

# 1. Einleitung

Während der Ontogenese von höheren, vielzelligen Organismen entstehen aus der omnipotenten Zygote eine Vielzahl von spezialisierten Zelltypen und Geweben. Damit diese Differenzierungsprozesse koordiniert ablaufen, muss jede Zelle genaue Informationen hinsichtlich ihrer Funktion, Morphologie und Position erhalten und aussenden können. Ein Netzwerk aus miteinander verbundenen und wechselwirkenden Signalkaskaden bewerkstelligt diese Kommunikationsleistung. Die Erkenntnis, dass die Deregulierung solcher entwicklungsbiologischer Signalkaskaden untrennbar mit der Entstehung vieler Krebs syndrome verknüpft ist, hat zu einem enormen Interesse an den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen geführt. Jedoch haben genetische, zellbiologische und biochemische Studien gerade erst begonnen, die unerhörte Komplexität dieser biologischen Steuer- und Regelmechanismen zu erschließen.

Der Wnt/Wingless-Signalweg ist ein prototypisches Beispiel für solche Signalkaskaden. In der Entwicklung von einfachen Vielzellern wie Hydra (Hobmayer et al., 2000) bis hin zu den komplexen Säugetieren (Cadigan & Nusse, 1997) sind Wnt-Signale essenziell für grundlegende musterbildende Prozesse, beispielsweise die Festlegung der primären Körperachsen oder die korrekte Anlage von Gehirnstrukturen. Deregulation dieser Kaskade kann zur Ausbildung von Darmkrebs führen, einer der häufigsten Krebsarten in der nordwestlichen Welt. In 85% aller spontanen oder erblichen kolorektalen Tumoren ist die Wnt-Kaskade überaktiviert. Patienten mit erblichem Darmkrebs (familiäre adenomatöse Polyposis, FAP) entwickeln darüber hinaus auch in anderen Organen Neoplasien.

Diese Einleitung soll einen Überblick über Funktionen und Mechanismus des Wnt/Wingless-Signalweges in Entwicklung und Krebsentstehung geben. Im Besonderen soll der aktuelle Stand des Wissens zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten, zentralen Komponenten des Wnt/Wingless-Signalweges detailliert werden.

### 1.1. Das Wnt-Netzwerk

Der Wnt-Signalweg ist nach neueren Untersuchungen ein verzweigtes Netzwerk, dessen Aktivierung unterschiedlichste Prozesse steuert. Abbildung 1-1 zeigt einen vereinfachten Überblick der Wnt/Wingless-Signalkaskade und ihre intrazellulären Verzweigungen.

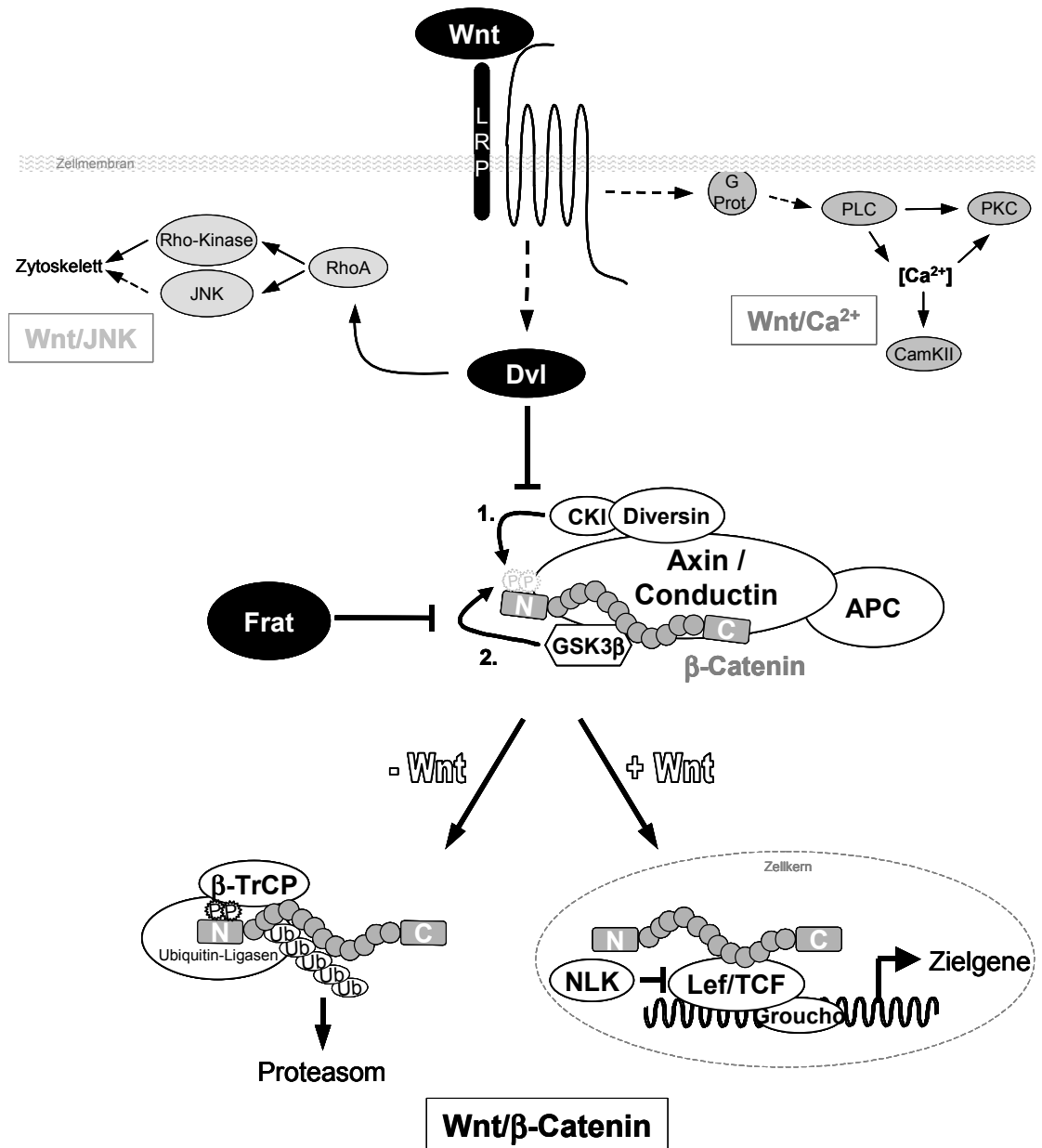


Abbildung 1-1: Schematische Übersicht über das Wnt-Netzwerk

Man kann drei Hauptzweige der Wnt-Kaskade unterscheiden: (i) der „klassische“ Wnt/β-Catenin-Weg steuert über die Aktivierung des zentralen Effektormoleküls β-Catenin

Entscheidungen über Differenzierungsschicksale der betroffenen Zellen. Deregulierung dieses Zweiges kann zur Entstehung von Tumoren führen (Bienz & Clevers, 2000). Der (ii) Wnt/JNK-Signalweg beeinflusst durch Umorganisation des Zytoskeletts Morphologie und planare Polarität von Epithelzellen. Molekulare Effektoren sind unter anderem die Jun-N-terminale Kinase (JNK) und/oder die Rho-assoziierten Kinase (ROK, Winter et al., 2001; Mlodzik, 1999). Der (iii) Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg führt, vermutlich über G-Proteine und Phospholipase C (PLC), zur Ausschüttung von intrazellulärem Calcium und damit letztendlich zur Aktivierung von Calcium-sensitiven Enzymen wie Protein Kinase C (PKC) oder Calmodulin-abhängiger Kinase II (CamKII, Kuhl et al., 2000). Darüber hinaus sind APC und GSK3 $\beta$  über das Mikrotubuli-Zytoskelett an Vorgängen wie asymmetrischen Zellteilungen und Orientierung der Mitosespindel beteiligt (Fodde et al., 2001).

