

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	Reporter-gen-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	79
7	Literaturverzeichnis	81
8	Anhang	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (copy DNA)
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (calf intestinal phosphatase)
CK	Casein Kinase
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
HMG	high mobility group
HRPO	Merretich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LEF-1	Lymphoid Enhancer Factor-1
LB	Luria Broth

Abkürzungsverzeichnis

M	Mol pro Liter
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
p. A.	pro Analysis (Reinheitsgrad)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
Ser	Serin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TCF	T-Cell Factor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tyr	Tyrosin
U	Einheit(en) (units)
UV	Ultraviolett
VT	Volumenteil
(v/v)	Volumenanteil am Gesamtvolumen
(w/v)	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
WB	Western Blot

1 Einleitung

1.1 Die Wnt-Signaltransduktion

Der Wnt-Signalweg stellt eine in der Evolution hochkonservierte Signaltransduktionskaskade dar, die ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als ein linearer, aus vier Komponenten bestehender Signalweg beschrieben wurde (Riggelman *et al.*, 1990; Siegfried *et al.*, 1994a). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass Wnt-Signale während der Embryonalentwicklung Differenzierungs-, Proliferations- und Morphogenese-prozesse steuern und an der Regulation der Zellmotilität sowie des programmierten Zelltods (Apoptose) beteiligt sind (Wodarz und Nusse, 1998). Eine Fehlregulation dieses Signalwegs ist entscheidend an der Entstehung von Tumoren beteiligt (Bienz und Clevers, 2000; Polakis, 2000).

In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Modellsystemen eine Vielzahl neuer, an der Wnt-Signaltransduktion beteiligter, Komponenten entdeckt und beschrieben. Dabei zeigte sich, dass sich der Signalweg in der Zelle in verschiedene Signalkaskaden aufspaltet, die unterschiedliche zelluläre Funktionen regulieren. Neben dem ursprünglich beschriebenen kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurden der planare Zellpolaritätsweg, der Wnt/ Ca^{2+} -Weg und ein die Spindelorientierung und asymmetrische Zellteilung regulierender Weg beschrieben (Hülsken und Birchmeier, 2001).

Der planare Zellpolaritäts-Signalweg führt über die Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) zu einer asymmetrischen Organisation des Cytoskeletts sowie zu einer polarisierten Morphologie von Zellen in epithelialen Zellverbänden (Djiane *et al.*, 2000; Heisenberg *et al.*, 2000; Mlodzik, 2000).

Im Wnt/ Ca^{2+} -Weg führt die Aktivierung des Signalwegs über einen noch nicht genau verstandenen, G-Protein vermittelten Prozess und durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zur intrazellulären Ausschüttung von Ca^{2+} , die eine Aktivierung von Calcium-sensitiven Enzymen, wie z. B. der Proteinkinase C (PKC) und der Calmodulin-abhängigen Kinase (CamKII) (Kühl *et al.*, 2000) induziert.

Über einen bisher kaum verstandenen Mechanismus beeinflussen Wnt-Signale die Symmetrie der Zellteilung und die Orientierung des Spindelapparates in neuroepithelialen Zellen (Bienz, 2001; Lu *et al.*, 2001). Dabei spielen neben dem Mikrotubuli-bindenden Protein EB1 auch die am kanonischen Wnt-Signalweg beteiligten Proteine Glykogensynthasekinase-3 β (GSK3 β) und das Tumorsuppressorprotein APC (adenomatöse Polyposis Coli) eine wichtige Rolle.

