
5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein neues Protein, DIVERSIN, welches durch seine direkte Bindung an Conductin im Hefe-2-Hybrid-System isoliert wurde. Die biochemischen und funktionellen Daten weisen Diversin eine zentrale Rolle innerhalb der Wnt-Signaltransduktionsprozesse zu. Über seine direkten Interaktionen mit Axin/Conductin und Casein-Kinase I ϵ kontrolliert Diversin die klassische Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung und ist an der Regulation des Wnt/JNK-Signalweges beteiligt. Diese Befunde zeigen, dass Diversin als eine neue, molekulare Schalteinheit in das Wnt-Signalnetzwerk eingreift (Schwarz-Romond et al., 2002).

5.1 Struktur von Diversin und verwandter Proteine

Diversin der Maus ist ein aus 712 Aminosäuren aufgebautes, zytoplasmatisches Protein. Im N-Terminus besitzt es acht konservierte, als Ankyrin-Repeats bezeichnete Strukturelemente. Die zentralen und C-terminalen Bereiche von Diversin weisen keine Homologie zu bekannten Strukturmotiven auf. Der C-Terminus von Diversin wurde im Hefe-2-Hybrid-Screen mit Conductin isoliert und vermittelt die direkte Assoziation von Diversin mit Conductin und Axin. In weiteren Bindungsstudien konnte die zentrale Domäne von Diversin als Casein-Kinase I ϵ -Bindungsstelle identifiziert werden. Aufgrund der strukturellen Identität wurden im Zebrafisch und im humanen Genom Verwandte von Maus-Diversin entdeckt. Im Genom von *C.elegans* konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein zu Diversin ähnliches Molekül identifiziert werden. Das erst kürzlich in *Drosophila* charakterisierte Protein Diego ist entfernt mit Diversin verwandt (siehe auch das Kapitel „Ähnlichkeit zwischen Diversin und Diego“). Ankyrin-Repeats gelten generell als Vermittler von Protein/Protein-Wechselwirkungen. Sie finden sich in einer Vielzahl von Proteinen und sind dementsprechend an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Die einzelnen Ankyrin-Repeat-Proteine unterscheiden sich in der Anzahl und Position dieses Strukturelements (Sedgwick & Smerdon, 1999). Der hohe Konservierungsgrad der Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin zwischen Mensch-, Maus- und Zebrafisch lässt auf eine bisher nicht charakterisierte spezifische Funktion dieser Domäne schliessen. Mensch-, Maus- und Zebrafisch-Diversin sind ausserdem innerhalb der CKI ϵ - und der Axin/Conductin-Bindungsdomänen streng konserviert (Abb. 2). Aufgrund der strukturellen Identität, der ausgeprägten Konservierung ihrer Aminosäuresequenz und der identischen biologischen Aktivität handelt es sich hier um orthologe Proteine verschiedener Spezies.

5.2 Funktion von Diversin im klassischen Wnt-Signalweg

Die Funktion von Diversin innerhalb der Wnt-Signaltransduktion wurde hier in verschiedenen biologischen Systemen analysiert. Sowohl Zellkulturexperimente als auch in *Xenopus* und Zebrafisch durchgeführte Analysen belegen die Funktion von Diversin als Inhibitor des klassischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Diversin induziert in 293-Zellen den proteasomalen Abbau von endogenem β -Catenin und verhindert die durch Dishevelled-induzierte β -Catenin-Stabilisierung. Diversin blockiert einerseits die durch Wnt- und Dishevelled-induzierte β -Catenin-Signalübertragung in 293 Zellen, andererseits verhindert Diversin die durch Dishevelled verursachte Doppelachsenbildung in *Xenopus*. Die Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Diversin wurde in der *in vivo*-Funktionsanalyse im Zebrafisch *Danio rerio* bewiesen. Wnt/ β -Catenin-Signale kontrollieren während der Zebrafisch-Embryogenese die Etablierung der dorso-ventralen Identität. Mutation von Ichabod, eines bisher nicht näher charakterisierten Genes, blockiert den Kerntransport von β -Catenin und führt zu stark reduzierter bzw. fehlender Expression dorsal exprimierter Gene (z.B. Goosecoid, Bozozok, Squint). Der Verlust, bzw. die stark eingeschränkte Aktivität des Blastula-Organizers durch Mutation von Ichabod ventralisiert die Embryonen (Kelly et al., 2000). Die hier gezeigte Überexpression von Diversin im Zebrafisch erzeugt einen identischen ventralisierten Phänotyp. Diversin greift also ähnlich wie Ichabod in die β -Catenin-Signaltransduktion ein. In Übereinstimmung mit der beschriebenen strukturellen Identität von Maus- und Zebrafisch-Diversin führten beide Proteine zur Ventralisierung der Zebrafisch-Embryonen. Im Gegensatz dazu bewirken aktivierende Wnt-Komponenten [Wnt8, FzA, Dishevelled, dnGSK3 β , GBP, ein Axin-Fragment (GID-2) oder dnTCF3] wie β -Catenin selbst starke Dorsalisierung der Embryonen (Kelly et al., 2000; Kelly et al., 1995; Sumoy et al., 1999). Die Blockade von endogenem Zebrafisch-Diversin durch spezifische Antisense-Morpholinos erzeugte ebenfalls starke Dorsalisierung bzw. die Induktion ektopischer Körperachsen. Die Wirkung von Diversin ist also identisch zum Verlust von Zebrafisch-Axin, eines etablierten Inhibitors des Wnt/ β -Catenin-Signals (Heisenberg et al., 2001). Diese Studien belegen die Beteiligung von Diversin an der Kontrolle frühester, musterbildender Prozesse während der Embryogenese des Zebrafisches. Zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese kontrollieren Wnt-Signale musterbildende Prozesse im Gehirn, was durch die Charakterisierung der Zebrafisch-Mutationen „Headless“/(Tcf3) und „Masterblind“/(Axin) nachgewiesen wurde (Kim et al., 2000; Heisenberg et al., 2001). Mit Wnt1 und Wnt8 sind Liganden bekannt, die in definierten Hirnarealen von Zebrafisch-Embryonen exprimiert sind