## **1.2. Der Verlauf des $\beta$ -Catenin-Signals**

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaltransduktion. Den Kern dieser Kaskade bildet das Protein  $\beta$ -Catenin. Biochemisch wurde  $\beta$ -Catenin als Bestandteil der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion charakterisiert: dort verbindet  $\beta$ -Catenin über  $\alpha$ -Catenin das Aktin-Zytoskelett mit dem transmembranen Cadherin-Komplex (Ozawa et al., 1989; Huelsken et al., 1994). Daneben existiert ein weiterer Vorrat von  $\beta$ -Catenin. Dieses sogenannte „freie“ zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin ist der Effektor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs. Der Signalpool von  $\beta$ -Catenin-Protein wird durch kontinuierlichen proteosomalen Abbau auf einem niedrigen Niveau gehalten (Aberle et al., 1997). Aktivierung des Signalweges führt zur Blockade dieser konstitutiven Degradation, wodurch der Signalpool von  $\beta$ -Catenin größer wird und schließlich die für die Signalfunktion kritische Schwelle überschreitet. Die zentralen Komponenten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges und deren Hierarchie wurden vor allem durch Epistase-Studien in *Drosophila* aufgeklärt (Riggelman et al., 1990; Siegfried et al., 1994). Im Folgenden sei der Ablauf des Geschehens grob beschrieben (siehe Abbildung 1-1, in Klammern sind alternative bzw. *Drosophila*-Namen aufgeführt).

Lösliche Wnt-Liganden (Wingless, Wg) binden an Frizzled (Fz) -Rezeptoren und an Korezeptoren der LRP-Familie (Arrow). Diese aktivieren auf bisher ungeklärte Weise das Phosphoprotein Dishevelled (Dvl, Dsh). Die Serin/Threonin-Kinasen GSK3 $\beta$  (Zeste-White 3, Zw3 / Shaggy) und Casein Kinase I (doubletime/discs overgrown) befinden sich in einem Multiproteinkomplex, dem sogenannten  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex, dessen Rückgrat

die Gerüstproteine Conductin und/oder Axin bilden und der zudem das Tumorsuppressor-Genprodukt APC (Adenomatous Polyposis Coli) beinhaltet. In diesem molekularen Kontext phosphorylieren zunächst Casein Kinase I und darauf folgend GSK3 $\beta$  kontinuierlich kritische Serin- und Threoninreste im N-Terminus des Effektormoleküls  $\beta$ -Catenin (Armadillo, Arm), welches dadurch für die Ubiquitinierung und anschließende Proteolyse markiert wird. Die Erkennung des phosphorylierten  $\beta$ -Catenins und die Rekrutierung weiterer für die Ubiquitinierung erforderlicher Enzyme übernimmt das F-Box Protein  $\beta$ -TrCP (slimb). Aktiviertes Dishevelled unterbindet auf noch ungeklärte Art und Weise die Phosphorylierung  $\beta$ -Catenins. Hypophosphoryliertes  $\beta$ -Catenin kann nun nicht mehr durch  $\beta$ -TrCP der Proteolyse zugeführt werden. Das stabilisierte  $\beta$ -Catenin kann nun akkumulieren und in den Zellkern translozieren. Dort bildet es mit Mitgliedern der Lef/TCF-Familie (Pangolin/dTcf) einen potenten Transkriptionsaktivator und führt zur Expression von Wnt-Zielgenen (Bienz & Clevers, 2000; Huelsken & Birchmeier, 2001).

### 1.2.1. Liganden und Rezeptoren

Der archetypische Ligand der Wnt-Kaskade, Wnt-1, wurde als Proto-Onkogen Int-1 isoliert (Nusse et al., 1984). Insertion des murinen Tumor Virus MMTV führte zur Aktivierung des Int-1-Gens (Integrator-1) und zur Entwicklung von Mammakarzinomen in der Maus. Aufgrund der signifikanten Homologie zu dem Segmentpolaritätsgen Wingless (*Wg*) in *Drosophila* wurde die Namensschimäre aus *Wg* und Int-1, Wnt, zum heute gebräuchlichen Namen (Nusse et al., 1991). Die Identifikation von weiteren Wnt-Genen etablierte eine Wnt-Familie. So existieren mindestens als 18 Mitglieder in Säugern und 7 in *Drosophila*. Die Wnt-Familie wird grob in zwei Subfamilien unterteilt: i) transformierende, also onkogene Wnt-Proteine, wie z.B. Wnt-1, 3a, 8, und ii) nicht-transformierende Wnt-Proteine wie Wnt-5a, 11. Transformierende Wnt-Proteine aktivieren hauptsächlich den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg. Im Gegensatz dazu aktivieren die nicht-transformierenden Wnt-Liganden vorzugsweise den Wnt/JNK- oder Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg (Kuhl et al., 2000).

Die sezernierten Wnt-Moleküle binden an Rezeptoren der Frizzled-Familie (Bhanot et al., 1996; Dann et al., 2001). Frizzleds sind charakterisiert durch sieben Transmembrandomänen (sog. Serpentin-Rezeptoren), und ähneln damit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Weg ist in der Tat sensitiv gegen pharmakologische G-Protein-Inhibitoren (Slusarski et al., 1997; Winklbauer et al., 2001), und auch die  $\beta$ -Catenin-Aktivierung durch Frizzled-1 könnte über G-Proteine vermittelt werden (Liu et al., 2001). Als Korezeptoren für

Wnt-Liganden fungieren LDL-Rezeptor-verwandte Proteine (LRPs), welche direkt mit Wnt-Proteinen interagieren (Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000).

### 1.2.2. $\beta$ -Catenin in Entwicklung und Tumorigenese

Eine wichtige Funktion  $\beta$ -Catenins besteht in der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion. Dort verbindet  $\beta$ -Catenin das Zytoskelett mit Transmembran-Proteinen der Cadherin-Familie. Die Adhäsionsfunktion  $\beta$ -Catenins ist exzellent dokumentiert und soll in dieser Arbeit nicht weiter behandelt werden (für eine Übersicht siehe Nagafuchi, 2001, Takeichi et al., 2000). Die Bedeutung der Signalfunktion  $\beta$ -Catenins wird bei Betrachtung des Phänotypes der  $\beta$ -Catenin-Knock-out-Maus deutlich. Die Ausprägung der anterior-posterioren Körperachse ist in den Knock-out-Embryonen gestört, was bereits sehr früh (Tag 5,5) durch falsche Lokalisierung bzw. fehlende Expression anteriorer Markergene wie Cerberus-like, Lim-1, Hex und Hesx1 nachgewiesen werden kann. Die Embryonen sind im Eizylinder-Stadium arretiert und können keine Mesodermentwicklung mehr induzieren (Huelsen et al., 2000). Diese Befunde decken sich mit der maßgeblichen Beteiligung von Wnt-Signalen an der Etablierung der Körperachse. So führt beispielsweise die Überexpression von Wnt8 in Mäusen zur Ausbildung einer zweiten Körperachse (Popperl et al., 1997). Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird durch die Überexpression von  $\beta$ -Catenin ebenfalls eine zweite Körperachse induziert, wogegen der Verlust von  $\beta$ -Catenin zur Ventralisierung, also zum Verlust der dorso-anterioren Achse führt (Heasman et al., 1994). Auch im Teleostier *Danio rerio* (Zebrafisch) ist die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin auf der prospektiv dorsalen Seite des Embryos für die Achsenbildung verantwortlich (Kelly et al., 2000). Einen Überblick über die Beteiligung von  $\beta$ -Catenin und des Wnt-Signalweges bei der embryonalen Musterbildung geben Wodarz & Nusse (1998), und Yamaguchi (2001).

Den ersten Hinweis auf das onkogene Potenzial  $\beta$ -Catenins lieferte die Entdeckung, dass das Tumorsupressor-Protein Adenomatöse Polyposis Coli (APC, siehe auch Kapitel 1.3.2) maßgeblich an der Proteolyse des Signalpools von  $\beta$ -Catenin beteiligt ist. Aber auch  $\beta$ -Catenin selbst wirkt in vielen Krebsyndromen als Onkogen (Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997; Behrens, 1999; Morin, 1999). Die Mehrzahl der onkogenen Mutationen von  $\beta$ -Catenin führt zur Substitution konservierter Serin- und Threoninreste im N-Terminus, deren Phosphorylierung das Protein für den proteosomalen Abbau markieren. Austausch oder Verlust dieser

Serin- und Threoninreste führt daher zur Stabilisierung  $\beta$ -Catenins. Die Folge ist nukleäres, signalaktives  $\beta$ -Catenin, welches in den entsprechenden Tumoren detektierbar ist. Beachtenswert ist die Tatsache, dass die überwiegende Mehrheit der  $\beta$ -Catenin-Mutationen in Tumoren den Serinrest an Position 45 betreffen (Polakis, 2000; Wong et al., 2001). Dieser Serinrest stellt jedoch keine Konsensus-GSK3 $\beta$ -Phosphorylierungsstelle dar, vielmehr handelt es sich vermutlich um eine Casein Kinase I (CKI) -Stelle. In der Tat konnte kürzlich gezeigt werden, dass dieser Rest nicht von GSK3 $\beta$ , sondern von CKI phosphoryliert wird (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002). Diese Befunde, zusammen mit Daten aus unserem Labor, führen zu einem neuen Verständnis der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung (siehe Kapitel 1.4.2).

