

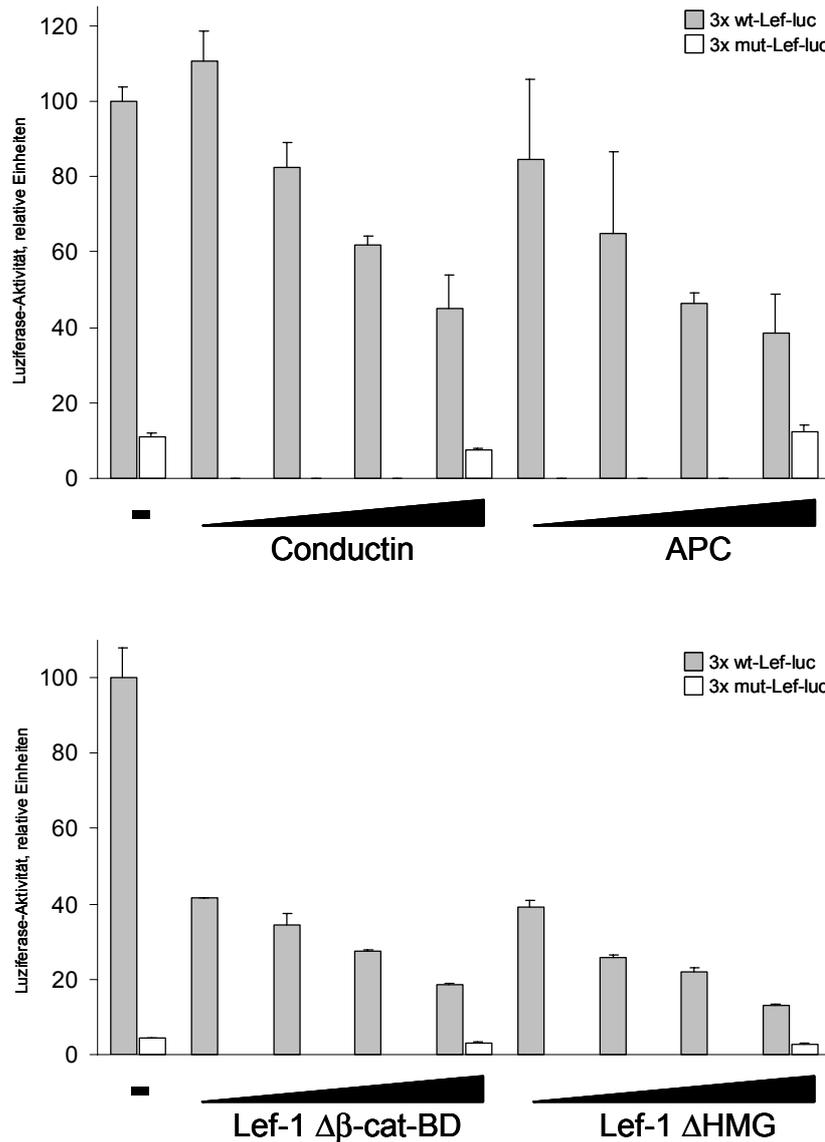
## 2. Ergebnisse

### 2.1. *Conductin*

#### 2.1.1. *Conductin* reprimiert die $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription

Zur Etablierung eines zellulären Testsystems wurde die Fähigkeit des neu identifizierten *Conductin* zur Inaktivierung eines Lef/ $\beta$ -Catenin-abhängigen Reportergenkonstruktes bestimmt. In SW480 Kolonkarzinomzellen ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aufgrund der Mutation des *apc*-Gens konstitutiv aktiv, so dass ein Lef/ $\beta$ -Catenin-abhängiges Reportergenkonstrukt (3x wt-Lef/TCF-luc) in diesen Zellen stark exprimiert wird. Ein Reportergen mit mutierten Lef/Tcf-Bindestellen (3x mut-Lef/TCF-luc) bleibt dagegen inaktiv.

Die initiale Beobachtung, dass *Conductin* in der Lage ist, den Abbau von cytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin zu stimulieren, findet seine Entsprechung in der Messung der Aktivität dieses  $\beta$ -Catenin-abhängigen Reportergens. SW480 Zellen wurden transient mit aufsteigenden Mengen von *Conductin* Expressionsplasmid transfiziert. *Conductin* reprimiert die Reporteraktivität dosisabhängig, ebenso wie zur Kontrolle eingesetztes humanes APC und zwei dominant-negative Formen von murinem Lef-1. Diesen Lef-1-Mutanten sind entweder die  $\beta$ -Catenin-Bindestelle oder die DNA-Bindedomäne (HMG-Box) deletiert. Die Aktivität des Kontrollreporters 3x mut-Lef/TCF-luc bleibt unbeeinflusst (Abbildung 2-1). Dieses deckt sich mit Befunden aus Immunfluoreszenzstudien, welche zeigen, dass angereichertes zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin durch Überexpression von *Conductin* effizient abgebaut werden kann (Behrens et al., 1998).

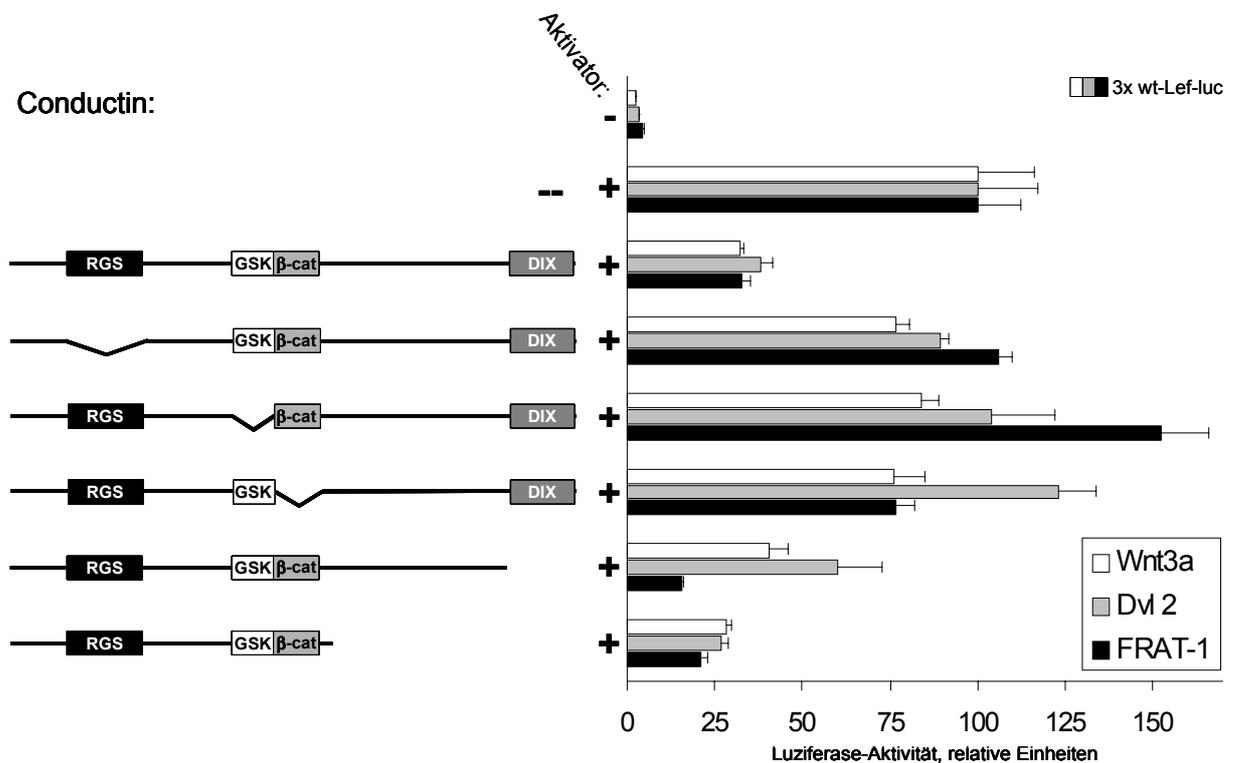


**Abbildung 2-1:** Conductin reprimiert das  $\beta$ -Catenin-abhängige Reporterkonstrukt in SW480 Kolonkarzinomzellen. SW480 Zellen wurden mit aufsteigenden Mengen Expressionsplasmid der jeweiligen Moleküle transfiziert (0,5;1;2;5 $\mu$ g). Die Luziferaseaktivität ist auf den Kontrollwert (Leervektor) abgeglichen.

### 2.1.2. Funktionelle Charakterisierung der Domänenstruktur von Conductin

Um den Einfluss der einzelnen Domänen von Conductin auf dessen Fähigkeit zur Abschaltung des Wnt-Signals zu untersuchen, wurde eine Reihe von Deletionsmutanten getestet. Die Reporteraktivität wurde dazu mit verschiedenen positiven Komponenten des Wnt-Signalweges stimuliert. Als Zellsystem dienten HEK293 Zellen (humane embryonale Nierenepithelzellen). Überexpression des Liganden Wnt3a, des Signalmoleküls Dishevelled 2

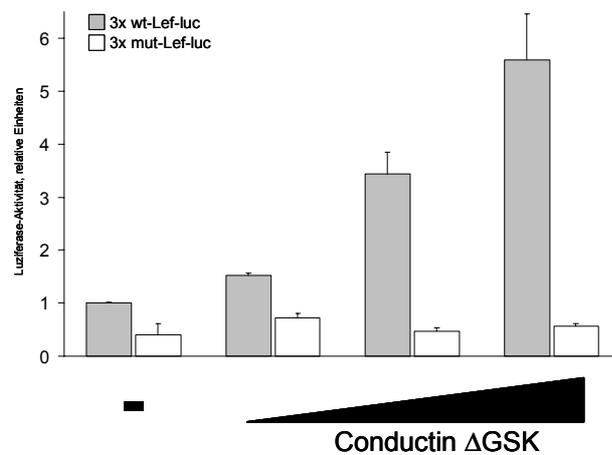
(Dvl2) oder des GSK3 $\beta$ -bindenden Proteins Frat-1 führt zu einer starken Aktivierung des Reporters (Abbildung 2-2). Expression von vollständigem Conductin inhibiert in allen drei Fällen die Reporter-Expression. Ebenso führt carboxyterminal deletiertes Conductin (Conductin N und Conductin  $\Delta$ DIX) zu einer reduzierten Reporteraktivität. Dagegen sind die RGS-Domäne und die GSK3 $\beta$ - bzw.  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomänen für die Funktion Conductins in diesem System unverzichtbar. Deletionsanalysen mit Axin decken sich mit den hier beschriebenen Ergebnissen (Fagotto et al., 1999; Hedgepeth et al., 1999).