(Kelly et al., 1995). Zebrafisch-Diversin ist am Tag drei der Embryogenese in identischen Regionen des Gehirns exprimiert, was auf eine Wnt-abhängige Funktion von Diversin in der Hirnentwicklung hinweist. Die vorgelegten *In situ*-Hybridisierungen für Pax2.1 bzw. MyoD beweisen die Blockade der Genfunktion durch Diversin MOs in späten Embryonalstadien. Entsprechende Effekte waren noch bis ins 5-10-Somiten-Stadium nachweisbar. Eine genauere Analyse der Diversinfunktion während der Hirnentwicklung wäre ein zukünftiges, erfolgversprechendes Projekt. Mit Engrailed2, Otx1, Opl, Hoxb9 und Gata4 stehen Wnt-regulierte Marker für die Analyse der Hirnentwicklung zur Verfügung (Park & Moon, 2002). In epigenetischen Experimenten wurde die Position von Diversin innerhalb der Wnt/ β -Catenin-Kaskade charakterisiert. Diversin blockiert in *Xenopus* und Zebrafisch durch Wnt-, Dishevelled- und CKI ϵ -, aber nicht durch dominant-negative GSK3 β - oder β -Catenin-induzierte Signale. Diversin kann deshalb als Inhibitor der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung eingeordnet werden, der die Signalübertragung von CKI ϵ zur GSK3 β kontrolliert.

5.3 Diversin reguliert Wnt/ β -Catenin-Signale durch die Interaktion mit Axin/Conductin und CKI ϵ

Diversin interagiert über zwei unabhängige Domänen direkt mit Axin/Conductin und CKI ϵ , und die vorgelegten funktionellen Daten etablieren Diversin als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Einen Hinweis auf den möglichen Mechanismus dieser Wnt-Inhibition gibt die Deletionsanalyse von Diversin. Keine der einzelnen Domänen blockiert Wnt/ β -Catenin-Signale. Nur die Kombination der CKI ϵ - und der Axin/Conductin-Bindungsdomäne von Diversin inhibiert diese Signale so effizient wie vollständiges Diversin. Diese Befunde weisen auf eine Funktion von Diversin als „Bindeglied“ zwischen CKI ϵ und dem Axin/Conductin-Komplex hin. Tatsächlich war Diversin in biochemischen Experimenten für die effiziente Interaktion der CKI ϵ mit dem Axin/Conductin-Komplex verantwortlich. Erst die Anwesenheit von Diversin ermöglichte die Interaktion endogener CKI ϵ mit Conductin. Dagegen konnte die Axin/Conductin-Bindungsdomäne von Diversin allein CKI ϵ nicht an den Abbaukomplex rekrutieren. Diese Daten belegen, dass Diversin über die Interaktion mit Axin/Conductin und CKI ϵ Wnt/ β -Catenin-Signale blockiert. Ausserdem scheinen über Diversin an den β -Catenin-Abbaukomplex rekrutierte Casein-Kinasen an der Kontrolle des Wnt/ β -Catenin-Signals beteiligt zu sein.