### 1.2.3. Die HMG-Box Transkriptionsfaktoren

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg führt, wie viele andere Signalkaskaden auch, letztlich zu einer Veränderung der Expression spezifischer Zielgene. Die Entdeckung der Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit dem Transkriptionsfaktor Lef-1 (Lymphoid enhancer factor-1) und deren Kollokalisierung im Zellkern klärte den letzten Schritt im klassischen Wnt-Signalweg auf (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Lef-1 gehört zusammen mit den nah verwandten TCF-Proteinen (T-Cell Factor) zu der Lef/TCF-Familie von Transkriptionsfaktoren. Alle Mitglieder zeichnen sich durch den Besitz einer HMG-Box (High Mobility Group) aus. Die HMG-Box ist eine sequenzspezifische DNA-Bindedomäne. Zusätzlich ist der  $\beta$ -Catenin-bindende N-Terminus in allen Lef/TCF-Proteinen konserviert. Zahlreiche Studien zu den HMG-Box-Faktoren haben ein recht detailliertes Bild von den nukleären Vorgängen gezeichnet. Es lässt sich grob wie folgt beschreiben: in Abwesenheit eines Wnt-Signals (und damit auch  $\beta$ -Catenins) binden die Lef/TCF-Faktoren an DNA sowie an Korepressoren wie z.B. Groucho (Cavallo et al., 1998) und/oder CtBP (Brannon et al., 1999). Dies führt zu einer aktiven Reprimierung der betroffenen Zielgene. Nach Aktivierung des Wnt-Signals bindet  $\beta$ -Catenin an den N-Terminus der Lef/TCF-Faktoren und rekrutiert mit seinen N- und C-terminalen Domänen Aktivatoren wie CBP/p300 oder Histondeacetylasen. Dies ermöglicht die Transkription von Zielgenen, wie z.B. CyclinD1 (Tetsu & McCormick, 1999), c-myc (He et al., 1998), PPAR $\gamma$  (He et al., 1999) und siamois (in *Xenopus*, Brannon et al., 1997). Auch der Conductin-Promotor verfügt über Lef/TCF-Bindestellen (Jho et al., 2002). Tatsächlich sind in der Mehrzahl der Darmkrebszellen mit überaktiviertem  $\beta$ -Catenin-Signal erhöhte Conductin-Proteinmengen detektierbar. Zudem wird ein in den Conductin-Locus integriertes lacZ-Gen

im APC<sup>+/-Min</sup> Hintergrund (siehe auch Kapitel 1.3.2) spezifisch in Darmadenomen exprimiert (Lustig et al., 2002). Diese Aktivierung von Conductin stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar.

Eine detaillierte Analyse der  $\beta$ -Catenin/Lef-1-Interaktion von unserer Arbeitsgruppe konnte die beteiligten Aminosäurereste auf beiden Seiten identifizieren (von Kries, Winbeck, Asbrand et al., 2000). Zusammen mit den Daten der Kristallstrukturen von  $\beta$ -Catenin (Huber et al., 1997) und dem TCF/ $\beta$ -Catenin-Komplex (Graham et al., 2000) ergibt sich ein recht genaues Bild der hochspezifischen Interaktion. Lef-1 bindet mit sauren und aromatischen Resten in einer entsprechenden Region der Armadillo-Domäne von  $\beta$ -Catenin, der sogenannten basischen Grube. Diese Erkenntnisse ermöglichen in Zukunft die Entwicklung von pharmakologischen Inhibitoren zur Therapie von Tumoren, welche durch Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signals ausgelöst werden (z.B. für Kolontumore).

### **1.3. Der Conductin/Axin-Komplex**

Die zentrale Regulationseinheit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ist der Conductin/Axin-Komplex, auch genannt  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex. Ihm kommt die Aufgabe zu, in Abwesenheit von Wnt-Signalen die kontinuierliche Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und damit dessen Abbau zu gewährleisten. Die namensgebenden Komponenten Conductin und/oder Axin bilden den Kern dieses Multiproteinkomplexes und sind das Ziel zahlreicher regulatorischer Eingriffe. Trotzdem sind viele molekulare Aspekte des Komplexes noch unverstanden. Daher gilt diesem Komplex das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit. Die wichtigsten Komponenten des Komplexes sind Conductin/Axin und APC.

#### **1.3.1. Conductin / Axin**

Das Rückgrat des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes bilden die Gerüstproteine Conductin und/oder das nah verwandte Axin. Conductin wurde in unserem Labor aufgrund seiner Bindung an  $\beta$ -Catenin mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems entdeckt und dessen Funktion erstmals ausführlich charakterisiert (Behrens, Jerchow, Würtele, Grimm, Asbrand et al., Science 1998). Der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit ist Bestandteil dieser Untersuchungen. Conductin/Axin-Homologe sind in Säugern, *Drosophila*, *Xenopus* und Zebrafisch isoliert worden. Im

vollständig sequenzierten Genom des Fadenwurms *C. elegans* konnte bis jetzt kein eindeutiges Homolog identifiziert werden, jedoch existiert wohl ein ähnliches Gen (H. Clevers, Utrecht, persönliche Mitteilung). Conductin und Axin sind mit 42% Identität über alle Aminosäuren eng verwandt. In den konservierten Domänen beläuft sich die Identität bis auf 62%. Abbildung 1-2 zeigt einen Sequenzvergleich beider Proteine. Konservierte Domänen sind schattiert hervorgehoben.