**Abbildung 2-2:** Funktionelle Analyse der Domänenstruktur von Conductin in HEK293 Zellen. Weiße Balken: Stimulation mit Wnt3a (1 $\mu$ g), graue Balken: Stimulation mit Dvl2 (1,5 $\mu$ g), schwarze Balken: Stimulation mit Frat-1 (1,5 $\mu$ g). Es wurden jeweils 0,1 $\mu$ g der entsprechenden Conductin-Expressionsplasmide transfiziert. Die Luciferaseaktivitäten sind auf die Kontrollwerte (Aktivator + Leervektor) abgeglichen

Die aminoterminal Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin wird im Degradationskomplex durch GSK3 $\beta$  gewährleistet. Da Conductin bzw. Axin das einzige Molekül in diesem Komplex ist, welches GSK3 $\beta$  binden kann, so sollte eine Conductin-Mutante ohne die GSK3 $\beta$ -Bindestelle (Conductin  $\Delta$ GSK) sich in höheren Dosen dominant-negativ verhalten. Eine solche Mutante

verdrängt endogenes, wildtypisches Conductin aus dem Komplex, ohne jedoch die Voraussetzung für die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bereitzustellen. Wie in Abbildung 2-3 dargestellt, führt die Expression aufsteigender Mengen von Conductin  $\Delta$ GSK zu einer dosisabhängigen Aktivierung des synthetischen Wnt-Zielgens. Man beachte, dass in Abbildung 2-3 wesentlich größere Mengen von Conductin-Expressionsplasmid als in Abbildung 2-2 transfiziert worden sind (1-6 $\mu$ g in Abbildung 2-3 gegenüber 0,1 $\mu$ g in Abbildung 2-2). Daher ist in dem Experiment von Abbildung 2-2 dieser dominant-positive Effekt nicht ersichtlich.



**Abbildung 2-3:** Conductin $\Delta$ GSK verhält sich dominant-positiv in HEK293 Zellen. Es wurden 1-6 $\mu$ g Conductin $\Delta$ GSK-Expressionsplasmid transfiziert. Die Luziferaseaktivität ist auf den Kontrollwert (Leervektor) abgeglichen.

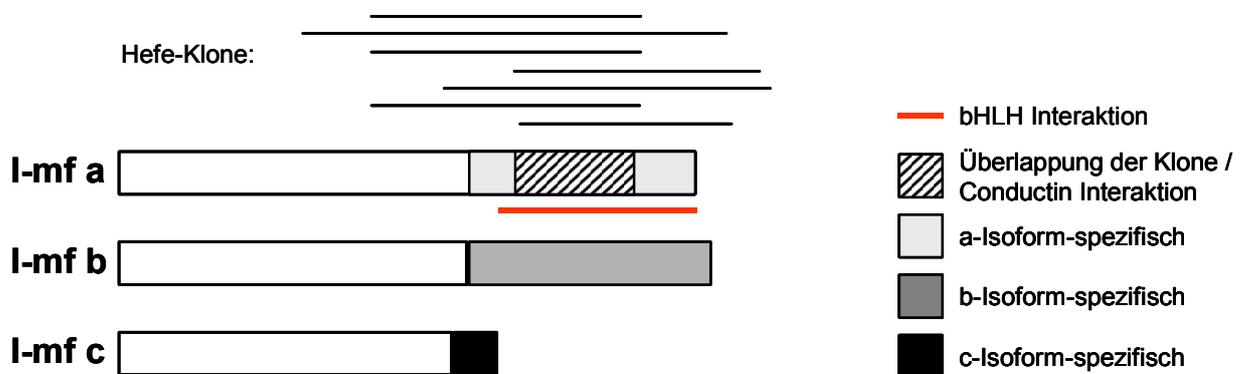
## 2.2. Interaktionspartner von Conductin: I-mf

Ziel der Arbeit ist ein detaillierteres Verständnis der Regulation der Conductin-Funktion im Hinblick auf die am Komplex gebundene GSK3 $\beta$ . Daher wurde mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems nach neuen Interaktionspartnern von Conductin gesucht, um neue Regulatoren zu identifizieren.

Als Köder wurde ein Fusionsprodukt aus der bakteriellen *lexA*-DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne und dem vollständigen Conductin eingesetzt. Im „Screen“-Experiment wurde eine aus E10,5 Mausembryonen hergestellte cDNA-Bibliothek verwendet. Es wurden in drei unabhängigen Screen-Experimenten  $3,5 \times 10^8$  Bibliotheksklone durchsucht und dabei 80 bis 100 positive Klone pro Screen durch Sequenzierung analysiert.

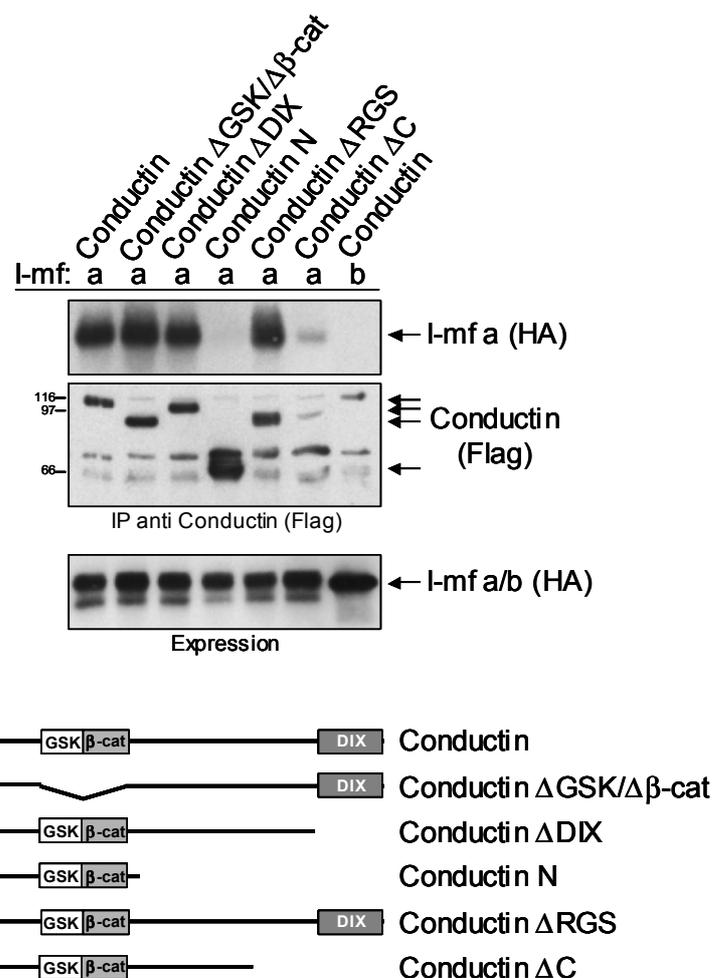
### 2.2.1. Analyse der I-mf a-Bindung an Conductin

Neben bereits bekannten Bindungspartnern wurde das zytoplasmatische Protein I-mf (Chen et al., 1996) („Inhibitor of MyoD family“) als Interaktionspartner von Conductin im Hefe-„Screen“ identifiziert. I-mf-kodierende Sequenzen wurden in drei Screens bis zu 22 mal in 7 unabhängigen Klonen gefunden. I-mf wurde als Interaktionspartner der muskelspezifischen bHLH-Transkriptionsfaktoren der MyoD-Familie charakterisiert. Bindung von I-mf an MyoD-Faktoren blockiert deren Transport in den Zellkern. *In vitro* Experimente zeigten zudem, dass I-mf die DNA-Bindung von MyoD und Myf-5 negativ beeinflusst. Von I-mf sind 3 Isoformen bekannt, genannt a,b und c. Abbildung 2-4 zeigt schematisch die Struktur der I-mf Isoformen und die Verteilung der gefundenen Klone. Sämtliche Klone decken Bereiche des Isoform a-spezifischen Carboxyterminus ab.



**Abbildung 2-4:** Schematische Übersicht über die I-mf-Isoformen. Die Positionen der im Hefe-2-Hybrid-Screen gefundenen I-mf a-Fragmente sind durch Balken gekennzeichnet.

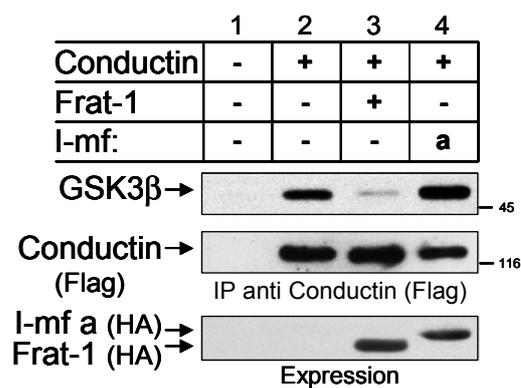
Die Interaktion zwischen Conductin und I-mf wurde neben dem Hefe-2-Hybrid System auch in Koimmunpräzipitationsexperimenten untersucht. Für die Koimmunpräzipitationsanalyse wurden murine Neuroblastomzellen (Zelllinie Neuro2A) mit HA-Epitop-markierten I-mf- und Flag-Epitop-markierten Conductin-Expressionsplasmiden transfiziert. Flag-markiertes Conductin wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Flag-Markierung präzipitiert. Diese Immunkomplexe wurden nach Auftrennung im Polyacrylamidgel auf das Vorhandensein von HA-markiertem I-mf untersucht. Abbildung 2-5 fasst die Ergebnisse dieser Versuche zusammen. Conductin interagiert spezifisch nur mit I-mf a und nicht mit I-mf b. Auf Seiten Conductins sind die Sequenzen unmittelbar carboxyterminal zur  $\beta$ -Catenin-Bindedomäne für die Interaktion verantwortlich. Zusammengefasst deuten die Daten daraufhin, dass der Bereich zwischen den Aminosäuren 465-603 von Conductin mit dem für die a-Isoform spezifischen Carboxyende von I-mf interagieren.



**Abbildung 2-5:** Koimmunpräzipitation von I-mf mit Conductin in murinen Neuro2A Zellen.

### 2.2.2. Einfluss von I-mf a auf die Conductin-gebundene GSK3 $\beta$

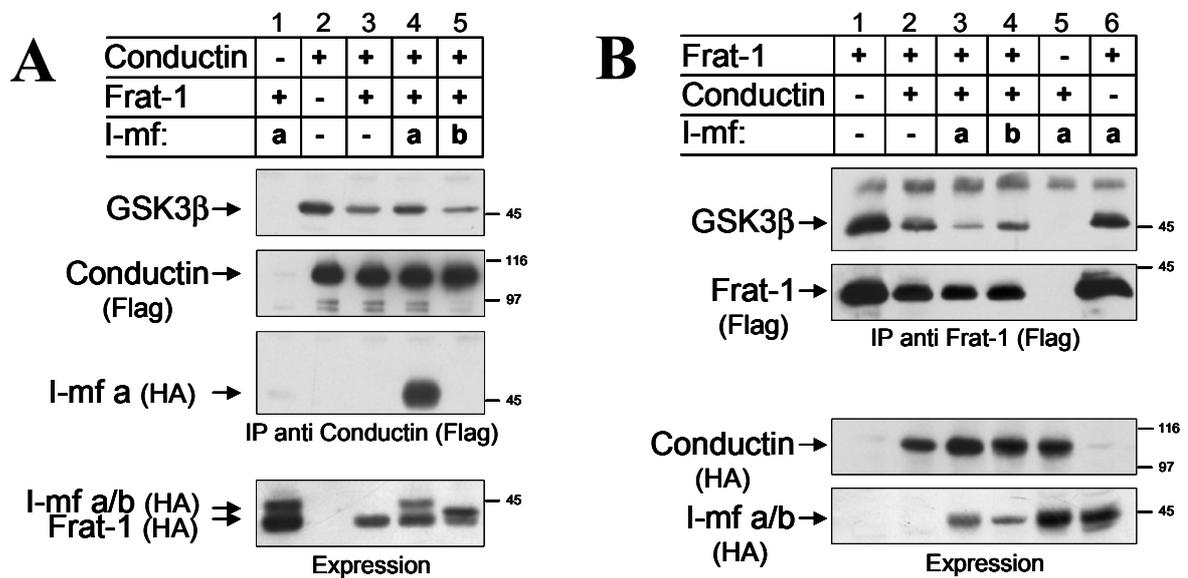
Weiterhin wurde untersucht, ob I-mf a die Menge an Conductin-assoziiierter GSK3 $\beta$  verändern kann. Dazu wurde endogene GSK3 $\beta$  mit Conductin kopräzipitiert und der Einfluss von I-mf a auf die Menge an kopräzipitierter GSK3 $\beta$  untersucht. Wie in Abbildung 2-6 dargestellt, kann Conductin endogene GSK3 $\beta$  aus murinen Neuroblastomzellen kopräzipitieren. I-mf a ist nicht in der Lage, die Menge von Conductin-gebundener GSK3 $\beta$  zu beeinflussen. Als Positivkontrolle dient in diesem Experiment das GSK3 $\beta$ -bindende Protein Frat-1. Für Axin konnte gezeigt werden, dass Frat-1 GSK3 $\beta$  aus dem  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex verdrängt (Li et al., 1999a; Farr, III et al., 2000). Wie hier gezeigt trifft dies auch für Conductin zu. In Anwesenheit von Frat-1 ist die mit Conductin kopräzipitierbare Menge von GSK3 $\beta$  signifikant kleiner als in Abwesenheit von Frat-1.