5.4 Ser45 von β -Catenin wird durch Casein-Kinasen phosphoryliert

Casein-Kinasen wirken *in vivo* als Inhibitoren der Wnt-Signaltransduktion, was durch die endogene Blockade in *Drosophila*-Zellen und -Embryonen nachgewiesen wurde. Der Verlust endogener CKI α in *Drosophila* induzierte einen zu Shaggy/GSK3 β -Mutation identischen „naked-phenotype“ (Liu et al., 2002; Yanagawa et al., 2002). Die Blockade endogener CKI α und CKI ϵ stabilisierte Armadillo/ β -Catenin in Antisense-RNA-Experimenten (RNAi). Dieser Effekt wurde durch den kombinierten Verlust beider Moleküle noch verstärkt (Yanagawa et al., 2002). Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Casein-Kinasen am β -Catenin-Abbau gibt die Charakterisierung von β -Catenin-Mutationen in Tumoren. Mutationen von Ser45 sind statistisch so häufig zu beobachten wie Mutationen der durch GSK3 β phosphorylierten Serin- und Threoninreste (Ser33/Ser37/Thr41, siehe auch Tabelle 1). Der Selektionsvorteil für das Tumorwachstum scheint also nach Mutation von Ser45, Thr41 oder Ser37 vergleichbar zu sein. Ser45 von β -Catenin entspricht jedoch nicht einer typischen GSK3 β -, sondern vielmehr einer Casein-Kinase-Phosphorylierungsstelle (siehe Abb. 4). Ausserdem ist GSK3 β bei der Erkennung verschiedener Substrate auf eine initiale „priming“-Phosphorylierung angewiesen (Cohen & Frame, 2001; Price & Kalderon, 2002). Casein-Kinasen können die notwendige „priming“-Phosphorylierung von β -Catenin vermitteln und damit den β -Catenin-Abbau einleiten. Tatsächlich konnten zwei Autoren kürzlich zeigen, dass die den β -Catenin-Abbau induzierende Ser45-Phosphorylierung unabhängig von GSK3 β erfolgte (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002).

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

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Diversin durch die Einbindung von CKI ϵ in den Axin/Conductin-Komplex die β -Catenin-Signaltransduktion blockiert. Interessanterweise assoziierte die von Amit et al. postulierte „ β -Catenin-Ser45-Kinase“ mit Axin (Amit et al., 2002). Da Diversin über unabhängige Domänen direkt mit Axin/Conductin und CKI ϵ interagiert, testeten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Yinon BenNeriah (Hebrew University, Jerusalem, Israel) ein Modell, in dem Diversin als „molekularer Linker“ CKI ϵ mit dem β -Catenin-Abbaukomplex verbindet. CKI ϵ besteht aus einer N-terminal gelegenen

katalytischen Untereinheit und einer C-terminalen Domäne, die beide für die Funktion der CKI ϵ im Wnt-Signalweg notwendig sind (Sakanaka et al., 1999; Vielhaber & Virshup, 2001). Die Fusionierung der katalytischen Untereinheit der CKI ϵ an die Axin/Conductin-Bindungsdomäne von Diversin blockierte effizient die Wnt-Signalübertragung. Weder die separaten Domänen, noch kinase-defiziente Fusionskonstrukte waren funktionell aktiv (Abb. 15, siehe auch Sakanaka et al., 1999). Auch dominant-negative CKI ϵ bzw. ein spezifischer CKI-Inhibitor blockierten die Aktivität der postulierten „ β -Catenin-Ser45-Kinase“. Ausserdem verstärkten Diversin (Abb. 14) bzw. CKI ϵ die β -Catenin-Phosphorylierung (Amit et al., 2002). Diese Studien erlauben die Schlussfolgerung, dass Diversin die bisher fehlende Verbindung zwischen CKI ϵ und dem Axin/Conductin-Komplex darstellt. Als „Brückenmolekül“ rekrutiert Diversin demnach katalytisch-aktive CKI ϵ an den Axin/Conductin-Komplex und ermöglicht so die effiziente Ser45-Phosphorylierung von β -Catenin.

5.6 Dimerisiertes Conductin: Gerüst des funktionellen β -Catenin-Abbaukomplexes

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten führen gemeinsam mit den Ergebnissen weiterer Autoren zu einem vollkommen neuen Modell der β -Catenin-Phosphorylierung. Über Diversin an den β -Catenin-Abbaukomplex rekrutierte Casein-Kinase I ϵ vermittelt die initiale „priming“-Phosphorylierung am Serin45 von β -Catenin. Die anschliessende GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung von Thr41/Ser37/Ser33 leitet den endgültigen proteasomalen Abbau von β -Catenin ein (Yanagawa et al., 2002; Amit et al., 2002; Liu et al., 2002; Schwarz-Romond et al., 2002).