mConductin	1	MSSAVL	VTLLEDPSSS	FREDAPRPVV	PGEEGE----	-TPPCQPSV-	-GKVQSTKPM	PVSSNARRNE	DGLG-EPEGR	80												
mAxin		MQSPKMNQVE	QGFPLDLGAS	FTEDAPRPVV	PGEEGELVST	DSRPNVHSFC	SGKGTSTIKSE	TSTATPRRS	LDLGYEPEGS													
mConductin	81	ASPDSP	PLTRW	TKSLHSL	LLGD	QDGAYL	FRFT	LEREK	CVDTL	DFWFAC	NGFR	QMNLD	TD--	KTLRVA	KAII	KRYI	ENNS	V	160			
mAxin		ASPTFP	YLRW	AESLHSL	LLDD	QDGISL	FRFT	LKQEG	CADLL	DFWFAC	SGFR	KLEPC	DSNEE	KRLKLA	RAII	KRYI	ILDS	NGI				
mConductin	161	VSKQL	KPATK	TYIRD	GIKKQ	QIGSVM	FDQA	QTEIQ	AVMEE	NAYQV	FLTS	IYLEY	VRS	GG	ENTAY	MSN--	GGLG	SLK	VLC	240		
mAxin		VSRQ	KPATK	SFIK	DCVMKQ	QIDPAM	FDQA	QTEIQ	STMEE	NTYPS	FLKSD	IYLEY	TRT	GS	ESPKV	CDQS	SGSG	TG	KMS			
mConductin	241	GYLPTL	NEEE	EWTC--	ADL	KCKLS	PTVVG	-LSSK	TLRAT	ASVRS	TETAE	NG----	FRSF	KRSD	VPN	YPH	VSGY	V	FAPA	320		
mAxin		GYLPTL	NEDE	EWKCD	QDADE	DDGRD	PLPPS	RLTQ	KLLET	AAPRA	PSSRR	YNEG	REL	RYG	SWREP	VN	PYY	VNSG	YAL	LAPA		
mConductin	321	TSAND	SELSS	DALTD	DSMSM	TDSSV	DGVPP	YRMGS	KQLQ	REMR	SVKAN	GOVSL	PHF	PR	THR	LPK	EMTP	VEPA	AFA	EAL	400	
mAxin		TSAND	SEQQS	LSSDA	DTLSL	TDSSV	DGIPP	YRI--	RKQHR	REMO	ESIQVN	GRVPL	PHI	PR	TYR	MPKE	IR-	VEPO	K	FABEL		
mConductin	401	ISRLE	KLKL	LES	RHSLEER	LQI	REDEEK	EGSE	Q-----	ALSSR	DGAPV	QH--	PLALL	PG-----	SY	EEDP	QTIL	DD		480		
mAxin		IHRLE	AVORT	REAE	BKLEER	LKR	VRMEEEG	EDGE	MPSGPM	ASHKL	PSVPA	WHFP	PPRYVD	MGC	SGLRDAH	EENP	ESIL	DE				
mConductin	481	HLSRV	LKTPG	CQSPG	VGRYS	PRSR	SPDHHH	QHHHH	QOCHT	LLST	GGLPP	VAAC	PLL	GGK	SFLT	KQT	TKH	VHHH	YI	HHHA	560	
mAxin		HVOR	VMRTPG	CQSPG	EGH--	--RSP	DSGH	VAKTA	VLGGT	ASGH	GKHVPK	LGLK	LDTAGL	HH----	HRH	VHHH	VH	NSA				
mConductin	561	VPKTK	EEIEA	EATQ	RVRCLC	PGG	DYCY	KCK	SHP	KAPE	PL--	PGE	QFC	GSR	GTL	PKR	NAK	GTE	PGLA	LSARD	GGMSS	640
mAxin		RPK--	EQMEA	EVARR	VQSS	SWG	PETHGA	KPR	SYENAG	TTL	SAGD	LPP	GK	TS	APS	KR	NIK	KA	ES	GKN	ANAE	VPSTT-
mConductin	641	AAGG	PQLPGE	EGDR	SQDVWQ	WML	ESERQ--	-SK	SPHSAQ	SIRK	SYPLES	ARA	APGER	VS	RHLL	GASGH	SRS	VAR	AHP	F	720	
mAxin		-----	E	DAEK	NQKIMQ	WIIE	GEKEIS	RHR	KAGHSS	GLR	KQAHES	SRPL	SIERPG	AVHP	WVSAQL	RNS	VQ	PSH	L	F		
mConductin	721	TQDP	AMPPLT	PPNT	LQLEE	ACRR	LAEVSK	----	PQQR	CCV	ASQQRDR	N--	HSAAGQ	AGAS	PFANP-	SLAP	EDH	KEP		800		
mAxin		IQDP	TMPNP	APN	PLQLEE	ARRR	LEEBEK	RANK	LPSKQR	YVQ	AVMQRGR	TCV	RACAPV	LSV	VPVSD	ELSE	TET	KSQ				
mConductin	801	KKLAS	VHALQ	ASEL	VVIYFF	CGE	IPYR	RM	LKAQ	SLTLGH	FKE	LSKKN	YRYY	FKKASD	EFAC	GAVFEE	IWD	DET	VLP	M	880	
mAxin		RKAG	GSA	PP	CDSI	VGYFF	CGE	IPYR	TL	VRGRA	VTLGO	FKE	LT	KKGS	YRYY	FKKVSD	EFDC	G	V	FEE	VREDE	PVLEP
mConductin	881	YEG	R	L	GKVE	R	I	D														
mAxin		FEE	K	I	GKVE	K	V	D														

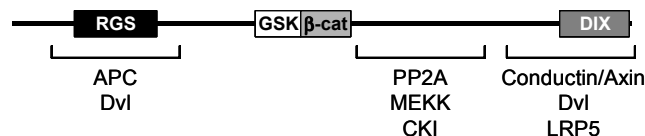
**Abbildung 1-2:** Sequenzvergleich von murinem Conductin und Axin. Identische Reste sind hervorgehoben, konservierte Domänen schattiert

Funktionelle Studien konnten zeigen, dass Conductin ein negativer Regulator des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ist. So ist Conductin in der Lage, in SW480-Kolonkrebzellen stabilisiertes  $\beta$ -Catenin abzubauen (Behrens et al., 1998). In *Xenopus* Embryonen kann Conductin die Ausbildung von doppelten Körperachsen verhindern, die durch Xwnt8-Überexpression hervorgerufen werden. Die Überexpression von Conductin allein führt in diesem System zu einem ventralisierten Phänotyp. Die Arbeitsgruppe von Dr. F. Costantini konnte zeigen, dass bei der natürlich vorkommenden Mausmutante *Fused* eine Mutation des



Axin-Gens vorliegt (Zeng et al., 1997). *Fused*-Embryonen zeigen in sehr frühen Entwicklungsstadien die Anlage mehrerer Primitivstreifen. Dies deutet daraufhin, dass die Musterungsprozesse bei der Festlegung der Körperachse gestört sind. Der Verlust des Conductin-Gens im Mausmodell wird zur Zeit in unserem Labor analysiert und hat zunächst keine erkennbaren phänotypischen Konsequenzen. Kombinierte Deletion von Conductin zusammen mit einem Allel von Axin (Genotyp  $\text{Conductin}^{-/-}$ ,  $\text{Axin}^{+/Fused}$ ) offenbart jedoch einen Phänotyp: den Tieren fehlen mit variablem Ausmaß anteriore Strukturen ab dem Mesencephalon (B.A. Jerchow, persönliche Mitteilung).

Für Conductin und später auch Axin konnte die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$  und APC charakterisiert werden (Behrens et al., 1998; Hart et al., 1998). Die grundlegende Domänenstruktur von Conductin und Axin ist bekannt. Neben den initial entdeckten Interaktionspartnern  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$  und APC konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Bindungsproteine charakterisiert werden. Daneben wurden von anderen Gruppen weitere Interaktionspartner wie Dvl, Axin selbst (Hedgepeth et al., 1999; Sakanaka & Williams, 1999), Protein Phosphatase 2A (PP2A, (Hsu et al., 1999) und MEKK (Zhang et al., 1999) beschrieben. Abbildung 1-3 zeigt schematisch die Struktur von Conductin/Axin. Die Bindestellen der Interaktionspartner sind gekennzeichnet.



**Abbildung 1-3:** Schematische Übersicht über die Domänenstruktur von Conductin. Interaktionspartner und deren Bindestellen sind gekennzeichnet

Am N-Terminus von Conductin und Axin befindet sich eine RGS-Domäne (Regulator of G-Protein Signalling), an die das APC-Protein bindet. Die vorliegende Arbeit und andere Studien konnten zeigen, dass die RGS-Domäne unerlässlich für die Funktion von Conductin bzw. Axin ist (Behrens et al., 1998; Hart et al., 1998; Zeng et al., 1997). Die Überexpression von  $\text{Axin}\Delta\text{RGS}$  führt in *Xenopus* sogar zu Dorsalisierung (Fagotto et al., 1999), was auf einen dominant-negativen Effekt dieser Mutante hindeutet. Trotz der Ähnlichkeit der RGS-Domäne zu Regulatoren von G-Proteinen konnte bis jetzt kein Einfluss dieser Domäne auf G-Protein vermittelte Signalvorgänge beobachtet werden. Experimente mit chimären Rezeptoren, beste-

hend aus den intrazellulären Teilen von Frizzled-1 und den extrazellulären Teilen des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors, konnten zeigen, dass  $\beta$ -Catenin auch über heterotrimere G-Proteine aktiviert werden kann (Liu et al., 2001). Im Besonderen scheinen  $G_{\alpha q}$  und  $G_{\alpha o}$  an dieser Signaltransduktion beteiligt zu sein. Interessanterweise zeigt die RGS-Domäne von RGS8 den höchsten Verwandtschaftsgrad zu den RGS-Domänen Conductin oder Axins. Von RGS8 wiederum ist bekannt, dass es spezifisch an  $G_{\alpha o}$  binden und dessen GTPase-Funktion aktivieren kann (Saitoh et al., 1997). In Genexpressionsanalysen in  $\beta$ -Catenin-deletierter, muriner Haut stellte sich heraus, dass dort die Expression von RGS2 verringert ist. RGS2 bindet und aktiviert spezifisch  $G_{\alpha q}$  (J. Hülken, persönliche Mitteilung). Damit ergeben sich möglicherweise neue Implikationen für die Rolle von heterotrimeren G-Proteinen innerhalb der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion. Im Besonderen gilt dies auch für mögliche weitere Funktionen der RGS-Domänen von Conductin und Axin.

