer Regulator in den Wnt-Signalweg eingreifen kann. So wurde das

E2 Ubiquitin-konjugierende Enzym UBC3B als ein neues Substrat der CK2 identifiziert. Eine Phosphorylierung von UBC3B durch CK2 erhöht die Affinität zu  $\beta$ -TrCP.  $\beta$ -TrCP ist als eine Komponente der SCF-Ubiquitin Ligase für die Substraterkennung, d. h. hier für die Erkennung von phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin, verantwortlich. Die Interaktion von  $\beta$ -TrCP mit UBC3B verstärkt den Abbau von  $\beta$ -Catenin (Semplici *et al.*, 2002).

Ferner wurde gezeigt, dass CK2 mit Axin, GSK3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin interagiert. Dabei führt die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch CK2 zu einer verstärkten Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  und trägt auf diese Weise zu einem erhöhten Abbau von  $\beta$ -Catenin bei. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Mutation der CK2-Phosphorylierungsstellen in  $\beta$ -Catenin, zu einer geringeren Affinität von  $\beta$ -Catenin zu Axin und einer erhöhten Halbwertszeit von  $\beta$ -Catenin führt (Bek und Kemler, 2002).

Phosphorylierungsereignisse haben in Signaltransduktionsprozessen eine wichtige regulatorische Bedeutung. Der Phosphorylierungsstatus der Komponenten eines Signalwegs spielt dabei eine zentrale Rolle für die resultierenden, zellulären Effekte und stellt letztlich das Ergebnis der gegenläufigen Aktivitäten von Proteinkinasen und –phosphatasen dar.

In diesem Zusammenhang wurden die Proteinphosphatasen PP2A und PP2C als Regulatoren des Wnt-Signalwegs beschrieben. Allerdings existieren hinsichtlich ihrer Funktion ebenfalls widersprüchliche Aussagen, die sowohl inhibitorische als auch aktivierende Effekte auf die Wnt-Signaltransduktion beschreiben (Li *et al.*, 2001; Ratcliff *et al.*, 2000; Seeling *et al.*, 1999; Strovel *et al.*, 2000).

Die widersprüchlichen Beobachtungen zu der Rolle von Kinasen und Phosphatasen im Wnt-Signalweg lassen sich nach dem heutigen Wissensstand nur schwer erklären.

Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch die Bindung von Wnt-Proteinen an den Frizzled/LRP Rezeptorkomplex kann entweder zu einer Veränderung der subzellulären Lokalisation von Proteinen und/oder zur Aktivierung verschiedener Isozyme der Kinasen bzw. Phosphatasen und ihrer Substrate führen.

CK1 und CK2 scheinen in nicht Wnt-stimulierten Zellen die Degradation von  $\beta$ -Catenin und/oder die Destabilisierung des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes zu

unterstützen. Wnt-Stimulation induziert möglicherweise inter- und/oder intramolekulare Veränderungen in Form von Konformationsänderungen innerhalb eines Proteins. Diese können die Affinität zu einem anderen Interaktionspartner erhöhen und/oder eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Kinasen bzw. Phosphatasen in anderen Domänen des Proteins ermöglichen. Dies könnte mit einem aktivierenden oder inhibierenden Einfluss auf den Signalweg verbunden sein.