**Abbildung 2-6:** Analyse des Einflusses von I-mf a und Frat-1 auf Conductin-gebundene GSK3 $\beta$  in Neuro2A Zellen.

Als nächstes wurde untersucht, ob I-mf a möglicherweise im Zusammenspiel mit Frat-1 die Conductin-gebundene GSK3 $\beta$  beeinflussen kann. Dazu wurden wiederum Conductin-Immunkomplexe auf ihren GSK3 $\beta$ -Gehalt untersucht. Wie in Abbildung 2-7A dargestellt, verringert Koexpression von Frat-1 die GSK3 $\beta$ -Menge. Expression von I-mf a, nicht jedoch von I-mf b, kann diesen Effekt revertieren (Abbildung 2-7A: vgl. Spur 3 und 4). Im umgekehrten Experiment kann dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. Zunächst kann eine gewisse Menge an endogener GSK3 $\beta$  mit Frat-1 kopräzipitiert werden (Abbildung 2-7B, Spur 1). Koexpression von Conductin verringert wie erwartet diese Menge (Spur 2). Die Anwesenheit von I-mf a führt zu einer weiteren Abnahme von GSK3 $\beta$  in Frat-1-Immunkomplexen, nicht jedoch die von I-mf b (Spur 3 + 4). In Spur 6 wird deutlich, dass I-mf a alleine nicht in

der Lage ist, Frat-1-gebundene GSK3 $\beta$  zu verdrängen. Zusammengenommen deuten diese Daten daraufhin, dass I-mf a den Verbleib von GSK3 $\beta$  im  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex begünstigt und das Herauslösen der GSK3 $\beta$  durch Frat-1 behindert.



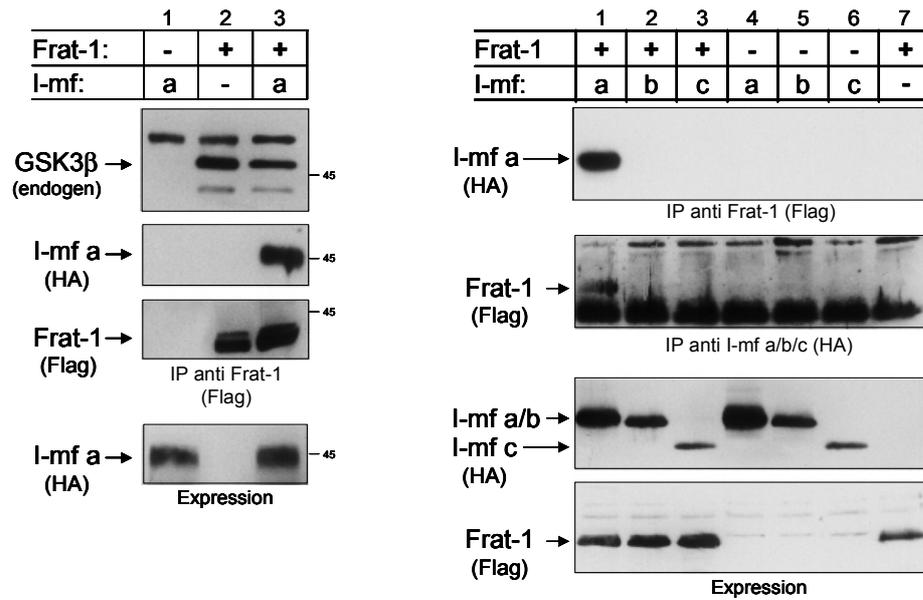
**Abbildung 2-7:** Modulation der Verteilung von GSK3 $\beta$  zwischen Conductin und Frat-1 durch I-mf.

**A:** Immunpräzipitation gegen Conductin (mAb CG7),

**B:** Immunpräzipitation gegen Frat-1 (mAb M2  $\alpha$ Flag).

### 2.2.3. Weitere Interaktionspartner von I-mf a

Zur Aufklärung des möglichen Mechanismus dieser Modulation der Frat-1-vermittelten Verdrängung von GSK3 $\beta$  durch I-mf a wurde untersucht, ob I-mf möglicherweise auch mit Frat-1 interagiert. Dazu wurde eine Koimmunpräzipitationsanalyse in murinen Neuroblastomzellen durchgeführt. Dabei wurde sowohl Flag-markiertes Frat-1 als auch HA-markiertes I-mf mit den jeweiligen Antikörpern präzipitiert. Wie in Abbildung 2-8 gezeigt, können sowohl I-mf a als auch GSK3 $\beta$  mit Frat-1 kopräzipitieren. Frat-1 interagiert, wie auch Conductin, spezifisch mit der a-Isoform von I-mf und nicht mit den b- und c-Isoformen.



**Abbildung 2-8:** Koimmunpräzipitation von GSK3β und I-mf a mit Frat-1. Spezifitätsanalyse der Interaktion mit I-mf-Isoformen in Neuro2A Zellen.

Die Interaktion konnte auch im Hefe-2-Hybrid-System nachvollzogen werden, was auf eine direkte Bindung von Frat-1 an I-mf a hindeutet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-9 zusammengefasst. Auf Seiten von Frat-1 ist die konservierte Domäne III, welche auch die GSK3β-Interaktion vermittelt, für die Bindung an I-mf a notwendig. C-terminale Deletionsmutanten von Frat-1 können nicht mehr an I-mf binden. Als Kontrolle dient GSK3β.

	VP16	Frat-1
I-mf a	-	+
I-mf b	-	-
I-mf c	-	-
GSK3β	-	++

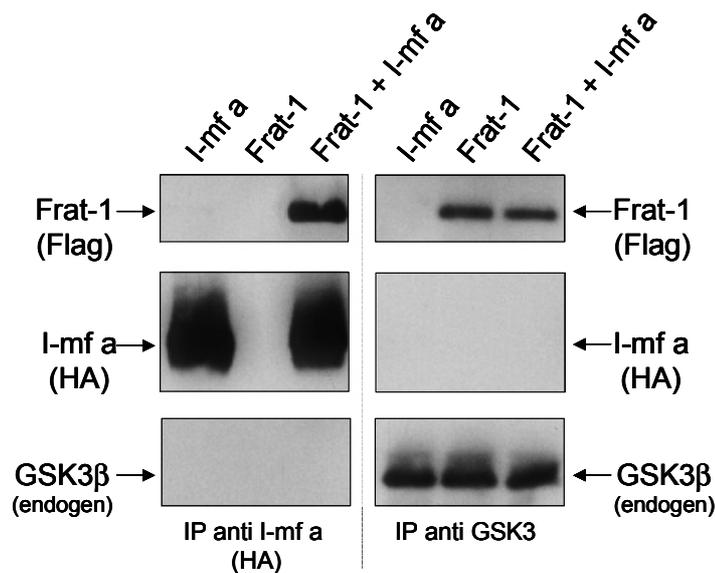
  

	VP16	I-mf a C	I-mf a	GSK3β
Frat-1	-	+	+	++
Frat-1 N	-	-	-	-
Frat-1 C	-	++	++	++

**Abbildung 2-9:** Analyse der I-mf/Frat-1-Interaktion im Hefe-2-Hybrid System.

- : 0-30 Miller-Einheiten β-Galaktosidase-Aktivität; + : 30-200 Miller-Einheiten β-Galaktosidase-Aktivität; ++: >200 Miller-units β-Galaktosidase-Aktivität.

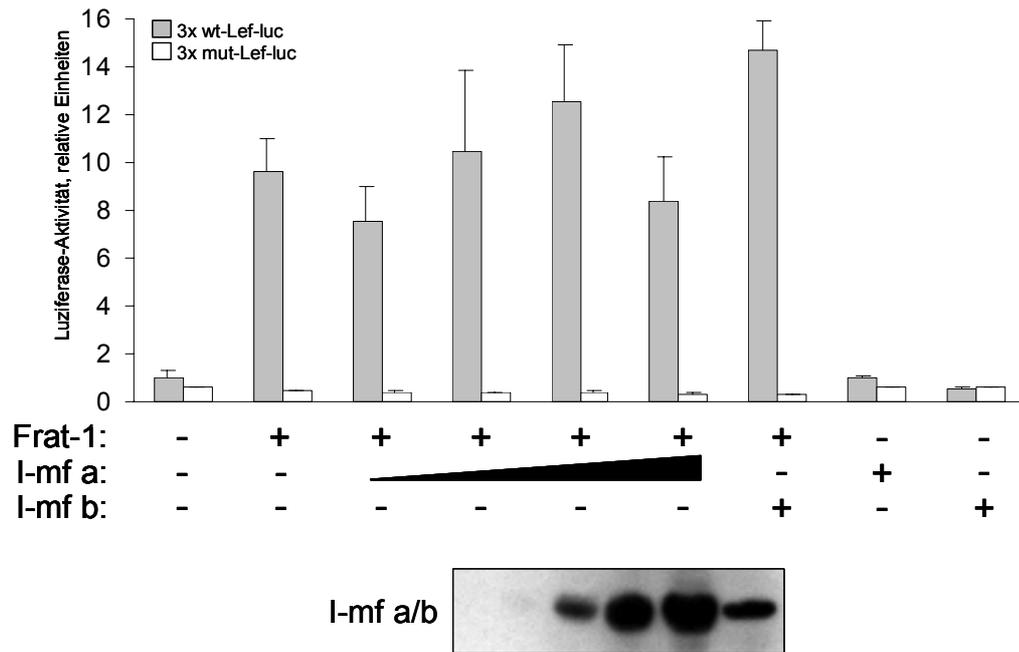
Da GSK3 $\beta$  und I-mf a die gleiche Bindestelle in Frat-1 belegen, wurde untersucht, ob beide Moleküle gleichzeitig an Frat-1 binden können. Ist dies der Fall, so sollte Frat-1 als Brücke zwischen I-mf a und GSK3 $\beta$  fungieren und entsprechende Tripelkomplexe nachweisbar sein. Wie in Abbildung 2-10 zu sehen, kann weder I-mf a mit GSK3 $\beta$  noch umgekehrt GSK3 $\beta$  mit I-mf a kopräzipitieren, unabhängig davon, ob Frat-1 exprimiert wird oder nicht. Dieses Ergebnis deutet auf eine jeweils exklusive Bindung an Frat-1 hin.