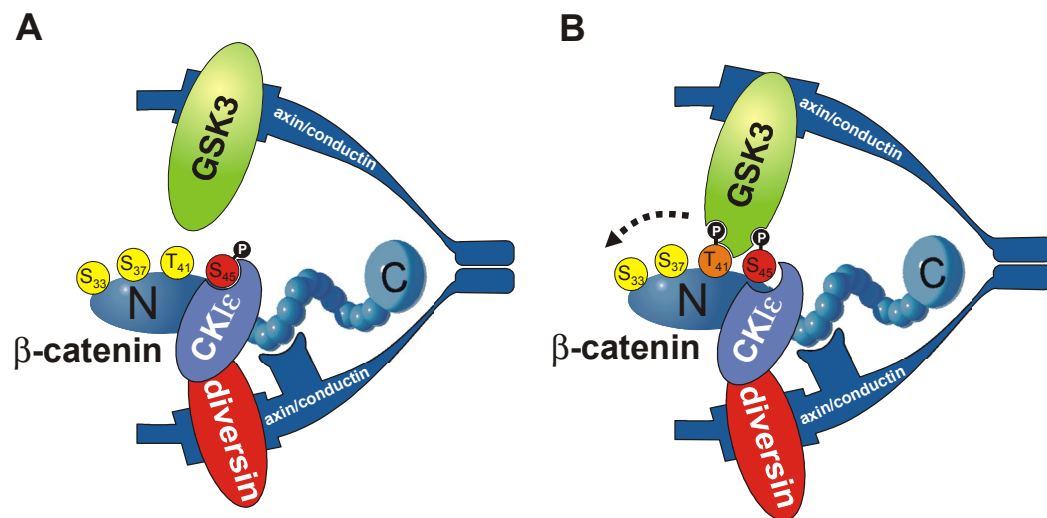


Abbildung 22: Modell der schrittweisen Phosphorylierung von β-Catenin. Initiale Ser45-Phosphorylierung von CKIε, die über Diversin an den Komplex rekrutiert wird, erzeugt eine GSK3β-Erkennungssequenz (A). Die anschließende schrittweise Phosphorylierung von Thr41, Ser37 und Ser33 durch GSK3β ermöglicht die Erkennung durch die Ubiquitinligase β^{TRCP}, was den proteasomalen Abbau von β-Catenin einleitet (B).

Voraussetzung für diesen Mechanismus ist eine gleichzeitige bzw. zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgende Anwesenheit von CKIε und GSK3β im Axin/Conductin-Komplex. Diversin bindet an die GSK3β-Bindungsdomäne von Axin/Conductin. Trotzdem wurde in der vorliegenden Arbeit keine Konkurrenz zwischen Diversin und GSK3β um die Axin/Conductin-Bindung nachgewiesen. Die Charakterisierung der C-terminalen Bereiche von Axin und Conductin als Dimerisierungsdomäne bietet eine einfache Erklärung: dimerisiertes Axin/Conductin ermöglicht die gleichzeitige Anwesenheit von GSK3β und Diversin/CKIε im Abbaukomplex (Asbrand, 2002). Sowohl der Verlust von CKIε als auch der von CKIα führte zur β-Catenin-Stabilisierung (Yanagawa et al., 2002). Kürzlich wurde eine direkte Interaktion von Axin mit CKIε und CKIα beschrieben (Liu et al., 2002; Rubinfeld et al., 2001). Axin und das hier verwendete Conductin sind in der von diesen Autoren für die direkte Bindung der Casein-Kinasen verantwortlichen Region nur sehr schwach konserviert. Gao, Kishida, Sakanaka und deren Mitarbeiter konnten in Hefe-2-Hybrid- bzw. GST-„pulldown“-Experimenten keine direkte Interaktion von Casein-Kinasen mit Axin beobachten (Gao et al., 2002; Kishida et al., 2001; Sakanaka et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls keine endogene CKIε in Conductin-Immunpräzipitaten nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von Diversin war Voraussetzung für die Bildung stabiler CKIε/Conductin-Komplexe. Ausserdem interagierte Diversin spezifisch mit CKIε und nicht mit CKIα. Allerdings wäre ein Komplex mit direkt gebundener CKIα und zusätzlich

über Diversin rekrutierter CKI ϵ vorstellbar. Tatsächlich ist die Redundanz von Interaktionen innerhalb des β -Catenin-Abbauflexes bereits beschrieben worden: Zum Abbau bestimmtes β -Catenin kann sowohl über Axin/Conductin als auch über APC an den Komplex gebracht werden (Behrens et al., 1998; von Kries et al., 2000). Unterschiedliche Befunde gibt es auch zur Regulation der β -Catenin-phosphorylierenden Kinasen. Liu et al. beobachteten konstitutive Aktivität der CKI α und gehen deshalb weiter von der durch Wnt-Signale regulierten Aktivität der GSK3 β aus. Im Gegensatz dazu beschrieben Amit et al. in verschiedenen Systemen eine über Wnt- bzw. Dishevelled regulierte Aktivität der CKI ϵ . Zusammengefasst belegen die hier vorgestellten Befunde eine inhibitorische Funktion von Diversin in der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion. Dabei scheint Diversin die für den β -Catenin-Abbau essentielle CKI ϵ an den Abbauflex zu rekrutieren.