Ebenso wichtig für die Funktion Conductins sind die Bindestellen für  $\beta$ -Catenin und GSK3 $\beta$ . Im Zebrafisch wird dies durch die Mutation *masterblind* illustriert (Heisenberg et al., 2001). Hier ist die GSK3 $\beta$ -Bindestelle von Axin mutiert, so dass GSK3 $\beta$  nicht mehr an dieses Axin-Protein binden kann. Den Tieren fehlen, ähnlich wie bei der *headless/Ztcf-3* Mutation, die vordersten Kopfstrukturen, was auf überschüssige Wnt-Aktivierung während der Musterung der anterioren Körperachse hindeutet. In humanen Tumoren konnten ebenfalls Mutationen in der GSK3 $\beta$ -Bindestelle von Conductin oder Axin identifiziert werden (Liu et al., 2000; Satoh et al., 2000; Webster et al., 2000). Diese Mutationen führen auch hier durch Stabilisierung des Effektors  $\beta$ -Catenin zu einer Überaktivierung des Wnt-Signalweges. Diese Befunde etablierten Conductin und Axin als klassische Tumorsuppressoren.

In der Region C-terminal der  $\beta$ -Catenin-Bindestelle binden zahlreiche Proteine, wie z.B. die bereits erwähnten PP2A und MEKK. Weiterhin kann hier auch die Casein Kinase I $\alpha$  binden (Liu et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass diese Axin-ständige CKI $\alpha$  den Serinrest 45 von  $\beta$ -Catenin phosphoryliert. Auch Rubinfeld et al. können die Bindung von CKI, jedoch der  $\epsilon$ -Isoform, an Axin zeigen (Rubinfeld et al., 2001). Es ist zur Zeit allerdings noch unklar, ob es sich dabei um eine direkte Interaktion von Axin und CKI handelt. Die Rolle von CKI im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg wird in Kapitel 1.4.2 ausführlich behandelt.

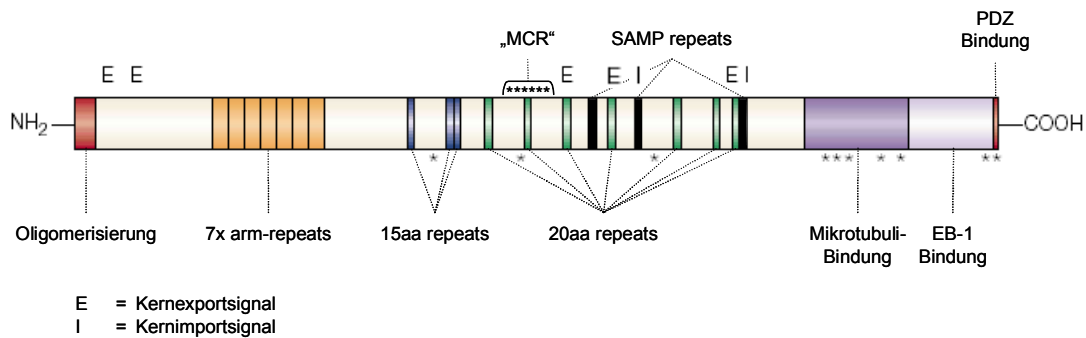
Die C-terminale DIX-Domäne (Dishevelled, Axin) von Axin vermittelt die Interaktion mit Dvl und die Oligomerisierung von Axin (Sakanaka & Williams, 1999; Smalley et al., 1999). Die Interaktion Axins mit Dvl führte zur Vorstellung, dass durch Wnt-Liganden aktiviertes Dvl mit dem  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex über die DIX-Domäne interagiert und damit inhibiert.

Ob eine solche Funktion tatsächlich von physiologischer Bedeutung ist, lässt sich zur Zeit nur schwer beantworten. So gibt es im Hinblick auf die Dvl-Bindung von Axin widersprüchliche Befunde. Einige Gruppen detektieren diese Interaktion (Kishida et al., 1999; Smalley et al., 1999; Itoh et al., 2000), andere nicht (Hedgepeth et al., 1999; Sakanaka & Williams, 1999; Rubinfeld et al., 2001). Verwirrend ist zusätzlich die Tatsache, dass Dvl an zwei unabhängige Domänen von Axin zu binden scheint (Li et al., 1999a) und umgekehrt auch für Dvl zwei verschiedene Interaktionsdomänen mit Axin beschrieben worden sind (Kishida et al., 1999). Für Conductin konnte in der vorliegenden Arbeit die Fähigkeit zur Oligomerisierung festgestellt werden. Eine Interaktion von Conductin mit Dvl konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Kürzlich konnte ein weiterer Bindungspartner von Axin identifiziert werden: der intrazelluläre Teil des Wnt-Korezeptors LRP5 (Mao et al., 2001). Auf Seiten Axins sind Bereiche inklusive der DIX-Domäne für die Bindung an LRP5 entscheidend. Die Interaktion wird durch Wnt-Liganden stimuliert und führt zur Membranlokalisation von Axin. Interessanterweise ist der membranständige, intrazelluläre Teil von LRP5 in der Lage, das  $\beta$ -Catenin-Signal dauerhaft zu aktivieren. Dies deutet auf eine Rolle von LRP5 bei der Weiterleitung des Wnt-Signals an den  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex hin. Auch Conductin kann im Hefe-2-Hybrid System an das nah verwandte LRP6 binden (J. Behrens, persönliche Mitteilung).

### 1.3.2. APC

Das Tumorsupressor-Genprodukt APC (Adenomatous Polyposis Coli) ist ein weiterer, wichtiger Bestandteil des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes. Erblicher adenomatöser Darmkrebs („Familiäre adenomatöse Polyposis“, FAP) wird ursächlich durch Inaktivierung des APC-Gens durch Mutation und anschließendem Verlust des zweiten Allels („loss of heterozygosity“, LOH) ausgelöst (Kinzler et al., 1991). In der großen Mehrzahl der spontanen Darmkrebsfälle treten ebenfalls Mutationen im APC-Gen auf (Miyaki et al., 1994; Miyoshi et al., 1992; Nagase & Nakamura, 1993). Die APC-Mutationen häufen sich sowohl bei erblichem als auch bei spontanem Darmkrebs in der selben Region des APC-Gens. Daher wird dieser Abschnitt auch „mutation cluster region“ (MCR) genannt. Abbildung 1-4 zeigt eine schematische Übersicht des APC-Proteins.



**Abbildung 1-4:** Schematische Übersicht des APC-Proteins

N-terminal befinden sich 7 Armadillo-Repeat-Domänen, von denen gezeigt werden konnte, dass sie an Asef, einem Rac-spezifischen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF), binden können (Kawasaki et al., 2000). Im zentralen Teil befinden sich die sogenannten 15aa und 20aa-Repeat-Domänen. Die Entdeckung, dass diese Domänen  $\beta$ -Catenin binden können (Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993) bestärkte zunächst die Vermutung, dass die Tumorsupressor-Funktion von APC mit der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion zusammenhängen könnte. Später wurde jedoch gezeigt, dass APC zur Destabilisierung des freien Signalpools von  $\beta$ -Catenin beiträgt (Munemitsu et al., 1995; Rubinfeld et al., 1996) und erhärtete damit die Rolle von APC im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.

In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass APC mit Conductin und Axin interagieren kann (Behrens et al., 1998). Auf Seiten von APC wird diese Interaktion durch die drei SAMP-Repeat-Domänen vermittelt. Die SAMP-Repeats befinden sich im zentralen Teil von APC und liegen C-terminal der MCR. Dies deutet darauf hin, dass die onkogenen APC-Mutationen nicht mehr an Axin/Conductin binden können. Im APC<sup>+1638T</sup>-Mausmodell zeigte sich, dass der Verbleib nur eines SAMP-Repeats in einer ansonsten C-terminal deletierten APC-Polypeptidkette nicht mehr zu einem onkogenen APC-Allel führt (Smits et al., 1999). Im murinen, stark onkogenen *Min*-Allel (Multiple intestinal neoplasia) von APC fehlen hingegen alle SAMP-Repeats. Weiterhin konnte in unserem und anderen Laboren gezeigt werden, dass ein APC-Protein mit mutierten, nicht funktionalen SAMP-Repeats nicht mehr in der Lage ist,  $\beta$ -Catenin-Abbau zu stimulieren (von Kries et al., 2000; Kawahara et al., 2000). Daraus ergibt sich ein Konzept, in dem APC als essenzieller Kofaktor von Conductin oder Axin die Funktion des  $\beta$ -Catenin-Abbaufunktion unterstützt und dadurch als Tumorsupressor wirkt. Als Mechanismus ist denkbar, dass der Zusammenbau des Multiproteinkomplexes durch APC vereinfacht wird, und/oder dass APC die Rekrutierung von  $\beta$ -Catenin erleichtert.