**Abbildung 2-10:** Analyse zur möglichen Tripelkomplexbildung aus Frat-1, GSK3 $\beta$  und I-mf a in Neuro2A Zellen

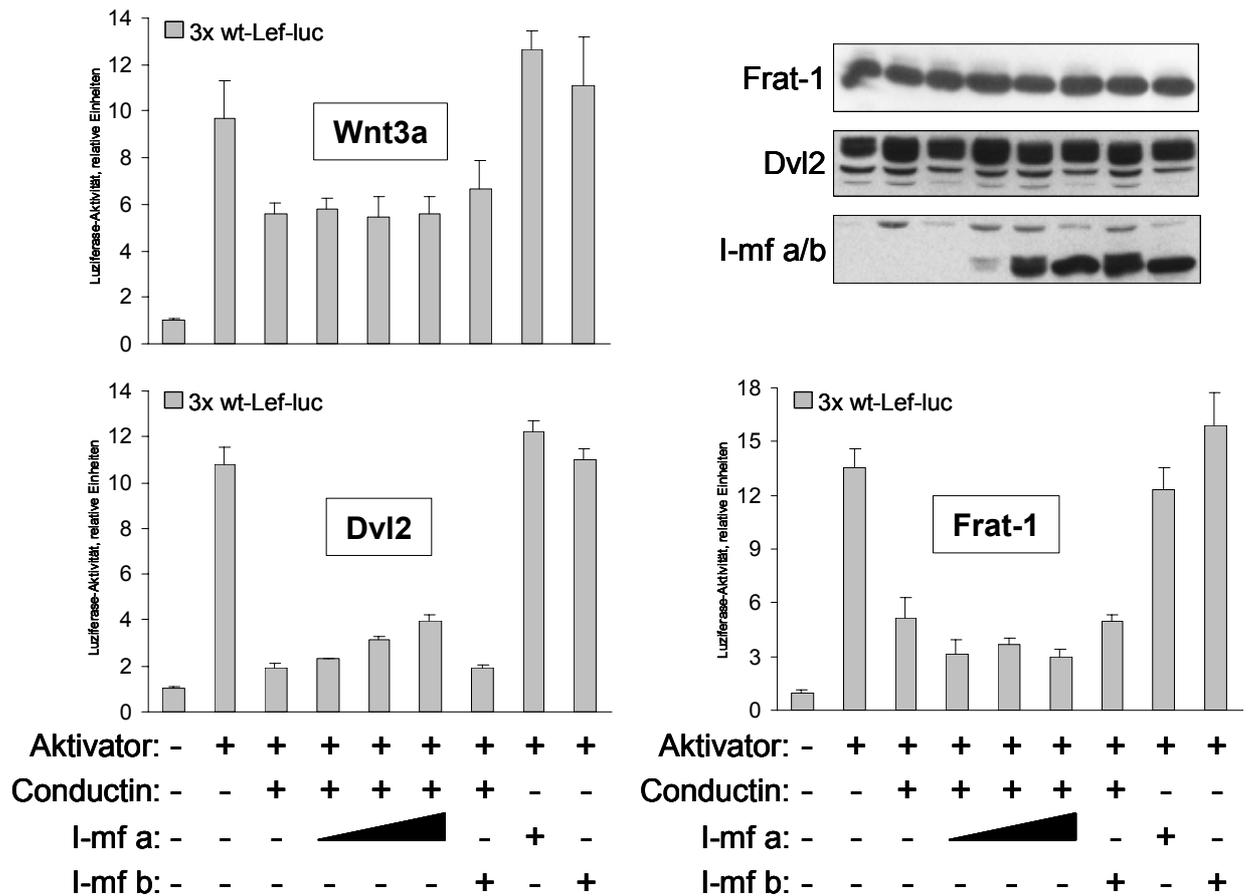
#### 2.2.4. Funktionelle Charakterisierung

Um den möglichen Einfluss von I-mf auf die Funktion Conductins und Frat-1 zu analysieren, wurde der Einfluss von I-mf a auf die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Transkriptionsaktivierung untersucht. Zunächst wurden aufsteigende Mengen von I-mf a zusammen mit konstanten Mengen von Frat-1 in HEK293 Zellen exprimiert. Interessanterweise ist I-mf nicht in der Lage, die Frat-1-vermittelte Aktivierung des Wnt-Reporters zu beeinflussen, wie in Abbildung 2-11 dargestellt. Dieses deckt sich mit der Tatsache, dass trotz überlappender Bindestellen I-mf die Menge von an Frat-1 gebundener GSK3 $\beta$  nicht modulieren kann (siehe Abbildung 2-7B, Spur 6).



**Abbildung 2-11:** Einfluss von I-mf auf Frat-1-vermittelte Reporteraktivierung in HEK293 Zellen. Aufsteigende Mengen von I-mf sind durch Western Blot verifiziert.

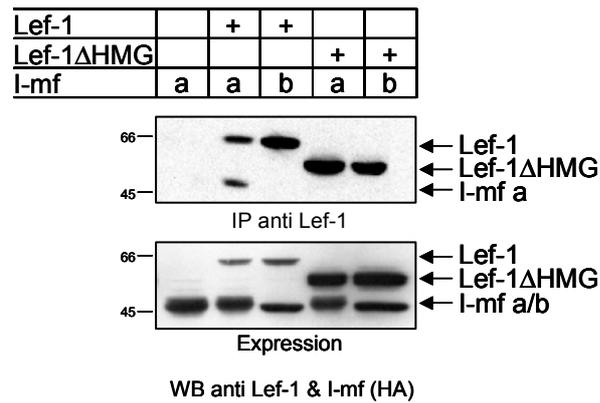
Weiterhin wurde der Einfluss von I-mf a auf die Funktion Conductins untersucht. Dazu wurde Conductin-Expressionsplasmid zusammen mit den Aktivatoren Wnt3a, Dvl2 und Frat-1 in HEK293 Zellen transfiziert und die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Reporteraktivierung gemessen. Die Expression aufsteigender Mengen von I-mf hat kaum einen Einfluss auf die reprimierende Aktivität von Conductin im Reporter-Experiment (Abbildung 2-12). Dies deckt sich mit dem Befund, dass I-mf a nicht in der Lage ist, die an Conductin gebundene GSK3 $\beta$  zu verdrängen. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die Region Conductins, in der die Bindestelle von I-mf a liegt, für dessen Funktion nicht von entscheidender Bedeutung (vgl. Abbildung 2-5). Man könnte aufgrund der vorangegangenen Befunde allerdings erwarten, dass I-mf a die Reprimierung der Frat-1 Aktivierung durch Conductin steigert, indem es den kompetitiven Angriff von Frat-1 auf die Conductin-gebundene GSK3 $\beta$  behindert. Im Reporter-Experiment konnte dieses jedoch nicht beobachtet werden.



**Abbildung 2-12:** Funktionelle Analyse der Conductin-I-mf-Interaktion im Reporter-Experiment in HEK293

Zellen. Expressionslevel der beteiligten Moleküle wurde durch Western Blot verifiziert. Wnt3a wird sezeniert und ist daher im Zelllysate kaum nachweisbar.

Im Laufe dieser Untersuchungen wurde von L. Snider und Kollegen gezeigt, dass I-mf im Krallenfrosch *Xenopus laevis* in der Lage ist, Xtcf-3 zu binden und dessen DNA-Bindung zu verhindern und damit Wnt-Signale zu blockieren (Snider et al., 2001). In dem hier verwendeten Säugerzellensystem konnte letztere Beobachtung nicht gemacht werden. Zusätzlich lokalisiert I-mf ausschließlich im Zytoplasma, was gegen eine Interaktion von I-mf mit nukleären Transkriptionsfaktoren der Lef/TCF-Familie spricht. Allerdings konnte kürzlich im *Xenopus*-System gezeigt werden, dass dort eine erhebliche Teilmenge des zellulären Xtcf-3-Vorrats zytoplasmatisch vorliegt (Lee et al., 2001). Zur Klärung, ob ein ähnlicher Mechanismus wie von Snider et al. beschrieben auch in Säugerzellen aktiv sein könnte, wurde eine Koimmunpräzipitation mit einem polyklonalen Lef-1-Serum durchgeführt (Abbildung 2-13).



**Abbildung 2-13:** Interaktion von I-mf mit murinem Lef-1 in Neuro2A Zellen. Für die Immunpräzipitation wurde ein polyklonales Lef-Serum verwendet.

In der Tat kann I-mf a auch in unserem Zellsystem (murine Neuro2A-Zellen) mit Lef-1 interagieren. Die Bindung ist, wie für Xtcf-3 beschrieben, von der HMG-Domäne von Lef-1 abhängig.

## 2.3. Interaktionspartner von Conductin: Diversin

Ein weiterer Interaktionspartner von Conductin ist Diversin. Diversin wurde von Thomas Schwarz-Romond in unserem Labor mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid Screens identifiziert (Schwarz-Romond, Asbrand et al., 2002). Diversin kodiert für ein zytoplasmatisches Protein von 712 Aminosäuren. Abbildung 2-14 gibt einen Überblick der Struktur Diversins. Die aminoterminalen 280 Aminosäuren bilden eine Domäne von 8 Ankyrin-Repeats. Im restlichen Teil des Proteins sind keine weiteren bekannten Struktur motive oder Domänen erkennbar. Diversin bindet mit seinem äußersten Carboxyende an Conductin. Für die mittlere Region Diversin konnte eine Interaktion mit Casein Kinase I $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) gezeigt werden. Conductin bindet mittels seiner GSK3 $\beta$ -Bindedomäne an Diversin (Schwarz-Romond et al., 2002).



**Abbildung 2-14:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Diversin (BD = Bindungsdomäne)

### 2.3.1. Frat-1 und Diversin synergieren bei der Aktivierung von $\beta$ -Catenin

Aufgrund der identischen Bindestellen von GSK3 $\beta$  und Diversin an Conductin liegt die Vermutung nahe, dass Diversin durch Blockade der GSK3 $\beta$ -Bindung die Conductin-Funktion negativ beeinflussen könnte. Daraus ergibt sich wiederum die Vermutung, dass positive Komponenten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, welche die am Axin/Conductin-Komplex gebundene GSK3 $\beta$  direkt beeinflussen, mit Diversin kooperieren könnten. Mit Frat-1 steht zur Überprüfung dieser Hypothese ein ideales Werkzeug zur Verfügung.

Im Experiment wird der Wnt-Reporter von Diversin allein nicht beeinflusst, murines Frat-1 dagegen stimuliert etwa 12-fach. Koexpression beider Faktoren führt jedoch zu einer dramatischen Erhöhung der Reporteraktivität bis zum ca. 35-fachen der Basalrate (Abbildung 2-15). Dies entspricht einer etwa 3-fachen Steigerung der Frat-1-vermittelten Aktivität.