5.7 Diversin aktiviert den Wnt/JNK-Signalweg

Wnt/JNK-Signale kontrollieren in Vertebraten die Wanderung dorsal-mesodermaler Zellen während der Gastrulation. Die Beteiligung von JNK bzw. Rho/Rho-Kinase an diesen Prozessen ist gut dokumentiert (Strutt et al., 1997; Boutros et al., 1998). Die hier vorgelegten Befunde zeigen, dass Diversin einerseits die JNK-abhängige Transkription aktiviert und andererseits die durch Wnt11- bzw. Dishevelled-induzierte JNK-Aktivität verstärkt. In Zebrafisch-Embryonen verursacht sowohl der Verlust, als auch die ektopische Expression von Diversin Störungen der Konvergenz und Extension. Dies manifestiert sich vor allem in einer Verkürzung der anterior-posterioren Körperachse und einer lateralen Verbreiterung der Embryonen (Abb. 21). Hervorzuheben ist ausserdem die durch Diversin verursachte wellenartige Verformung des Notochords. Dieses Phänomen ist charakteristisch für die Mutation von „pipetail“ (Wnt5a) im Zebrafisch (Hammerschmidt et al., 1996). Für andere Wnt-Komponenten wurde ebenfalls die Beteiligung an unterschiedlichen Zweigen des Wnt-Netzwerkes beschrieben. So kontrolliert CKI ϵ neben der ausführlich diskutierten Funktion als Ser45-Kinase im Wnt/ β -Catenin-Weg zusätzlich Wnt/JNK-Signale. Blockade von CKI ϵ führte zur JNK-Aktivierung in Zellkultur und störte Gastrulationsbewegungen in *Xenopus* (McKay et al., 2001). Aufgrund der direkten Bindung an CKI ϵ könnte Diversin deren Funktion regulieren. CKI ϵ bindet und phosphoryliert Dishevelled, ein als Knotenpunkt des Wnt/ β -Catenin und Wnt/JNK-Signales charakterisiertes Protein. Über diese Verbindung ist auch dieser zentrale Knotenpunkt des Wnt-Netzwerkes durch Diversin beeinflussbar. Es wäre

möglich, dass Diversin die Menge oder die katalytische Aktivität von CKI ϵ am Dishevelled-Komplex kontrolliert. Umgekehrt könnte Diversin selbst durch CKI ϵ phosphoryliert und in seiner Aktivität oder Lokalisation beeinflusst werden. Einen ersten Hinweis auf solche Mechanismen gaben Kinaseassays, in denen Diversin nach Präzipitation aus Zelllysaten durch assoziierte Kinasen phosphoryliert wurde (eigene unpublizierte Daten).

Verschiedene Autoren beschrieben phänotypisch identische Veränderungen der Konvergenz und Extension durch experimentelle Blockade und Aktivierung der Wnt/JNK-Signaltransduktionsprozesse. So führten sowohl aktivierende als auch dominant-negative Dishevelled-Konstrukte zu vergleichbaren Gastrulationsstörungen in *Xenopus* (Wallingford et al., 2000). Dieses Phänomen konnte in den hier dargestellten Experimenten zur Konvergenz und Extension im Zebrafisch ebenfalls beobachtet werden (siehe Abb. 21C-F). Aufgrund dieser Beobachtung sind Rettungsversuche von Wnt5a- oder Wnt11- defizienten Zebrafischen durch Diversin-mRNA-Injektion relativ schwierig. Ausserdem erschwert die durch Diversin-mRNA-verursachte Ventralisierung solche Experimente. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorliegenden JNK-Reporterdaten und die Regulation konvergenter Extension im Zebrafisch eine zusätzliche Funktion von Diversin als Aktivator des Wnt/JNK-Signalweges offenlegen.