Aktivierung von  $\beta$ -Catenin ist ein sehr frühes Ereignis in der Tumorentwicklung (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997). Darüber hinaus erfahren zunächst gutartige Polypen in der Progression zum malignen Karzinom noch weitere Mutationen, durch die Tumorsuppressoren aus- und Onkogene eingeschaltet werden. Auch in diesen Prozessen spielt APC eine wichtige Rolle. Aktuelle Befunde aus APC<sup>-/-</sup>-ES-Zellen zeigen, dass der Verlust von APC zu chromosomaler Instabilität führt und somit weitere Mutationen begünstigt (Fodde et al., 2001). Entsprechend kolokalisiert APC in mitotischen Zellen mit den Kinetochoren der Mitosespindel (Korinek et al., 2000). Bereits länger bekannt ist, dass APC sowohl direkt als auch indirekt (über EB1) an Mikrotubuli binden kann (siehe Abbildung 1-4). Endogenes APC Protein befindet sich in Epithelzellen an den Enden von Mikrotubuli, insbesondere an den „leading edges“ aktiv migrierender Zellen (Mimori-Kiyosue et al., 2000). APC kann die Polymerisation von Tubulin erheblich beschleunigen, in Anwesenheit von APC haben Mikrotubuli eine höhere Stabilität. In der Tat ist in frühen, adenomatösen Darmpolypen auch die normale, geordnete Migration der Epithelzellen von der Krypte auf den Villus gestört.

Weiterhin sind funktionelle Kernexportsignale (NES) in APC beschrieben worden und eine Beteiligung APC's am nukleozytoplasmatischen Transport von  $\beta$ -Catenin postuliert worden (Henderson, 2000; Rosin-Arbesfeld et al., 2000). Diese Eigenschaften, zusammen mit einer möglichen Funktion in der E-Cadherin-basierten Zelladhäsion, implizieren APC über den Wnt-Signalweg hinaus in der Regulation von genomischer Stabilität und epithelialer Zellmigration.

### **1.3.3. Phosphorylierung von Conductin/Axin und APC**

Nicht nur  $\beta$ -Catenin, sondern auch der Conductin/Axin-Komplex ist Ziel GSK3 $\beta$ -vermittelter Phosphorylierungen. Conductin/Axin sowie APC werden durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert. Dies führt zur erhöhten Stabilität von Conductin/Axin und zur Affinitätssteigerung von sowohl Conductin/Axin als auch APC gegenüber  $\beta$ -Catenin (Rubinfeld et al., 1996; Hart et al., 1998; Jho et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Ikeda et al., 2000). Beides führt zu einem effizienterem Durchsatz von  $\beta$ -Catenin-Molekülen. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass APC auch von Axin-gebundener CKIe phosphoryliert werden kann. Mutation der betroffenen Reste in APC beeinträchtigen den  $\beta$ -Catenin-Abbau, pharmakologische Inhibition von CKIe führt zum gleichen Ergebnis (Rubinfeld et al., 2001).

Das Gegenwicht zu diesen Phosphorylierungen könnte die Protein-Phosphatase PP2A bilden. PP2A ist ein heterotrimeres Enzym: es besteht aus einer katalytischen Untereinheit (PP2A-C) und zwei regulatorischen, z.T. variablen Untereinheiten. PP2A-C und die regulatorischen Untereinheiten PR61 $\beta$  und  $\gamma$  können an Axin binden und es dephosphorylieren (Willert et al., 1999; Strovel et al., 2000). Eine weitere regulatorische Untereinheit, B56, bindet an APC (Seeling et al., 1999). Auch APC ist ein Substrat für PP2A (Ikeda et al., 2000). Mutation einer regulatorischen PP2A-Untereinheit in *Drosophila* (twins) kann die Unterexpression von Armadillo, dem *Drosophila*-Homolog von  $\beta$ -Catenin, komplementieren, konsistent mit einer Rolle von PP2A im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (Greaves et al., 1999). Epistase-Experimente deuten auf weitere Funktionen von PP2A auf der Ebene von  $\beta$ -Catenin hin (Ratcliffe et al., 2000; Yamamoto et al., 2001; Li et al., 2001). Aus diesen Befunden wird klar, dass posttranslationale Modifikationen des Abbaukomplexes wichtige Regulationsmöglichkeiten darstellen.

## **1.4. Die Phosphorylierung von $\beta$ -Catenin**

Die aminoterminal Phosphorylierung  $\beta$ -Catenins bildet die Voraussetzung für die Interaktion mit  $\beta$ -TrCP und damit für den proteasomalen Abbau. Diese Funktion wird im Conductin/Axin-Komplex von Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  und Casein Kinase I übernommen. Dabei ist die Bedeutung von CKI für die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion erst kürzlich offengelegt worden und hat zu einem neuen Verständnis der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung geführt.

### **1.4.1. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$**

Ursprünglich wurde GSK3 $\beta$  im Insulin-gesteuerten Glycogen-Stoffwechsel beschrieben (Embi et al., 1980). Mit der Identifizierung einer Mutation des homologen Gens in *Drosophila* (zeste-white 3/shaggy) konnte dieses Enzym später auch in die Wnt/Wingless-Kaskade eingruppiert werden (Siegfried et al., 1994). Mittlerweile ist eine Vielzahl bedeutsamer Substrate von GSK3 charakterisiert worden, darunter z.B. Mikrotubuli-bindende Proteine (tau, Hanger et al., 1992), Transkriptionsfaktoren (c-jun, Boyle et al., 1991) oder ribosomale Initiationsfaktoren (eIF2B, Welsh & Proud, 1993). Dies etablierte GSK3 $\beta$  als wichtige regulatorische Kinase in unterschiedlichen Aspekten der zellulären Homeostase. Charakteristisch für GSK3 $\beta$  ist deren konstitutive Aktivität. Sowohl Wnt- als auch Insulin-Signale führen zur Inhibition dieser Aktivität gegenüber den jeweiligen Substraten. Die notwendige spezifische

Trennung der separaten Signalwege, die sich gemeinsam der GSK3-Aktivität bedienen, wird im wesentlichen durch zwei Eigenschaften von GSK3 $\beta$  generiert: zum einen ermöglicht die Einbettung von GSK3 $\beta$  in den Conductin/Axin-Komplex die Isolation von Wnt-relevanter GSK3 gegenüber anderen Substraten (Cohen & Frame, 2001). Zum anderen benötigen Substrate wie beispielsweise Glycogen-Synthase eine „priming“-Phosphorylierung an Position  $n+4$  ( $n$  ist der durch GSK3 $\beta$  zu phosphorylierende Rest) (Fiol et al., 1987). Innerhalb des Insulin-gesteuerten Glycogenstoffwechsels führt die Phosphorylierung des Serin 9 von GSK3 $\beta$  durch Protein Kinase B/Akt (Cross et al., 1995) zu einem intramolekularen Pseudosubstrat, welches die Bindung von GSK3 $\beta$  an das „priming“-Phosphat unterbindet (Dajani et al., 2001; Frame et al., 2001). Für den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg konnte gezeigt werden, dass Insulin-vermittelte Inaktivierung von GSK3 $\beta$  via PKB/Akt (durch Ser-9-Phosphorylierung) keinen Einfluss auf den freien, zytoplasmatischen Signalpool von  $\beta$ -Catenin hat. Umgekehrt kann Wnt-1 die Aktivität von Glycogen-Synthase nicht beeinflussen (Ding et al., 2000). Diese Befunde führten zu dem Schluss, dass die GSK3 $\beta$ -Substrate im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg keiner „priming“-Phosphorylierung bedürfen (Cohen & Frame, 2001). Neue Befunde können zeigen, dass auch an  $\beta$ -Catenin eine „priming“-Phosphorylierung durchgeführt wird (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002), welche für die nachfolgende Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  erforderlich ist (siehe Kapitel 1.4.2). Damit kommt der Einbettung von GSK3 $\beta$  in den Conductin/Axin-Komplex zur Generierung von Wnt-Spezifität vermutlich eine größere Rolle zu als bisher angenommen.