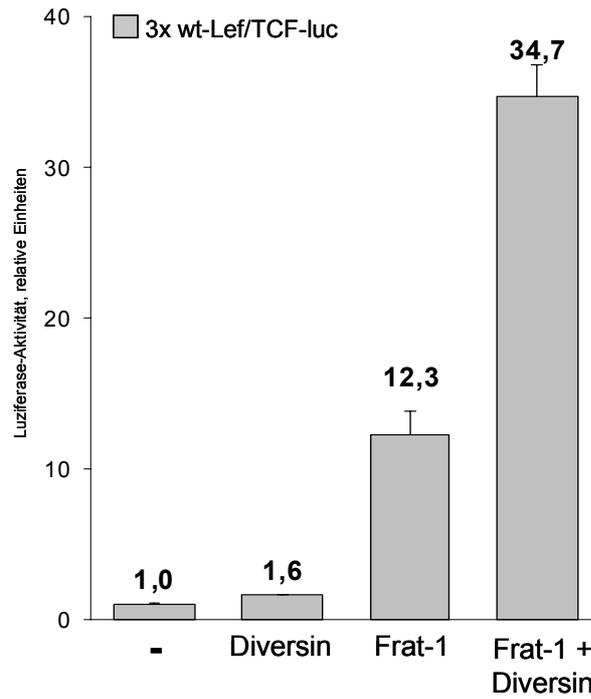


Abbildung 2-15: Kombinierte Aktivität von Diversin und Frat-1 im Reporter-Experiment in HEK293 Zellen

In der Deletionsanalyse von Diversin erweist sich dessen Conductin-Bindedomäne als notwendig und ausreichend für die Vermittlung der Synergie mit Frat-1 (Abbildung 2-16).

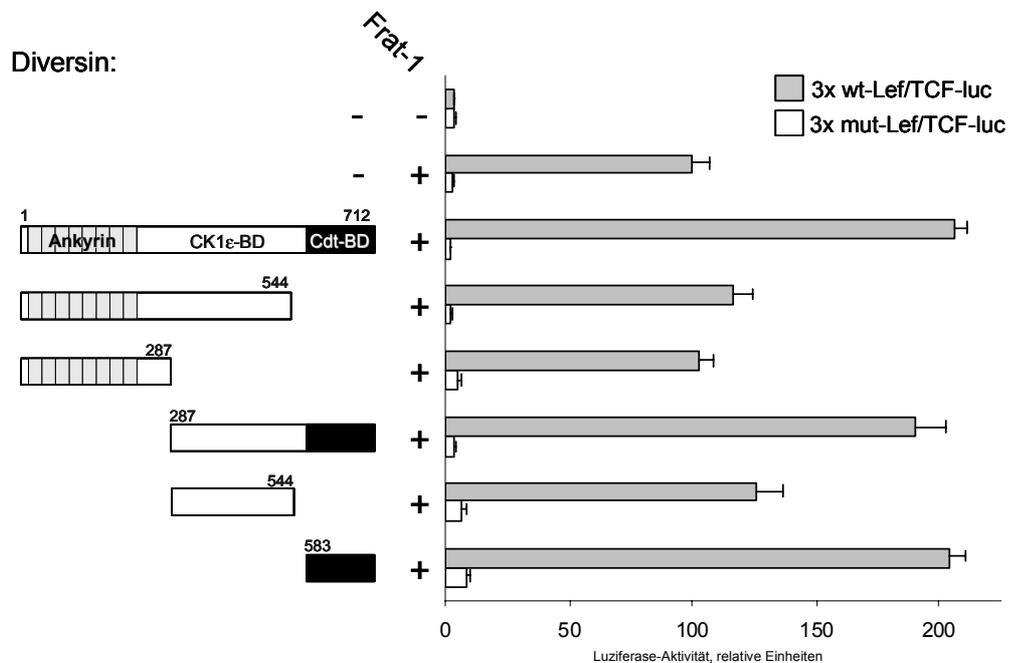
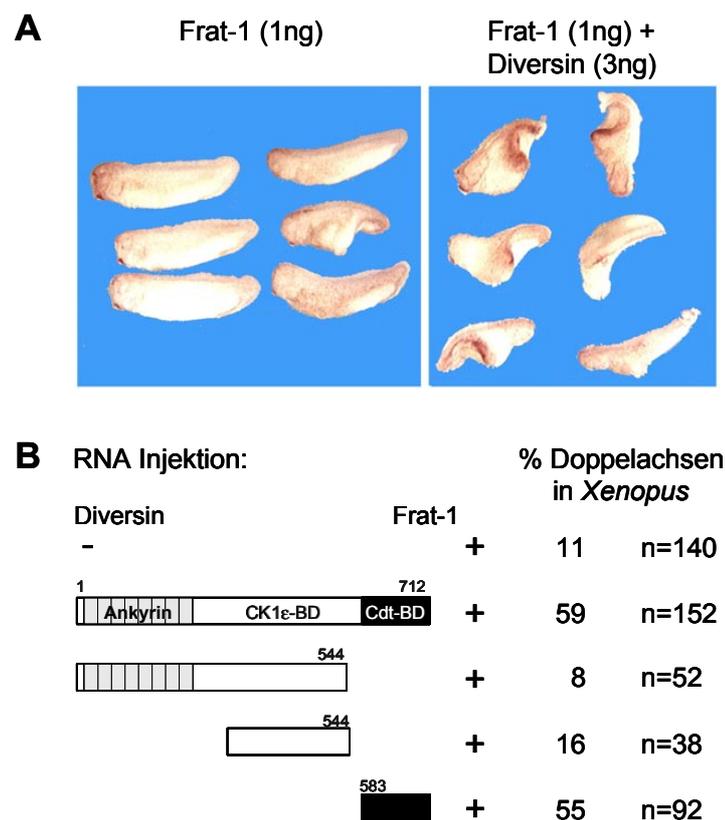


Abbildung 2-16: Deletionskartierung der Synergiefunktion Diversins im Reporter-Experiment in HEK293 Zellen

Die in Säugerzellen gewonnenen Befunde wurden im Krallenfrosch *Xenopus laevis* überprüft. Diese Experimente wurden freundlicherweise mit Hilfe von Dr. Michael Kühl (Göttingen/Ulm) durchgeführt. Die Expression von Wnt/ $\beta$ -Catenin-Agonisten während der frühen Embryonalentwicklung führt in diesem System zu einer Verdoppelung der primären Körperachse. Für Frat-1 und sein *Xenopus*-Homolog GBP konnte diese Aktivität bereits nachgewiesen werden (Yost et al., 1998). Zur Überprüfung der Synergie von Diversin und Frat-1 wurden zunächst suboptimale Dosen (1ng) von synthetischer Frat-1-RNA in die beiden ventralen Blastomeren von vierzelligen *Xenopus*-Embryonen injiziert. Dies führte bei 11% der injizierten Embryonen zur Ausbildung einer zweiten Körperachse. Ko-Injektion von Diversin RNA führte bei 59% der Embryonen zu einer Doppelachse (Abbildung 2-17). Wie auch in Säugerzellen ist für diesen Effekt die Conductin-Bindedomäne Diversins notwendig und ausreichend (Abbildung 2-17B).



**Abbildung 2-17:** Frat-1 und Diversin synergieren bei der Induktion von Doppelachsen in *Xenopus*.

**A:** Repräsentative Embryonen. Man beachte die suboptimale Dosis von Frat-1-RNA.

**B:** Quantifizierung und Deletionskartierung im *Xenopus*-Doppelachsen-Experiment.

### 2.3.2. Einengung der Diversin-Bindestelle an Conductin

Der einfachste denkbare Mechanismus der beobachteten Kooperation zwischen Frat-1 und Diversin wäre eine Steigerung der Verdrängung von GSK3 $\beta$  aus dem Conductin-Komplex durch Diversin. Zur Klärung dieser Möglichkeit wurde zunächst eine detaillierte Analyse der an der Diversin-Bindung beteiligten Regionen von Conductin durchgeführt. Es wurde untersucht, ob die GSK3 $\beta$ - und Diversin-Bindestellen an Conductin zu unterscheiden sind. Zu diesem Zweck wurde im Hefe-2-Hybrid System eine Reihe von Conductin-Mutanten, welche Bereiche der GSK3 $\beta$ -Bindedomäne abdecken, auf ihre Interaktion mit Diversin und GSK3 $\beta$  getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-18 zusammengefasst. Es gelang die Einengung der Diversin/GSK3 $\beta$ -Bindestelle auf 56 Aminosäuren (lexA-Conductin 365-410).

pBTM Conductin:

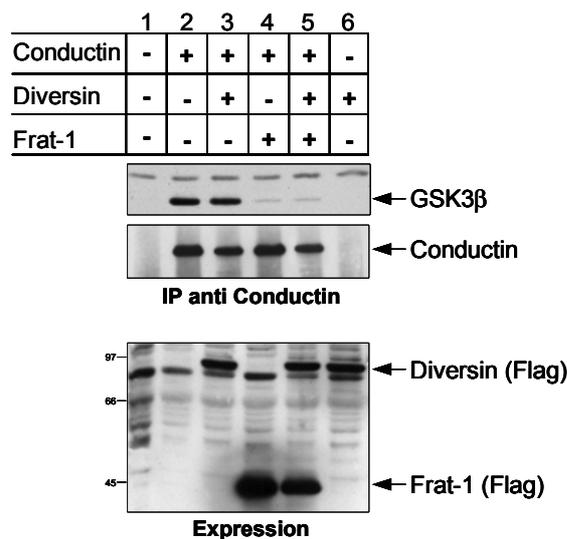
Fragment (Amino Acid Range)	pVP16 Diversin	pGAD GSK3 $\beta$
343-410	+	+
365-410	+	+
375-410	-	-
343-378	-	-
343-367	-	-
365-378	-	-

**Abbildung 2-18:** Einengung der Bindestellen von Diversin und GSK3 $\beta$  an Conductin im Hefe-2-Hybrid System.  
 -: kein Wachstum auf Selektionsmedium; +: Wachstum auf Selektionsmedium.

Die Feinanalyse zeigt deutlich, dass Diversin und GSK3 $\beta$  über nur eine gemeinsame Bindestelle an Conductin verfügen. Beide Interaktionspartner binden an jeweils die gleichen Conductin-Konstrukte. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Diversin wie erwartet mit GSK3 $\beta$  um die Bindung an Conductin kompetieren kann.

### 2.3.3. Einfluss von Diversin auf Conductin-gebundene GSK3 $\beta$

Weiterhin wurde der Einfluss von Frat-1 und Diversin auf die Conductin-assoziierte GSK3 $\beta$  biochemisch untersucht. Dazu wurde in Neuro2A-Zellen exprimiertes Conductin immunpräzipitiert und die Menge an gebundener, endogener GSK3 $\beta$  festgestellt. Wie in Abbildung 2-19 dargestellt, wird die an Conductin gebundene Menge an GSK3 $\beta$  durch Koexpression von Diversin nicht beeinflusst. Dieses ist erstaunlich, da Diversin und GSK3 $\beta$  die gleiche Bindestelle an Conductin belegen, deckt sich aber mit den Daten der Reporter-Experimente, in denen Diversin allein keine Aktivierung bewirkt. Wie zuvor gezeigt, reduziert die Expression von Frat-1 die Menge von Conductin-gebundener GSK3 $\beta$  (Abbildung 2-19, Spur 4). Expression von Diversin zusammen mit Frat-1 führt in diesem experimentellen Ansatz nicht zu einem nochmals weiteren Verlust von GSK3 $\beta$  aus dem Conductin-Komplex (Spur 5).