5.8 Ähnlichkeit von Diego und Diversin

Diversin weist signifikante Ähnlichkeit zu dem kürzlich in *Drosophila* identifizierten Protein Diego auf. Diversin besitzt acht, Diego sechs Ankyrin-Repeats. Innerhalb der Ankyrin-Repeat-Domäne sind Diversin und Diego zu 35% und in der übrigen Aminosäurekette zu 18% identisch. Arbeiten verschiedener Autoren haben kürzlich neben dem in *Drosophila* Segmentpolarität kontrollierenden Wnt/ β -Catenin-Weg einen alternativen, für die Kontrolle planarer Zellpolarität verantwortlichen Wnt/JNK-Signalweg charakterisiert (Strutt et al., 1997; Boutros et al., 1998; Eaton, 1997; Mlodzik, 2000). Nach Mutation verschiedener Komponenten der Wnt-Signalkaskade wurden Störungen der planaren Zellpolarität beschrieben. So gilt Dishevelled als "Knotenpunkt" der Wnt/ β -Catenin- und der Wnt/JNK-Signalübertragung. Spezifische Domänen von Dishevelled kontrollieren einerseits Segmentpolarität und andererseits die Etablierung planarer Zellpolarität. Mutationen in "Segmentpolaritätsgenen" von *Drosophila* sind generell embryonal lethal, wogegen Fliegen mit Mutationen in "Zellpolaritätsgenen" überlebensfähig sind. Diego ist in *Drosophila* an der Kontrolle planarer Zellpolarität beteiligt. Fliegen mit gestörter Diego-Funktion zeigen Misorientierung der Flügelhaare und der Omatidien (Feiguin et al., 2001). In Vertebraten

werden Konvergenz und Extension während der Gastrulation als Äquivalent der planaren Zellpolarität in *Drosophila* betrachtet (Sokol, 2000; Adler, 2002; Wallingford et al., 2002). Entsprechend dieser Annahme störte hier die Injektion von Diego-mRNA die Konvergenz und Extension des gastrulierenden Zebrafischembryos (Abb. 21). Identische Effekte wurden für solche Konzentrationen von Diversin-mRNA beobachtet, die keinen Einfluss auf die frühe Achsenausbildung mehr hatten. Diese funktionelle Redundanz von Diego und Diversin innerhalb des Wnt/JNK-Signalweges wurde durch die hier vorgelegte biochemische Charakterisierung bestätigt. Diego und Diversin interagieren mit CK1 ϵ , was auf eine konservierte Funktion beider Moleküle in der Wnt/JNK-Signaltransduktion hinweist. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich Diego und Diversin in ihrer Fähigkeit, mit *Drosophila*-Axin oder Maus-Conductin zu interagieren. Ausschliesslich Diversin kann mit *Drosophila*-Axin und Maus-Conductin wechselwirken. Im Zebrafisch beeinflusste Diego in keiner der hier getesteten Konzentrationen dorso-ventrale Identität. Ausserdem konnte Diego-mRNA die Dorsalisierung von Zebrafisch-Embryonen durch Diversin-MOs nicht neutralisieren (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse belegen, dass die Interaktion von Diversin mit Axin/Conductin für die Kontrolle dorso-ventraler Identität im Zebrafisch notwendig ist. Die Axin/Conductin-Bindung unterscheidet Diversin also von Diego und ermöglicht somit die spezifische Funktion von Diversin innerhalb des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Vorstellbar wäre, dass ein gemeinsames Vorläuferprotein von Diego und Diversin im Reich der Vertebraten mit einer zusätzlichen, die Axin/Conductin-Bindung-vermittelnden Domäne ausgestattet wurde. Allerdings kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass die zu Diego und Diversin funktionell-identischen Moleküle in *Drosophila* bzw. den Vertebraten noch nicht identifiziert wurden. Endgültigen Aufschluss über die funktionelle Redundanz von Diversin und Diego könnten z.B. Rettungsversuche von Diego-defizienten *Drosophila* mit Diversin-RNA oder die Überexpression von Diversin in Wnt-abhängigen Geweben der Fliege geben.

5.9 Diversin als neuer Regulator des Wnt-Signalnetzwerkes

Die hier vorgelegten Daten beweisen die Funktion von Diversin als Inhibitor der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion. Die strukturelle Verwandtschaft zu Diego und die Regulation des Wnt/JNK-Signalweges deuten auf eine zusätzliche Funktion von Diversin innerhalb dieses alternativen Signalweges hin. Die Vielfältigkeit der durch Wnt-Liganden induzierten Effekte wirft die Frage nach der Kontrolle intrazellulärer Signalspezifität auf. Gegenwärtig wird die Diversifizierung eingehender Wnt-Signale von vielen Forschergruppen stark untersucht. Mit