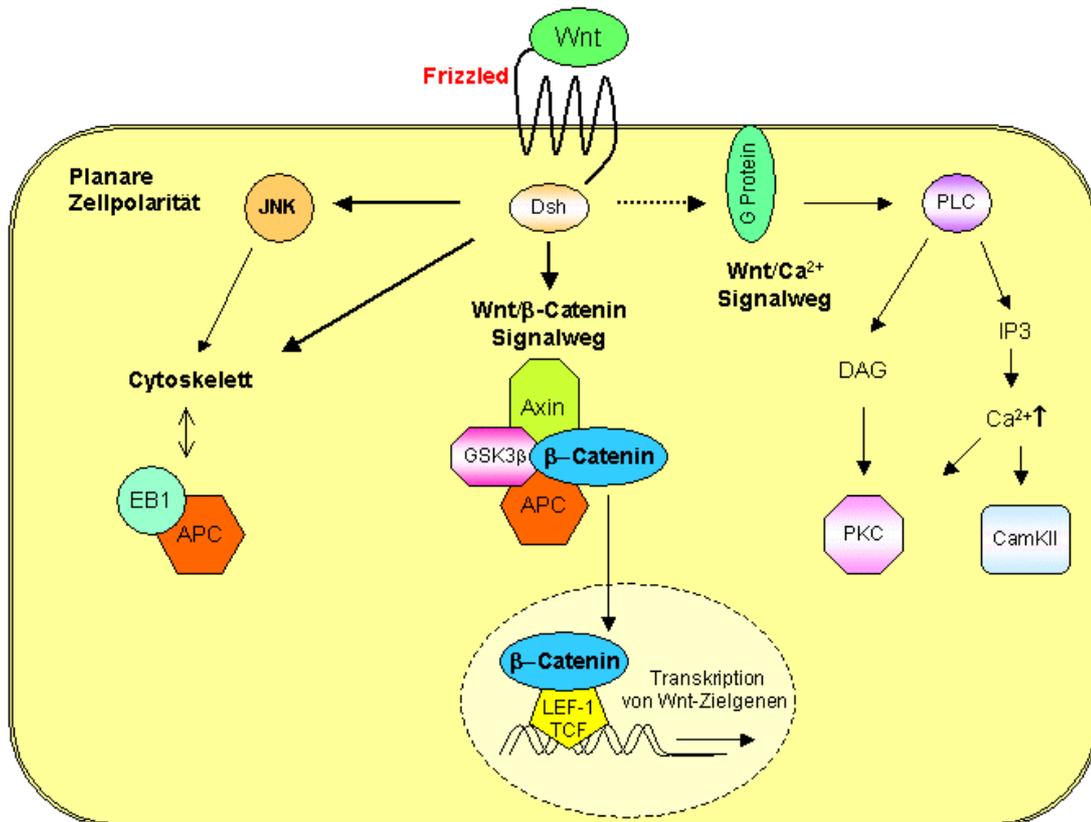


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs und seiner Verzweigung in verschiedene Signalkaskaden.

Zur besseren Übersicht sind nicht alle zur Zeit bekannten Komponenten aufgeführt, die an der Weiterleitung bzw. Modulation des Wnt-Signalwegs beteiligt sind. JNK, Jun-N-terminale-Kinase; EB1, Mikrotubuli-bindendes Protein EB1; APC, adenomatöses Polyposis Coli Protein; GSK3 β , Glykogensynthasekinase-3 β ; LEF-1, Lymphoid Enhancer Factor-1; TCF, T-Cell Factor; PLC, Phospholipase C; DAG, Diacylglycerol; IP3, Inositol-1,4,5-trisphosphat; PKC, Proteinkinase C; CamKII, Calmodulin-abhängige Kinase.

Der kanonische Wnt-Signalweg steht im Mittelpunkt der hier beschriebenen Arbeiten. In dieser Signaltransduktionskaskade stellt β -Catenin die zentrale Komponente dar. Ursprünglich wurde β -Catenin jedoch als ein Protein identifiziert, das an die cytoplasmatische Domäne des Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin bindet (Ozawa *et al.*, 1989). Über seine Interaktion mit α -Catenin vermittelt β -Catenin die Assoziation von Cadherin-Molekülen mit dem

Aktincytoskelett. Eine fehlende Expression oder eine aufgrund von Mutationen beeinträchtigte Funktion von β -Catenin resultiert, vergleichbar zu Mutationen in E-Cadherin, in einem nicht adhäsiven, hoch invasivem Phänotyp der betroffenen Zellen (Oyama *et al.*, 1994). Damit wird β -Catenin im Rahmen seiner adhäsiven Funktion im Cadherin-Catenin Komplex eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben. Verschiedene Untersuchungen weisen daraufhin, dass β -Catenin an der Regulation der Cadherin-vermittelten Zell-Zellkontakte beteiligt ist (Hamaguchi *et al.*, 1993; Lickert *et al.*, 2000).

Die Entdeckung, dass β -Catenin über seine adhäsive Funktion hinaus eine zweite Rolle als Signalmolekül im Wnt-Signalweg besitzt, legte nahe, dass Cadherine über β -Catenin in Signaltransduktionsvorgänge eingreifen können (Barth *et al.*, 1997; Eastman und Grosschedl, 1999; Huber *et al.*, 1996).