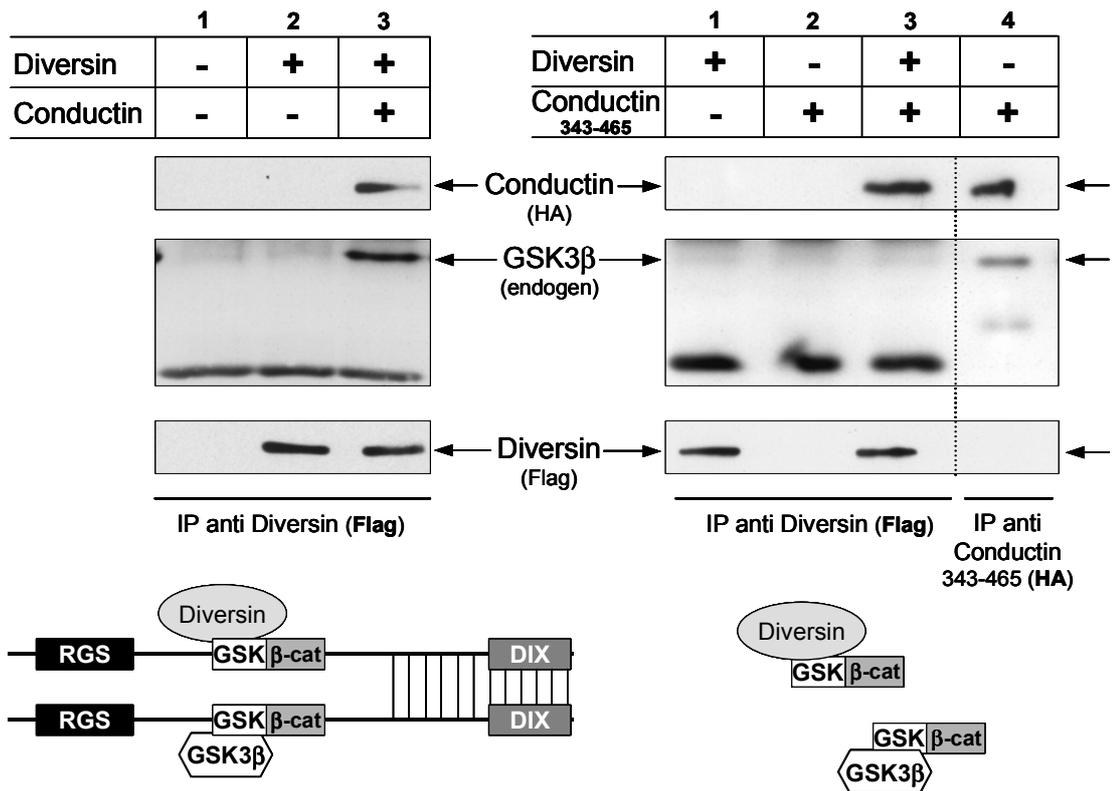
**Abbildung 2-19:** Einfluss von Diversin auf die Frat-1-vermittelte Verdrängung von GSK3 $\beta$  aus dem Conductin-Komplex

Zusammengenommen deutet dieses Experiment darauf hin, dass Diversin trotz überlappender Bindestellen nicht direkt mit GSK3 $\beta$  um die Bindung an Conductin konkurriert. Weiterhin kann Diversin die Frat-1-vermittelte Verdrängung von GSK3 $\beta$  aus dem Conductin-Komplex nicht signifikant steigern. Allerdings könnte bereits eine geringe, und damit in einer Immunpräzipitation kaum nachweisbaren, Verdrängung der Conductin-gebundenen GSK3 $\beta$  durch Diversin die Kinetik der Frat-1-vermittelten GSK3 $\beta$ -Dissoziation erheblich beschleuni-

gen. Dies ist im Einklang mit einer sich gegenseitig ausschließenden Bindung von Diversin und GSK3 $\beta$  an Conductin.

#### **2.3.4. Indirekte Interaktion von Diversin mit GSK3 $\beta$ über Conductin**

Die Beobachtung, dass Diversin die Conductin-gebundene GSK3 $\beta$  kaum verdrängt, lässt die Möglichkeit offen, dass Diversin- und GSK3 $\beta$ -Bindung an Conductin sich nicht gegenseitig ausschließen. Daher sollte festgestellt werden, ob GSK3 $\beta$  und Diversin über Conductin indirekt verbunden sind und dementsprechend Tripelkomplexe aus Diversin, GSK3 $\beta$  und Conductin existieren. Dies ist in der Tat der Fall: wie in Abbildung 2-20 dargestellt, kann Diversin in Anwesenheit von Conductin endogene GSK3 $\beta$  kopräzipitieren. Ohne Zugabe von Conductin ist keine GSK3 $\beta$  in Diversin-Immunpräzipitaten detektierbar. Dies deckt sich mit Befunden aus dem Hefe-2-Hybrid System, in dem keine direkte Interaktion zwischen Diversin und GSK3 $\beta$  festgestellt werden konnte (T. Schwarz-Romond, persönliche Mitteilung). Im Fall von Axin konnte gezeigt werden, dass die carboxyterminale Sequenzen einschließlich der DIX-Domäne ein Dimerisierungsmodul darstellen (Fagotto et al., 1999; Hsu et al., 1999). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Tripelkomplexe aus Diversin, GSK3 $\beta$  und Conductin durch die Möglichkeit der Di- oder Oligomerisierung von Conductin zustande kommen. Um dieses zu testen, wurde das Konstrukt Conductin-GSK+ $\beta$ -Cat verwendet. Conductin-GSK+ $\beta$ -Cat umfasst Aminosäuren 343-465, also nur die GSK3 $\beta$ /Diversin- und  $\beta$ -Catenin-Bindestellen. Die für die Dimerisierung relevanten Reste fehlen. Diversin ist in Anwesenheit von Conductin-GSK+ $\beta$ -Cat nicht in der Lage, endogene GSK3 $\beta$  zu kopräzipitieren, obwohl Conductin-GSK+ $\beta$ -Cat selbst noch an GSK3 $\beta$  binden kann.

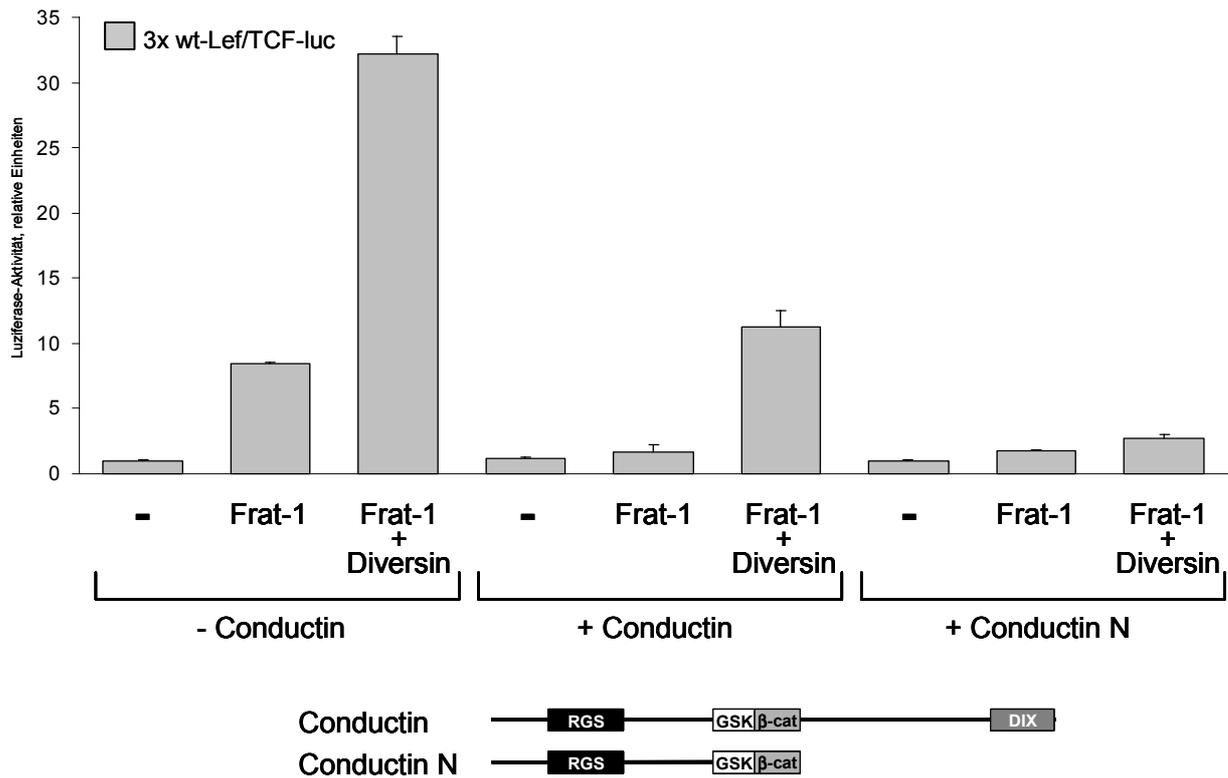


**Abbildung 2-20:** Indirekte Interaktion von Diversin mit GSK3 $\beta$  in Neuro2A Zellen und schematische Darstellung des putativen Mechanismus

Aus diesen Daten ergibt sich ein mögliches Modell für die Bildung der beobachteten Komplexe: ein, im einfachsten Fall, Conductin-Dimer bindet mit einem Molekül Diversin, mit dem anderen GSK3 $\beta$ .