Wie GSK3 $\beta$  im Kontext dieses Komplexes inaktiviert wird und auf welche Weise stromaufwärts gelegene Komponenten dies erreichen, ist derzeit nicht zweifelsfrei aufgeklärt. Das im Moment favorisierte Modell geht von einem Verdrängungsmechanismus aus. Sowohl Frat/GBP (Li et al., 1999a) als auch Dvl (Itoh et al., 2000) können zu einer Dissoziation von GSK3 $\beta$  aus dem Conductin/Axin-Komplex führen. Neben dem Verdrängungsmechanismus könnte aber auch die Hemmung der Kinase-Aktivität von GSK3 $\beta$  innerhalb des Conductin/Axin-Komplexes zur Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signals führen.

#### **1.4.2. Casein Kinase I**

Mitglieder der Casein Kinase I-Familie sind bereits zuvor in zahlreichen Aspekten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges impliziert worden. So können sowohl Axin (Rubinfeld et al., 2001; McKay et al., 2001) als auch Dvl (Peters et al., 1999) an CKI $\epsilon$  binden. Dabei konnte

CKIε eine Rolle als positiver Akteur unterhalb von Dvl und oberhalb von GSK3β zugewiesen werden (Peters et al., 1999; Sakanaka et al., 1999). So führt die Expression von CKIε in *Xenopus*-Embryonen zur Ausbildung einer verdoppelten Körperachse. Für diese Funktion ist die Kinase-Aktivität entscheidend, da die Expression einer Kinase-inaktiven Mutante von CKIε nicht zu einem solchen Phänotyp führt (Peters et al., 1999; Sakanaka et al., 1999). Interessanterweise blockiert eine solche, Kinase-inaktive CKIε-Mutante jedoch nicht die endogene Achsenbildung während der *Xenopus*-Entwicklung, was daraufhin deutet, dass diese positiven Funktionen von CKIε unterhalb von Dvl in diesem System nicht ausschlaggebend sind. Dies ist im Einklang mit Befunden, dass dominant-negatives Dvl ebenfalls die endogene Achsenbildung in *Xenopus* beeinflussen kann (Sokol, 1996; siehe auch Kapitel 1.5.2). Überexpression weiterer CKI-Isoformen im *Xenopus*-System konnten den Isoformen α, β und δ ebenfalls positive Funktionen im Wnt/β-Catenin-Signalweg zuweisen (McKay et al., 2001). Allerdings ist der Mechanismus der positiven CKI-Wirkung noch umstritten. So konnte gezeigt werden, dass CKIε zur Phosphorylierung von Dvl führen kann (Peters et al., 1999), jedoch ist unbekannt, wie dies zur Signalaktivierung durch Dvl beiträgt.

Neue Daten zeigen, dass Casein Kinase Iα (CKIα) den Serinrest 45 von β-Catenin phosphorylieren kann und dadurch den Abbau β-Catenins einleitet (Liu et al., 2002). In *Drosophila* konnte sowohl von CKIε als auch von CKIα gezeigt werden, dass sie ebenfalls β-Catenin (Armadillo) phosphorylieren und damit zu dessen Abbau führen (Yanagawa et al., 2002). Die Phosphorylierung β-Catenins an Serin 45 gleicht einer „priming“-Phosphorylierung und ist für die GSK3β-Aktivität essenziell (Liu et al., 2002). Die Position von Ser45 gegenüber dem ersten von GSK3β phosphoryliertem Rest, Thr41, entspricht der *n*+4-Regel für „priming“-Phosphate für GSK3β (siehe oben). Ausgehend von diesem „priming“-Phosphat kann GSK3β nun die Reste Threonin 41, Serin 37 und Serin 33 phosphorylieren. Die Phosphoserine 33 und 37 vermitteln dann die Interaktion mit β-TrCP (Yaron et al., 1998; Liu et al., 2002). Diese Erkenntnisse führen zu einem neuen Verständnis der GSK3β-vermittelten Phosphorylierung β-Catenins: im Gegensatz zu früheren Annahmen zeigt sich nun, dass auch an β-Catenin eine essenzielle „priming“-Phosphorylierung stattfindet. Darüber hinaus zeigen diese Befunde, dass CKI, entgegen früheren Daten (Peters et al., 1999; Sakanaka et al., 1999), auch eine negative Rolle im Wnt/β-Catenin-Signalweg zukommt. Darüber hinaus kann CKIε auch APC phosphorylieren und damit den APC-vermittelten β-Catenin-Abbau stimulieren, ein weiterer Hinweis auf eine negative Rolle von CKIε (Rubinfeld et al., 2001).

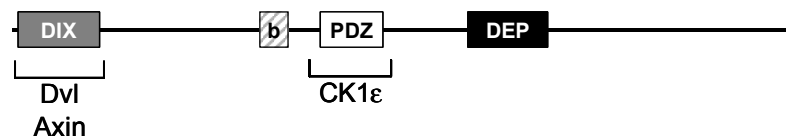


## 1.5. Die Inaktivierung des Conductin/Axin-Komplexes

Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signals bedeutet die Inaktivierung des Abbaukomplexes. Diese Aufgabe obliegt innerhalb der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade, unterhalb der Frizzled-Rezeptoren, dem Molekül Dishevelled. Zusätzlich ist mit Frat bzw. GBP ein weiteres Protein identifiziert worden, welches spezifisch GSK3 $\beta$  inhibieren und damit das  $\beta$ -Catenin-Signal aktivieren kann (Yost et al., 1998). Die molekularen Mechanismen, deren sich Dishevelled und/oder Frat zur Blockade des Komplexes bedienen, sind allerdings nur rudimentär aufgeklärt. Im folgenden werden die bisher bekannten Daten zusammengefasst.

### 1.5.1. Dishevelled

Durch genetische Studien in *Drosophila* wurde Dishevelled (Dsh) als erste intrazelluläre Relaisstation nach dem Rezeptor Frizzled des Wingless-Signalweges identifiziert (Noordermeer et al., 1994). In Säugern konnten 3 Dishevelled (hier als Dvl abgekürzt) Gene identifiziert werden (Sussman et al., 1994; Klingensmith et al., 1996; Tsang et al., 1996). Alle Dvl-Proteine verfügen über eine charakteristische Domänenstruktur: eine N-terminale DIX-Domäne (Dishevelled, Axin), einen basischen Bereich, eine zentrale PDZ-Domäne (Pou, Discs large, ZO1) und eine C-terminale DEP-Domäne (Dishevelled, Egl-10, Plekstrin). Diese Domänenstruktur ist in Abbildung 1-5 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1-5:** Schematische Übersicht von Dishevelled.

Dvl bildet den intrazellulären Verzweigungspunkt von Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Wnt/JNK-Signalen (Boutros et al., 1998; Li et al., 1999b). Die C-terminale DEP-Domäne ist für die Aktivierung des Wnt/JNK-Weges unerlässlich, für die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zweiges jedoch ohne Bedeutung (Axelrod et al., 1998). Im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg sorgt Dishevelled für die Blockade der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin. Die N-terminale DIX-Domäne und die zentrale PDZ-Domäne sind hierfür essenziell. Die DIX-Domäne vermittelt

Oligomerisierung von Dvl-Molekülen (Kishida et al., 1999; Rothbacher et al., 2000) und die Interaktion mit Axin (Kishida et al., 1999; Smalley et al., 1999). Letzterer Befund wird jedoch, wie bereits in Kapitel 1.3.1 erwähnt, kontrovers diskutiert. PDZ-Domänen dienen in einer Vielzahl von Proteinen als Interaktionsoberfläche. So sind auch im Falle von Dvl eine Reihe von Interaktionspartnern beschrieben worden, von denen hier nur CKI $\epsilon$  erwähnt sei (Peters et al., 1999). Im Lichte der neuen Erkenntnisse zur Funktion von CKI bei der Phosphorylierung  $\beta$ -Catenins könnte diese Interaktion von Dvl und CKI $\epsilon$  eine neue Interpretation erfahren (siehe Kapitel 1.4.2).

Unbeschadet davon ist der Mechanismus der Signalweiterleitung sowohl von Frizzled zu Dvl als auch von Dvl zu CKI $\epsilon$  und/oder GSK3 $\beta$  grundsätzlich noch unverstanden und Gegenstand intensiver Forschung.