1.1.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg wird durch die Bindung sekretierter Glykoproteine aus der Wnt-Familie an Rezeptoren aus der Frizzled-Proteinfamilie aktiviert. Zur Zeit sind 23 verschiedene Wnt-Proteine und 11 Frizzled-Rezeptoren beschrieben, die spezifische, teilweise überlappende Expressionsmuster im Organismus aufweisen (zur weiteren Information siehe: <http://www.stanford.edu/rnusse/wntwindow.html>). An der Wnt-Signalrezeption sind neben den 7-Transmembrandomänen-Proteinen der Frizzled-Familie Heparansulfatproteoglykane und LDL-Rezeptor-ähnliche Proteine (LRP) als Co-Rezeptoren beteiligt (Pinson *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 1997; Wehrli *et al.*, 2000). Nach Rezeptoraktivierung wird das Wnt-Signal über einen bisher ungeklärten Mechanismus ins Zellinnere auf das an die Zellmembran rekrutierte cytoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled (Dsh) übertragen. Aktiviertes Dishevelled führt nachfolgend zur Inhibition der Serin/Threonin-Proteinkinase Glykogensynthasekinase-3 β (GSK3 β) und zur Destabilisierung eines cytoplasmatischen Multiproteinkomplexes. Dieser Komplex besteht aus dem Gerüstprotein Axin und/oder Conductin, dem Tumorsuppressorprotein APC, sowie der GSK3 β selbst und β -Catenin als zentralen Komponenten. In diesem molekularen Kontext phosphoryliert GSK3 β kritische Serin- und Threoninreste am N-Terminus von β -Catenin. Die

Phosphorylierung von β -Catenin gilt als Voraussetzung für die Erkennung und den nachfolgenden Abbau von β -Catenin über das Ubiquitin-Proteasomen System. Nach Stimulation des Wnt-Signalwegs unterbleibt in der Folge die Phosphorylierung von β -Catenin und damit der Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen System. β -Catenin kann im Cytoplasma akkumulieren und transloziert in den Zellkern, wo es mit Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie (Behrens *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 1997; Huber *et al.*, 1996; Molenaar *et al.*, 1996) interagiert und die Transkription von Wnt-Zielgenen aktiviert (Arnold *et al.*, 2000; Brannon *et al.*, 1997; He *et al.*, 1998; Riese *et al.*, 1997; Tetsu und McCormick, 1999).