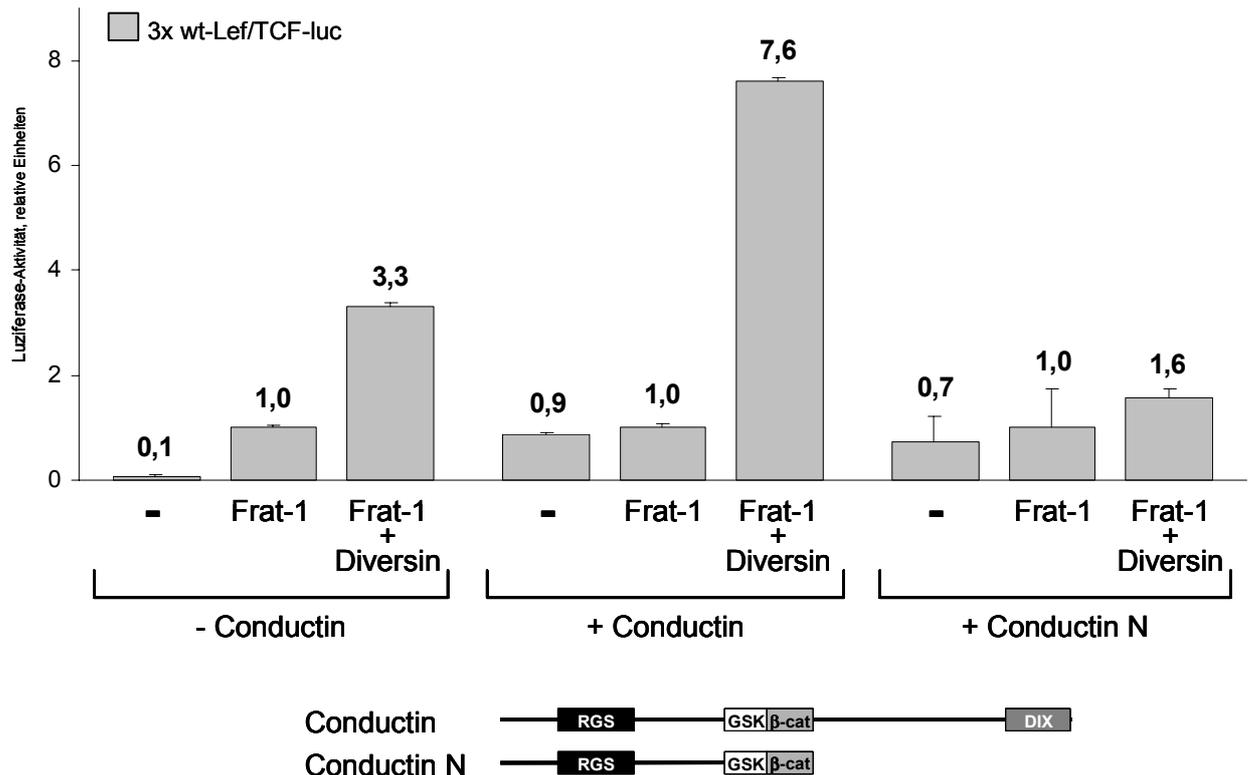
### 2.3.5. Die Synergie von Diversin und Frat-1 ist abhängig von Conductin

Die Funktionalität der beobachteten Tripelkomplexe aus Diversin, Conductin und GSK3 $\beta$  für den Synergieeffekt wurde im Reporter-Experiment überprüft. Dazu wurde neben Diversin und Frat-1 eine Oligomerisierungs-defiziente Mutante von Conductin (Conductin N) in HEK293 Zellen exprimiert. Im Konstrukt Conductin N ist der gesamte C-Terminus ab der  $\beta$ -Catenin-Bindestelle deletiert. Als Kontrolle wurde wildtypisches Conductin koexprimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-21 dargestellt. Wie bereits in Abbildung 2-2 gezeigt, kann Conductin N die Frat-1-vermittelte Reporteraktivierung blockieren. Koexpression von Diversin führt in Gegenwart von Conductin N nicht mehr zu einer synergistischen Reporteraktivierung.



**Abbildung 2-21:** Auswirkung von exogenem und C-terminal deletiertem Conductin auf die Synergie von Diversin und Frat-1 auf die  $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription in HEK293 Zellen

Möglicherweise verdrängt Conductin N Diversin und/oder GSK3 $\beta$  aus den funktionellen Triplettkomplexen und verhält sich daher in diesem Kontext dominant-negativ. Das zur Kontrolle eingesetzte wildtypische Conductin blockiert ebenfalls die Frat-1-vermittelte Reporteraktivierung (vgl. Abbildung 2-2), lässt jedoch die Synergie von Frat-1 und Diversin zu. Die Koexpression von wildtypischem Conductin führt in diesem Experiment sogar noch zu einer Steigerung der Synergie von Frat-1 und Diversin. Dies wird besonders anschaulich, wenn man die jeweiligen Reporteraktivitäten auf den Wert von Frat-1 normalisiert, wie in Abbildung 2-22 dargestellt. Diversin stimuliert die Frat-1-vermittelte Reporteraktivierung um das etwa 3-fache (vgl. auch Abbildung 2-15). In Gegenwart von exogenem Conductin hingegen erreicht die synergistische Aktivierung etwa das 8-fache des Frat-1-Wertes. Die Überexpression von wildtypischem Conductin könnte zur Einstellung einer optimalen Balance zwischen den beteiligten Komponenten führen, so dass die für den Wnt-Signalweg relevante Fraktion von GSK3 $\beta$  effektiv gehemmt werden kann.

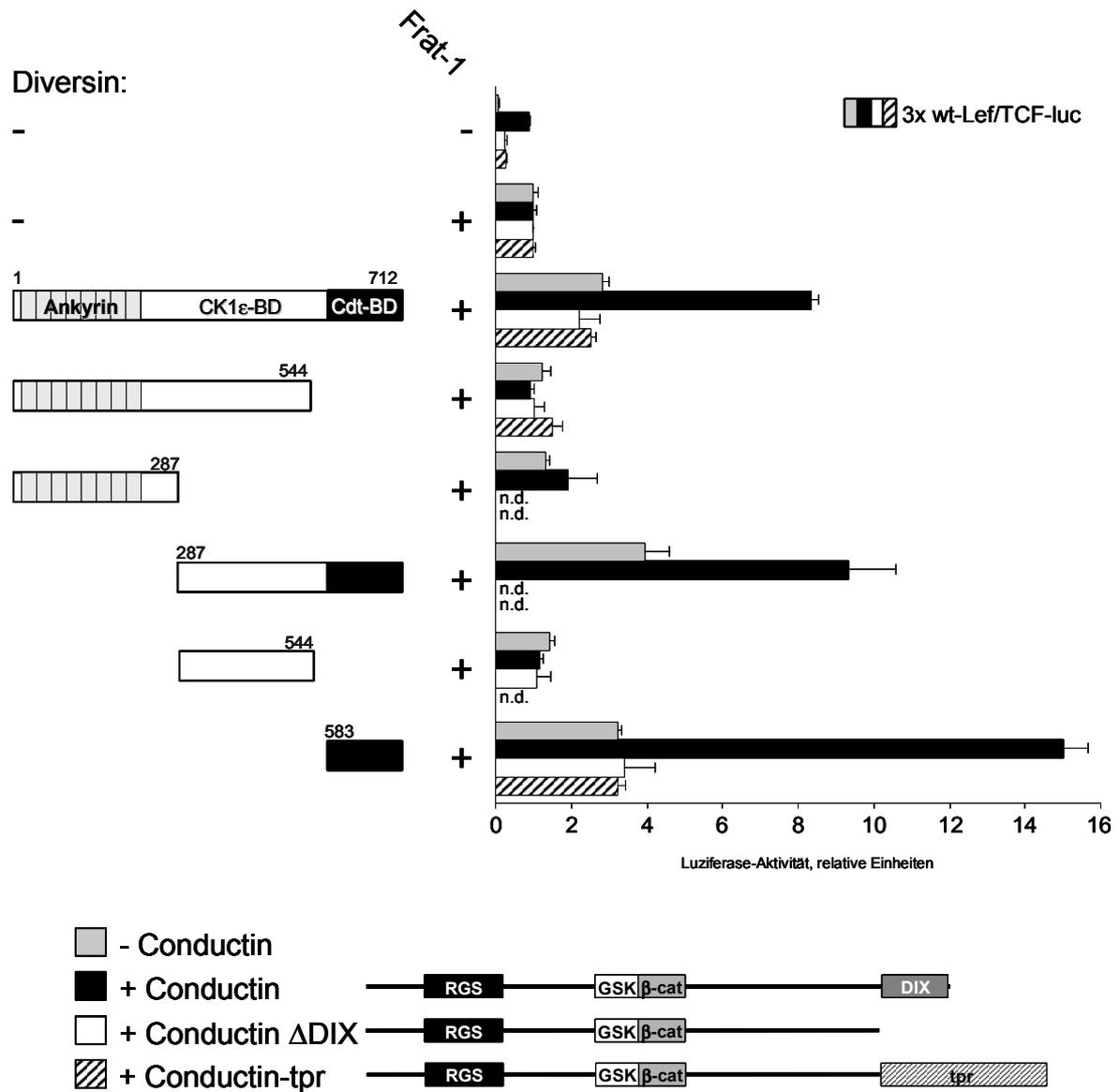


**Abbildung 2-22:** Auswirkung von exogenem und C-terminal deletiertem Conductin auf die Synergie von Diversin und Frat-1, Darstellung nach Normalisierung auf den jeweiligen Frat-1-Wert

### 2.3.6. Einfluss der DIX-Domäne auf die Synergie von Diversin und Frat-1

Die Steigerung der Synergie von Frat-1 und Diversin durch Conductin ermöglicht die Analyse der Bedeutung einzelner Domänen Conductins. Dabei ist die DIX-Domäne in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Die bisher bekannten Funktionen der DIX-Domäne von Axin sind die Interaktion mit Dishevelled und die Oligomerisierung. Studien mit Axin haben gezeigt, dass dort die DIX-Domäne notwendig, aber nicht ausreichend für die Dimerisierung ist (Hedgepeth et al., 1999; Sakanaka & Williams, 1999). Daher wurde der Einfluss der DIX-Domäne von Conductin auf die Synergie von Frat-1 und Diversin im Reporter-Experiment untersucht. Zur Bestimmung des Anteils der DIX-vermittelten Oligomerisierungsfunktion an der Synergie zwischen Diversin und Frat-1 wurde zusätzlich die DIX-Domäne durch eine heterologe Oligomerisierungsdomäne ersetzt. Benutzt wurde die tpr-Domäne („translocated promotor region“) aus dem Onkogen tpr-Met. Dort führt die tpr-Domäne zur Dimerisierung und damit Aktivierung der mit ihr fusionierten Rezeptortyrosinkinase Met (Park et al., 1986). Die tpr-Domäne wurde carboxyterminal mit Conductin $\Delta$ DIX fusioniert (Conductin-tpr). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 2-23 darge-

stellt. Man beachte, dass zugunsten einer deutlicheren Darstellung der beobachteten Effekte alle Werte auf diejenigen von Frat-1 abgeglichen sind.



**Abbildung 2-23:** Einfluss der DIX-Domäne von Conductin und der heterologen tpr-Dimerisierungsdomäne auf die Synergie von Diversin und Frat-1 im Reporter-Experiment in HEK293 Zellen. Darstellung nach Normalisierung auf die Frat-1-Werte.