Naked cuticle, Par-1, Frodo und Dapper wurden kürzlich Moleküle beschrieben, die durch Interaktion mit Dishevelled zur Spezifizierung der Wnt-Signale beitragen. Die Charakterisierung dieser Komponenten führte zur Aufdeckung unerwarteter Vernetzungen innerhalb der Wnt-Signaltransduktion und betonte die zentrale Position von Dishevelled, der ersten intrazellulären Schaltstelle des Wnt-Netzwerkes. Naked cuticle wurde als transkriptionelles Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beschrieben. Funktionell blockiert Naked cuticle durch die Interaktion mit der PDZ-Domäne von Dishevelled das Wnt/ β -Catenin-Signal. Gleichzeitig wurde eine Stimulation des Wnt/JNK-Signalweges durch Naked cuticle beschrieben (Yan et al., 2001; Zeng et al., 2000). Par-1 ist eine mit Dishevelled assoziierte Proteinkinase, die umgekehrt funktioniert: Wnt/ β -Catenin-Signale werden durch Par-1 verstärkt, und der Wnt/JNK-Signalweg wird blockiert (Depraetere, 2001). Dapper wurde ebenfalls als Interaktionspartner von Dishevelled identifiziert und greift durch die Blockade beider Signalwege regulatorisch in das Wnt-Netzwerk ein (Cheyette et al., 2002). Die genauen molekularen Abläufe am Dishevelled-Signalzentrum sind weitgehend unverstanden, und die Zelltypspezifität dieser Komponenten bzw. die Vernetzung mit anderen zellulären Signalgebern sind wenig charakterisiert. Eindeutig gezeigt wurde, dass Wnt-Stimulation die Phosphorylierung von Dishevelled induziert. Mit Par-1 und CKI ϵ assoziieren zwei Kinasen direkt mit Dishevelled, und CKI ϵ konnte Dishevelled *in vivo* phosphorylieren. Problematisch ist dabei, dass Par-1 und CKI ϵ epistatisch unterhalb von Dishevelled zu wirken scheinen, d.h. beide müssen selbst erst durch Dishevelled aktiviert werden, um das Signal auf eigene Substrate zu übertragen. Die hier zu Diversin vorliegenden Daten weisen auf dessen Beteiligung an der intrazellulären Signalspezifizierung hin. Einerseits blockiert Diversin die Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion und andererseits ist Diversin an der Aktivierung des Wnt/JNK-Signales beteiligt. Dominant-negative Blockade der CKI ϵ induzierte ähnlich wie Diversin JNK-Aktivierung bzw. Störungen der Gastrulation. Diese Befunde weisen auf CKI ϵ als mögliches Zielprotein von Diversin innerhalb des Wnt/JNK-Signalweges hin. Dagegen rekrutiert Diversin in der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung CKI ϵ an den β -Catenin-Abbaukomplex. Diese Daten geben einen Hinweis, wie intrazelluläre Signalspezifizierung funktionieren könnte. Möglicherweise ist Diversin an der zeitlichen und räumlichen Verteilung von CKI ϵ und damit an der Etablierung des funktionellen β -Catenin-Abbaukomplexes beteiligt. Die Signalweitergabe vom Frizzled-Rezeptor zu Dishevelled ist ebenfalls noch relativ unverstanden und gibt Raum zur Spekulation über bisher nicht identifizierte Komponenten. Die Membranassoziation von Dishevelled, die ausschliesslich durch nicht-transformierende Wnts induziert wird, könnte durch solche bisher unbekannt

Moleküle vermittelt werden (Axelrod et al., 1998; Wallingford et al., 2000). Solche Beobachtungen weisen ausserdem auf eine durch Kompartimentierung gewährleistete Signalspezififizierung hin. Die Identifizierung der LRP5 als spezifische Ko-Rezeptoren des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zeigen zusätzlich die sehr frühe Spezifizierung eingehender Signale (Mao et al., 2001a). Interessant ist in diesem Zusammenhang die kürzlich beschriebene, direkte Interaktion von LRP5 mit Axin (Mao et al., 2001b). Wnt-Stimulation induziert die Kolokalisation beider Moleküle an der Membran. Möglicherweise geht hier die Wnt-induzierte Umlokalisierung des Axin/Conductin-Komplexes mit seiner Inaktivierung einher. Weitergehende Studien dieser Art bzw. die Identifizierung zusätzlicher Komponenten des Wnt-Signalweges sollten unser Verständnis dieser komplexen Signalprozesse, beginnend mit der Internalisierung bis hin zur Signalübertragung auf Dishevelled, vertiefen. Die Daten zu den oben genannten Dishevelled-Interaktionspartnern verdeutlichen ausserdem eine überraschend intensive Kommunikation zwischen den bisher als unabhängig voneinander betrachteten Zweigen des Wnt-Signalweges. Die wechselseitige Beeinflussung der Signalaktivität etabliert eine zusätzliche Regulationsebene, die feinabgestimmte, an den zellulären Kontext angepasste Signalübertragung ermöglicht.