### **1.5.2. Frat-1 / GBP**

Mit Frat-1/GBP ist ein sehr interessanter, positiver Regulator des Conductin/Axin-Komplexes und damit der  $\beta$ -Catenin-Stabilität identifiziert worden. GBP (GSK3 binding protein) wurde in *Xenopus* als GSK3 $\beta$  bindendes Protein isoliert (Yost et al., 1998). Unabhängig davon wurde das Säugerhomolog Frat-1 (Frequently rearranged in advanced T-cell-lymphomas), ähnlich wie Wnt-1, als kooperierendes Onkogen in retroviral induzierten T-Zell Lymphomen charakterisiert (Jonkers et al., 1997). In *Xenopus* und Zebrafisch existiert je nur ein GBP (Sumoy et al., 1999), in Säugern jedoch sind drei Frat-Gene bekannt (Frat-1-3, (Saitoh et al., 2001). In den Genomen der Invertebraten *Drosophila* und *C. elegans* findet sich anscheinend kein homologes Gen. Abbildung 1-6 zeigt einen Sequenzvergleich von Frat/GBP-Proteinen. Man kann drei konservierte Domänen erkennen, von denen die Domäne III die Interaktion mit GSK3 $\beta$  vermittelt. Alle drei Domänen zeigen keinerlei bekannte Struktur motive.

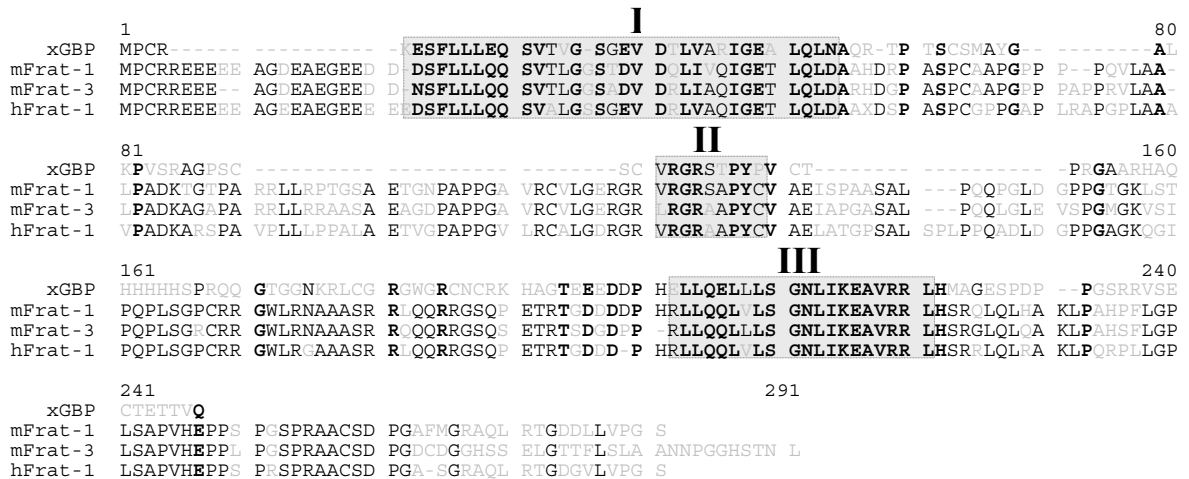


Abbildung 1-6: Sequenzvergleich von murinem und humanem Frat mit GBP aus *Xenopus laevis*

Konservierte Domänen sind schattiert

In *Xenopus* Embryonen führt ventrale Überexpression von GBP zur Bildung einer zusätzlichen Körperachse (Yost et al., 1998), was auf eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges hindeutet. Die Bindung von GBP/Frat-1 an GSK3 $\beta$  führt zur Inhibition der GSK3 $\beta$ -Kinaseaktivität. Ein Peptid, welches der GSK3 $\beta$ -Bindedomäne (Domäne III) von Frat-1 (Fratide) enthält, inhibiert in *in-vitro*-Kinaseexperimenten die GSK3 $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und Axin, nicht jedoch die von Glycogen Synthase und eIF2B (Thomas et al., 1999). Andere Studien konnten auch zeigen, dass Frat-1 die GSK3 $\beta$ -Aktivität gegenüber dem Mikrotubuli-bindenden Protein tau hemmt (Yost et al., 1998; Culbert et al., 2001). Frat/GBP verhindert zudem die Bindung von GSK3 $\beta$  an Axin und verdrängt GSK3 $\beta$  aus dem Conductin/Axin-Komplex (Li et al., 1999a; Thomas et al., 1999; Farr, III et al., 2000).

Inaktivierung der maternal bereitgestellten mRNA von GBP durch *antisense*-Oligonukleotide führt in der Embryonalentwicklung von *Xenopus* zum Verlust der endogenen Körperachse (Yost et al., 1998). Dieser Befund verleiht GBP innerhalb der Wnt-Kaskade eine besondere Stellung: GBP ist damit der im Wnt-Signalweg am höchsten angeordnete Faktor (oberhalb von GSK3 $\beta$ ), dessen Verlust die endogene Achsenbildung in *Xenopus* verhindert (Yost et al., 1998). Im Gegensatz zu GBP haben Versuche, die endogene Achse mit dominant-negativem Dvl oder Wnt zu blockieren, nicht zu dem erwarteten Ergebnis geführt (Sokol, 1996). Folglich ist es denkbar, dass GBP eine dorsale Determinante darstellt, die unabhängig von Wnt-Liganden  $\beta$ -Catenin stabilisieren und damit zur Achsenbildung beitragen kann. Eine solche dorsale Determinante ist bereits früher postuliert worden, und mit GBP ist dafür ein nahezu

idealer Kandidat identifiziert worden. Der definitive Beweis, dass es sich bei GBP um die dorsale Determinante handelt, steht allerdings noch aus. Ob Frat-1 in Säugern eine ähnliche Rolle zukommt ist momentan noch unbekannt, da der Verlust des Frat-1-Gens in der Maus keine phänotypischen Konsequenzen hat. Der Grund liegt in der überlappenden Expression von Frat-3, welches den Verlust von Frat-1 möglicherweise funktionell kompensieren kann (Jonkers et al., 1999).

Die Stellung von Frat-1 innerhalb des Wnt-Netzwerks ist umstritten. Biochemische Analysen konnten eine Interaktion von Frat-1 mit der PDZ-Domäne von Dvl zeigen (Li et al., 1999a). Dies führte zu der Vermutung, dass Frat-1 ein integraler Bestandteil der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion unterhalb von Dvl sein könnte: Dvl würde den GSK3 $\beta$ -Inhibitor an den Conductin/Axin-Komplex rekrutieren und so zur Stabilisierung  $\beta$ -Catenins führen. Allerdings ist die Interaktion von Dvl und Frat-1, ähnlich wie bei Axin, umstritten. Eigene Untersuchungen konnten unter normalen Stringenzbedingungen keine Interaktion nachweisen. Zudem deutet das Fehlen von Frat-homologen Genen in Invertebraten daraufhin, dass Dvl die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin auch auf andere Art und Weise blockieren kann. Frat-1 könnte somit auch einen alternativen, Vertebraten-spezifischen Mechanismus zur  $\beta$ -Catenin-Aktivierung darstellen.

## **1.6. Zielsetzung**

Obwohl die generelle Abfolge der Ereignisse im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg vor allem genetisch recht gut dokumentiert ist, fällt die biochemische Detailanalyse weit zurück. Insbesondere die Inaktivierung von GSK3 $\beta$  innerhalb des Conductin/Axin-Komplexes ist noch weitgehend unverstanden. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, neue Möglichkeiten der Regulation des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes zu identifizieren. Dazu musste zunächst ein zelluläres Testsystem der Conductin-Funktion auf Basis eines synthetischen Wnt-Zielgens etabliert werden. Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems wurden dann neue Bindungspartner von Conductin identifiziert und charakterisiert. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei der Conductin-gebundenen GSK3 $\beta$  als einem Schlüsselenzym der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade. Im weiteren sollte der Einfluss von Diversin auf die Conductin-gebundene GSK3 $\beta$  untersucht werden, da aufgrund überlappender Bindestellen von Diversin und GSK3 $\beta$  an Conductin hier ein wichtiger Regulationsmechanismus vermutet werden konnte.