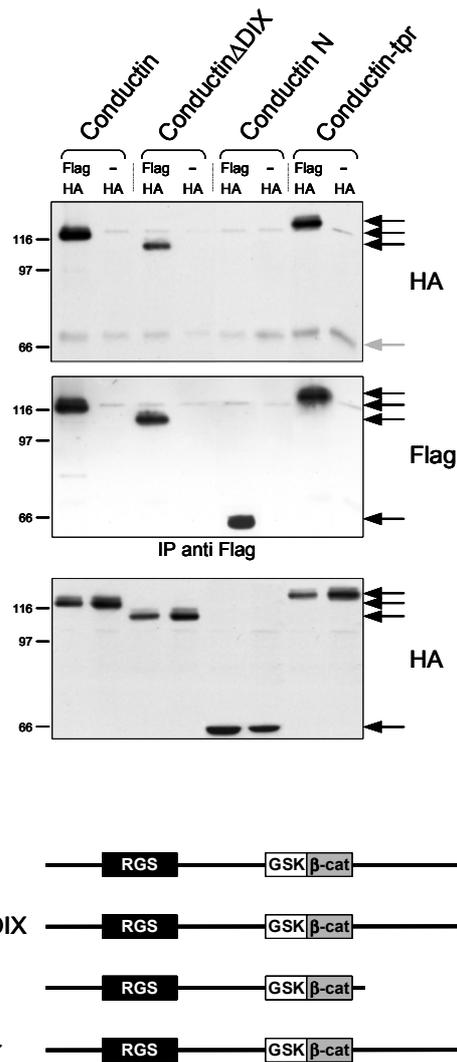
Im Reporter-Experiment kann wildtypisches Conductin die Synergie von Frat-1 und Diversin weiter stimulieren, wie bereits gezeigt von etwa 3-fach auf etwa 9-fach. Im Gegensatz dazu führen weder ConductinΔDIX noch Conductin-tpr zu einer solchen Steigerung des Synergieeffektes. Interessanterweise führt ConductinΔDIX jedoch nicht zu einer Blockade der Syner-

gie, wie es für Conductin N beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 2-22). Das Konstrukt Conductin-tp<sub>r</sub> verhält sich im Reporter-Experiment genau wie Conductin $\Delta$ DIX. Dies deutet auf mögliche weitere Funktionen der DIX-Domäne, neben der Oligomerisierung, für die Synergie von Diversin und Frat-1 hin.

Beachtenswert in diesem Experiment ist der Befund, dass die Conductin-Bindedomäne Diversins im Vergleich zu vollständigem und N-terminal deletiertem Diversin im Zusammenspiel mit Conductin die weitaus größte synergistische Aktivierung vermittelt. Das Ausmaß der Synergie von Frat-1 steigt hier von etwa 3-fach in Abwesenheit von exogenem Conductin auf etwa 15-fach in Anwesenheit von exogenem Conductin. Diese Conductin-Bindedomäne Diversins bindet im Hefe-2-Hybrid-System quantitativ am stärksten an Conductin (T. Schwarz-Romond, persönliche Mitteilung). Daher kann man annehmen, dass dieses Konstrukt auch am stärksten GSK3 $\beta$  aus dem Conductin/Axin-Komplex verdrängen kann.

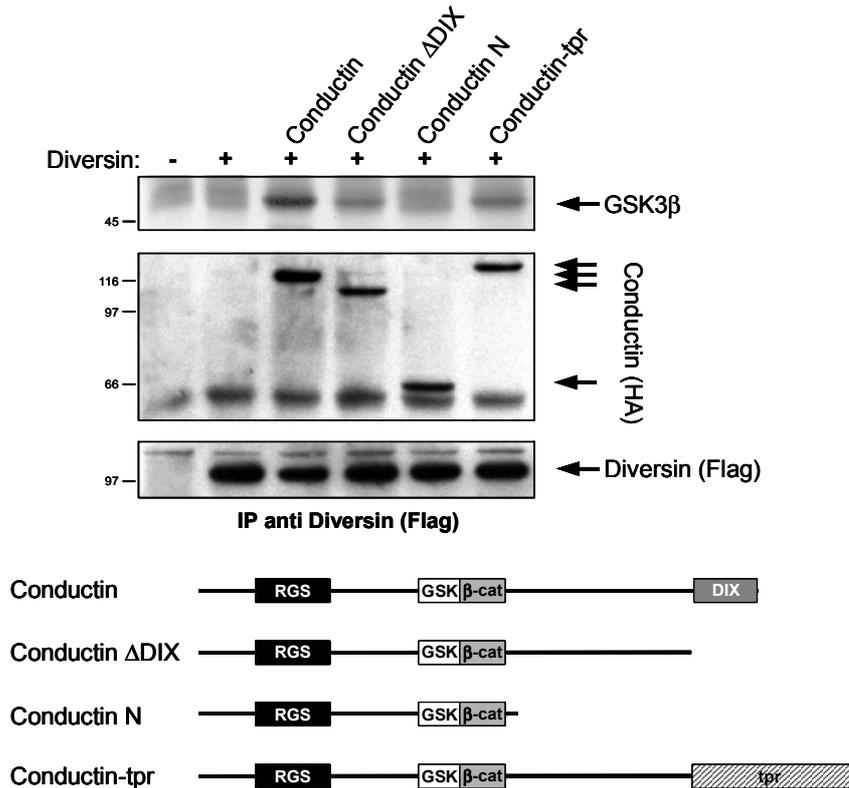
### **2.3.7. Dimerisierungseigenschaften von Conductin**

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Fähigkeit zur Oligomerisierung der verwendeten Conductin-Konstrukte überprüft. Dazu wurden jeweils Flag- und HA-Epitop markierte Conductin-Konstrukte in Neuro2a-Zellen exprimiert und eine Immunpräzipitation gegen das Flag-Epitop durchgeführt. Diese Präzipitate wurden dann auf das Vorhandensein der HA-markierten Proteine analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-24 gezeigt. Sowohl vollständiges Conductin als auch Conductin $\Delta$ DIX und Conductin-tp<sub>r</sub> sind qualitativ in der Lage zu oligomerisieren, nicht jedoch Conductin N.



**Abbildung 2-24:** Analyse der Oligomerisierung von Conductin in Neuro2A Zellen

Dieser Befund führte zu der Frage, ob Conductin $\Delta$ DIX und Conductin-tptr auch in der Lage sind, Tripelkomplexe mit Diversin und GSK3 $\beta$  zu bilden. Dazu wurde in HEK293 Zellen exprimiertes Diversin immunpräzipitiert und der Gehalt an kopräzipitierbarer GSK3 $\beta$  bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-25 dargestellt. Sowohl Conductin $\Delta$ DIX als auch Conductin-tptr können qualitativ Tripelkomplexe ermöglichen. Dies ist im Einklang mit der beobachteten Fähigkeit beider Mutanten zur Oligomerisierung. Jedoch ist in beiden Fällen die mit Diversin kopräzipitierte Menge an GSK3 $\beta$  sehr viel kleiner ist als diejenige, die in Anwesenheit von wildtypischem Conductin mit Diversin präzipitierbar ist. Conductin N kann erwartungsgemäß keine Tripelkomplexe zwischen Diversin, Conductin und GSK3 $\beta$  mehr vermitteln.



**Abbildung 2-25:** Analyse der Fähigkeit von Conductin-Mutanten zur Bildung von Tripelkomplexen mit Diversin und GSK3 $\beta$

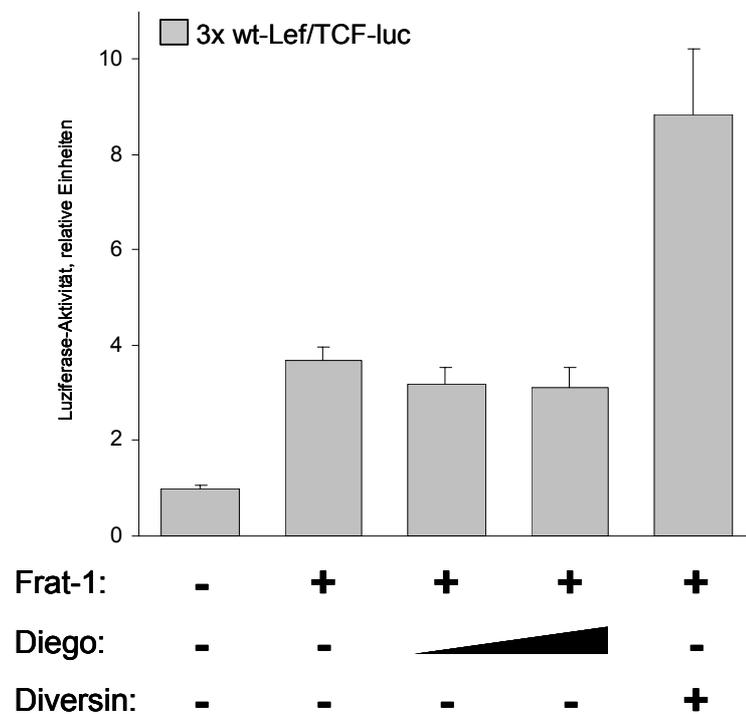
Die kopräzipitierbare GSK3 $\beta$ -Menge korreliert mit den jeweiligen Aktivitäten der verwendeten Conductin-Mutanten in den Reporter-Experimenten. In Anwesenheit von wildtypischem Conductin ist die meiste GSK3 $\beta$  mit Diversin kopräzipitierbar und das Ausmaß der Synergie von Frat-1 und Diversin am höchsten. Conductin $\Delta$ DIX und Conductin-tp $r$  können jeweils nur die Kopräzipitation geringerer Mengen von GSK3 $\beta$  zusammen mit Diversin vermitteln und können die Synergie von Frat-1 und Diversin nicht steigern. Conductin N schließlich vermittelt keine Tripelkomplexe mehr und blockiert den Synergieeffekt.

Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass die Effizienz der Tripelkomplexbildung aus Diversin, Conductin und GSK3 $\beta$  möglicherweise von der DIX-Domäne Conductins beeinflusst wird und damit auch das Ausmaß der beobachteten Synergie von Diversin und Frat-1. Möglicherweise bilden die Tripelkomplexe an sich erst die Voraussetzung für die Synergie von Frat-1 und Diversin.

### 2.3.8. Das Diversin-verwandte Protein Diego synergisiert nicht mit Frat-1

Mit Diego wurde kürzlich ein Ankyrin-Repeat Protein in *Drosophila* charakterisiert (Feiguin et al., 2001). Innerhalb der Ankyrin-Domäne ist Diversin zu etwa 35% identisch mit Diego.

Ausserhalb dieser N-terminalen Region fällt die Homologie mit etwa 18% Identität der Aminosäurereste jedoch wesentlich schwächer aus. Trotz dieser relativ niedrigen Übereinstimmung wurde humanes Diversin (KIAA0957) als nächstes Vertebraten-Homolog von Diego bezeichnet (Feiguin et al., 2001). In *Drosophila* beeinflusst Diego die planare Polarität von Epithelien unterhalb von Frizzled und könnte dort ein Teil des Wnt/JNK-Signalweges sein. Um festzustellen, ob Diego funktionell homolog zu Diversin ist, wurde Diego zusammen mit Frat-1 im Reporter-Experiment getestet. Wie in Abbildung 2-26 zu sehen ist, kann Diego im Gegensatz zu Diversin nicht mit Frat-1 synergieren. In Koimmunpräzipitationen kann Diego allerdings weder mit Conductin noch mit *Drosophila* Axin interagieren. Jedoch ist Diego in der Lage, endogene CKIε zu kopräzipitieren (T.Schwarz-Romond, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 2-26:** *Drosophila* Diego synergisiert nicht mit Frat-1 in HEK293 Zellen

Diese Befunde deuten daraufhin, dass die Synergiefunktion von Diversin in Diego nicht existiert, andere Diversin-Funktionen hingegen auch von Diego wahrgenommen werden könnten. Damit im Einklang konnte in Zebrafisch-Embryonen gezeigt werden, dass Diversin wie auch Diego Bewegungsprozesse während der Gastrulation beeinflussen können (Schwarz-Romond et al., 2002). Diese Prozesse werden durch den Wnt/JNK-Signalweg gesteuert.