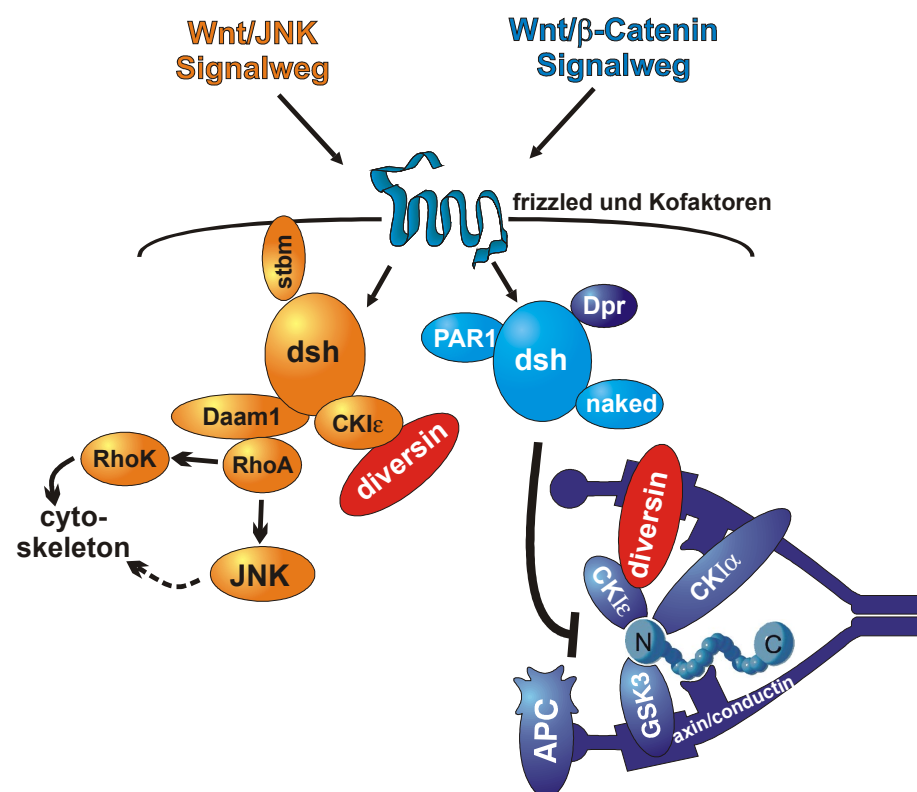


Abbildung 23: Schema zur dualen Funktion von Diversin innerhalb des Wnt-Netzwerkes. Diversin reguliert über die Bindung an Axin/Conductin und CK1 ϵ die Wnt/ β -Catenin-Signalprozesse und ist über die Interaktion mit CK1 ϵ auch an der Wnt/JNK-Signaltransduktion beteiligt.

Die hier vorgelegten Befunde beweisen eine duale Funktion von Diversin als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin- bzw. als Aktivator des Wnt/JNK-Signalweges. Im Gegensatz zu allen anderen Molekülen mit ähnlichem regulatorischen Potential, interagiert Diversin nicht direkt mit Dishevelled. Die direkte Interaktion von Diversin mit CKI ϵ und Axin/Conductin, zwei unterhalb von Dishevelled agierenden Komponenten des Wnt Signalweges, unterstreicht die besondere Stellung von Diversin. Sowohl die Interaktion von Dishevelled mit Axin/Conductin als auch die der Casein-Kinasen mit Axin werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Deshalb könnte Diversin das bisher fehlende Brückenmolekül zwischen den beiden Signalzentren des Wnt-Netzwerkes, Dishevelled und Axin/Conductin, sein. Unterstützt wird solch ein Modell durch unsere Studien zum Mechanismus von Diversin. Für die Inhibierung des β -Catenin-Signales durch Diversin waren beide Interaktionen, die mit CKI ϵ und die mit Axin/Conductin notwendig. Im Gegensatz dazu scheint für die Funktion von Diversin innerhalb des Wnt/JNK-Signalweges die Interaktion mit CKI ϵ ausreichend zu sein. Bestätigt werden diese Beobachtungen durch die funktionelle Identität von Diego und Diversin hinsichtlich der Kontrolle von Konvergenz und Extension im Zebrafisch. Besonders hervorzuheben ist die durch *in vivo*-Experimente im Zebrafisch belegte Funktion von Diversin zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese. Einerseits ist Diversin die einzige der oben angeführten Komponenten, die schon das früheste, den Blastula-Organizer induzierende β -Catenin-Signal kontrolliert. Andererseits reguliert Diversin auch von Wnt8, Wnt5a und Wnt11 kontrollierte Prozesse zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese.

Zusammengenommen etablieren die vorgelegten Befunde Diversin als neuen, essentiellen Bestandteil der Wnt-Signaltransduktion, der regulatorisch in die Signalübertragung zwischen Dishevelled und Axin/Conductin eingreift. Über seine spezifischen Wechselwirkungen blockiert Diversin Wnt/ β -Catenin-Signale und aktiviert die Wnt/JNK-Kaskade. Damit ist Diversin als mögliche neue „molekulare Schalteinheit“ an der intrazellulären Vernetzung verschiedener Teilaspekte des Wnt-Signalweges beteiligt.