

Identifikation und funktionelle Charakterisierung
LEF-1 assoziierter Kinasen

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
AM FACHBEREICH BIOLOGIE, CHEMIE UND PHARMAZIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
ANDREA HÄMMERLEIN
BERLIN 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1999 bis Januar 2003 am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie (Prof. Dr. Rudolf Tauber) des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin unter der Leitung von PD Dr. Otmar Huber angefertigt.

1. GUTACHTER: PD DR. OTMAR HUBER
INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE & PATHOBIOCHEMIE
UNIVERSITÄTSKLINIKUM BENJAMIN FRANKLIN
FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

2. GUTACHTER: PROF. DR. RAINER H. MÜLLER
INSTITUT FÜR PHARMAZIE
PHARMAZEUTISCHE TECHNOLOGIE, BIOPHARMAZIE &
BIOTECHNOLOGIE
FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

TAG DER DISPUTATION: 24. MÄRZ 2003

Für meine Eltern

Summary

With the results of my work the following new findings could be gained:

- The serine/threonine protein kinases CK1 and CK2 directly bind to and phosphorylate LEF-1.
- CK1- and CK2-dependent phosphorylation induces a conformational change in the LEF-1 protein that in consequence is transduced to the DNA.
- CK1-dependent phosphorylation of LEF-1 disrupts the LEF-1/ β -catenin complex. Consistent with this results CK1 had a negative regulatory effect on the transcriptional activity of a LEF-1/ β -catenin regulated Wnt target gene promoter.
- Phosphorylation of LEF-1 by CK2 did not significantly affect formation of the LEF-1/ β -catenin complex. However, in reporter gene assays the transcriptional activity of the LEF-1/ β -catenin transcription complex was enhanced.

CK1 and CK2 therefore are involved in Wnt-signalling by regulating β -catenin stability not only at the level of the β -catenin destruction complex but in addition modulate the pathway at the level of the LEF-1/ β -catenin transcription complex. The results of this work show that CK1 acts as a negative regulator, whereas CK2 is supposed to function as a positive regulator.

With respect to the dramatic consequences induced by misregulated activation of Wnt target genes in cells, a coordinated regulation at two levels appears to be an elegant mechanism to tightly control canonical Wnt-signalling. However, currently it is not understood how the activity of CK1 and CK2 is regulated and lead to the observed positive and negative effects at the level of the LEF-1/ β -catenin transcription complex.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Wnt-Signaltransduktion	1
1.1.1	Der kanonische Wnt-Signalweg	3
1.2	Die Struktur von β -Catenin	5
1.3	Der Abbau von β -Catenin in nicht Wnt-stimulierten Zellen	6
1.4	Die Stabilisierung von β -Catenin in Wnt-stimulierten Zellen	8
1.5	Der LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex	9
1.5.1	Die Familie der LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren	10
1.5.2	Die Transkriptionsregulation durch den LEF-1/TCF- β -Catenin Komplex	12
1.6	Wnt-Signaling und Tumorgenese	14
1.7	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material	17
2.1	Geräte	17
2.1.1	Elektrophorese und Western Blot	17
2.1.2	Bakterien- und Zellkultur	17
2.1.3	Zentrifugen	18
2.1.4	Sonstige Geräte	18
2.2	Reagenzien und Reaktionskits	19
2.3	Verbrauchsmaterialien	20
2.4	Materialien für die Zellkultur	21
2.5	Zelllinien	21
2.6	Radionuklide	21
2.7	Proteine, Peptide und ihre Konjugate	21
2.8	Antikörper	22
2.8.1	Primärantikörper	22
2.8.2	Sekundärantikörper	23
2.9	Enzyme	23
2.10	Bakterienstämme, Vektoren, cDNAs	24
2.11	Molekulargewichtsstandards für Proteine und DNA	25
3	Methoden	26
3.1	Zellbiologische Methoden	26

3.1.1	Zellkultur	26
3.1.2	Kultivierung von HEK293 und SW480 Zellen	26
3.1.3	Kultivierung von HT29 Zellen	26
3.1.4	Passagieren der Zellen	26
3.1.5	Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer	27
3.1.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
3.1.7	Transfektion von Zellen	28
3.2	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	29
3.2.1	Proteinbestimmung	29
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.2.3	Proteinnachweis in SDS-Gelen durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung	30
3.2.4	Proteintransfer auf PVDF Membran	31
3.2.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF Membran (Western Blot)	32
3.2.6	Prokaryontische Expression von GST-LEF-1 Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	32
3.2.6.1	Induktion der Proteinexpression durch IPTG	33
3.2.6.2	Aufschluss der Bakterien durch Ultraschallbehandlung	33
3.2.6.3	Affinitätschromatographische Reinigung des GST-LEF-1 Fusionsproteins	34
3.2.7	Pull-down von Kinasen aus HT29 Zellen	34
3.2.8	Phosphoaminosäure-Analyse	35
3.2.9	Kinasierungsassays	37
3.2.9.1	Kinasierung mit aus HT29 Zellen isolierten Kinasen	37
3.2.9.2	Kinasierung mit rekombinanter CK1 und CK2	37
3.2.9.3	Kinasierung unter Zugabe spezifischer Proteinkinase-Inhibitoren	38
3.2.9.4	Kinasierung unter Zugabe spezifischer Substratpeptide	38
3.2.10	Co-Immunopräzipitation von LEF-1, CK1 und CK2 aus HEK293 Zellen	38
3.2.11	Bandshift Analyse (EMSA)	39
3.2.11.1	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.2.11.2	Herstellung des markierten LEF-DNA-Fragments	40
3.2.11.3	LEF-1/DNA-Bindungsreaktion	41
3.3	Molekularbiologische Methoden	42
3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
3.3.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	43
3.3.3	Ethanol-Präzipitation	43
3.3.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	44
3.3.5	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	44
3.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	44

3.3.7	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	45
3.3.8	Ligation von DNA-Fragmenten	45
3.3.9	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	46
3.3.10	Plasmidkonstruktionen	46
3.3.11	Sequenzierung	47
3.3.12	Reporteragen-Assays	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Identifizierung und Charakterisierung LEF-1 assoziierter Kinasen	49
4.1.1	Nachweis LEF-1 assoziierter Kinasen	49
4.1.2	Charakterisierung der LEF-1 assoziierten Kinase(n) als Mitglied(er) der Serin/Threonin Proteinkinase Familie	50
4.1.3	Identifizierung der Kinase(n)	51
4.1.4	Nachweis von zellulären LEF-1/CK1 - und LEF-1/CK2 Komplexen	56
4.1.5	Direkte Assoziation von CK1 und CK2 mit LEF-1	57
4.1.6	Phosphorylierung von LEF-1 Deletionskonstrukten	58
4.2	Die funktionelle Charakterisierung der CK1 - und CK2-abhängigen Phosphorylierung von LEF-1	59
4.2.1	Die phosphorylierungsabhängige Veränderung der Struktur des LEF 1/DNA Komplexes	59
4.2.2	Die CK1 δ -abhängige Dissoziation des LEF-1/ β -Catenin Komplex	64
4.2.3	Inhibition der Dissoziation des LEF-1/ β -Catenin Komplexes in Gegenwart von Phosphatase	66
4.3	Der Einfluss der CK1- und CK2-abhängigen Phosphorylierung auf die Promotoraktivität von Wnt Zielgenen	68
5	Diskussion	71
6	Zusammenfassung und Ausblick / Summary	79
7	Literaturverzeichnis	82
8	Anhang	94
	A Lebenslauf	94
	B Danksagung	96