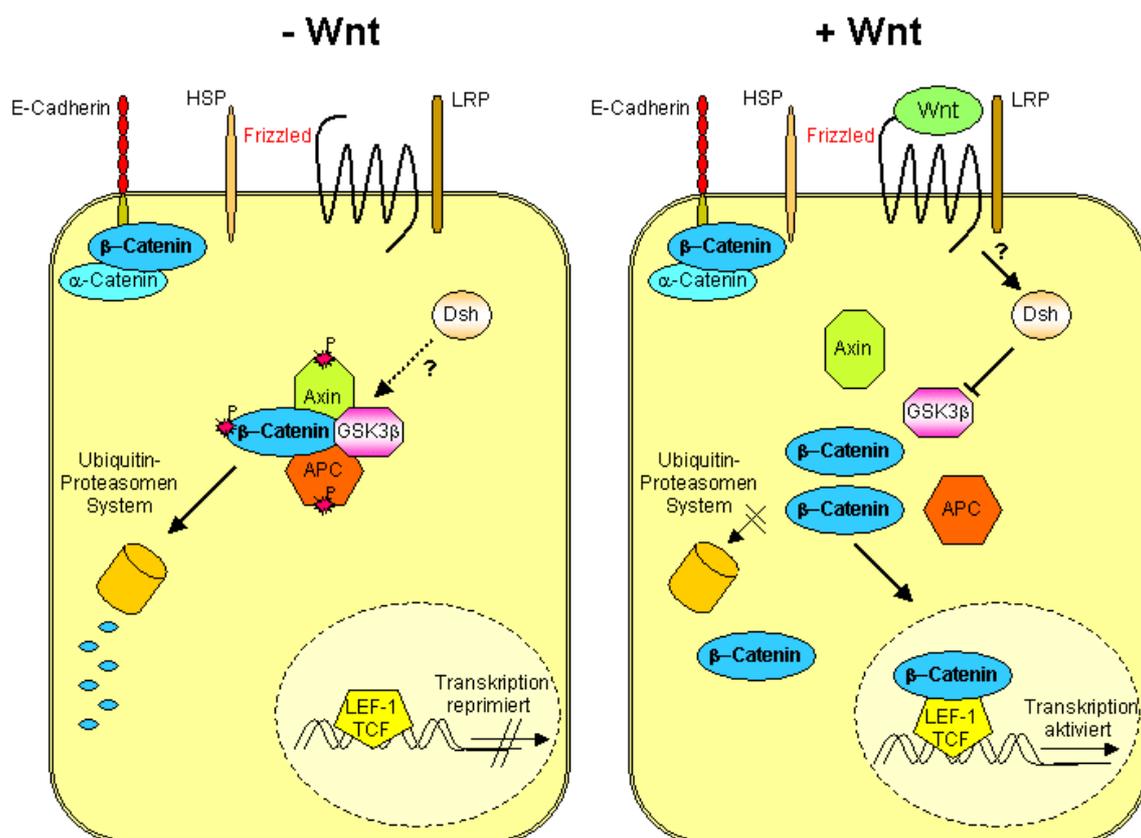


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.

HSP, Heparansulfatproteoglykan; LRP, LDL-Rezeptor-ähnliches Protein; Dsh, Dishevelled; APC, adenomatöses Polyposis Coli Protein; GSK3 β , Glykogensynthasekinase-3 β ; LEF-1, Lymphoid Enhancer Factor-1; TCF, T-Cell Factor.

1.2 Die Struktur von β -Catenin

β -Catenin ist ein aus 781 Aminosäuren aufgebautes Protein und gehört aufgrund seiner starken Homologie zu dem in *Drosophila melanogaster* identifizierten Protein Armadillo zur Familie der Armadillo-Repeat Proteine. Seine primäre Struktur lässt sich in drei Domänen einteilen: eine N-terminale, eine zentrale und eine C-terminale Domäne.

Die zentrale Domäne von β -Catenin ist aus 12 sogenannten Armadillo-Repeats (Arm-Repeats) aufgebaut und stellt damit den die Familienzugehörigkeit definierenden Bereich dar. Arm-Repeat Domänen gelten als typische Protein-Protein Interaktionsdomänen. Sie bestehen aus ca. 42 Aminosäuren langen Sequenzwiederholungen, die in ihrer Sekundärstruktur drei α -Helices ausbilden. Die α -Helices der einzelnen Armadillo-Repeats lagern sich zu einer kompakten Struktur zusammen und formen eine Superhelix, die eine basische Grube ausbildet (Huber *et al.*, 1997). Für die zentrale Domäne von β -Catenin konnte gezeigt werden, dass diese basische Grube die Bindungsstelle für E-Cadherin, APC und LEF-1/TCF darstellt (Behrens *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 1997; Huber und Weis, 2001; Hülsken *et al.*, 1994; Rubinfeld *et al.*, 1997a; Su *et al.*, 1993; von Kries *et al.*, 2000). Saure Domänen in E-Cadherin, APC und LEF-1/TCF kompetieren dabei um dieselbe Bindungsstelle in β -Catenin (Hülsken *et al.*, 1994; Orsulic *et al.*, 1999).

Für die N-terminale Domäne von β -Catenin konnte gezeigt werden, dass sie für die Regulation bzw. Stabilität des Proteins von Bedeutung ist. Hier liegen die GSK3 β Phosphorylierungsstellen, an denen β -Catenin für die Erkennung und den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasomen System markiert wird (siehe auch 1.1.1; (Aberle *et al.*, 1997; Yost *et al.*, 1996). Zudem wurde die Bindungsstelle für α -Catenin im C-terminalen Bereich der N-terminalen Domäne, überlappend zum ersten Arm-Repeat, lokalisiert. Diese Domäne ist somit auch für die zelladhäsive Funktion von Bedeutung (McCrea und Gumbiner, 1991; Ozawa und Kemler, 1992).

Die C-terminale Domäne enthält die für die transkriptionsfördernde Funktion von β -Catenin wichtigen Transkriptionsaktivierungsdomänen (Hecht *et al.*, 1999; Hsu

et al., 1998; van de Wetering *et al.*, 1997; Vleminckx *et al.*, 1999). Durch die Bindung an das TATA-Box Bindeprotein TBP kann sie den Kontakt zur generellen Transkriptionsmaschinerie herstellen (Hecht *et al.*, 1999). Eine Deletion der C-terminalen Domäne führt zu einer drastischen Reduktion der Transkriptionsaktivität des LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplexes in Reporteragen-Assays. Durch Substitution mit einer anderen Transkriptionsaktivierungsdomäne kann die Transkriptionsaktivität wiederhergestellt werden.

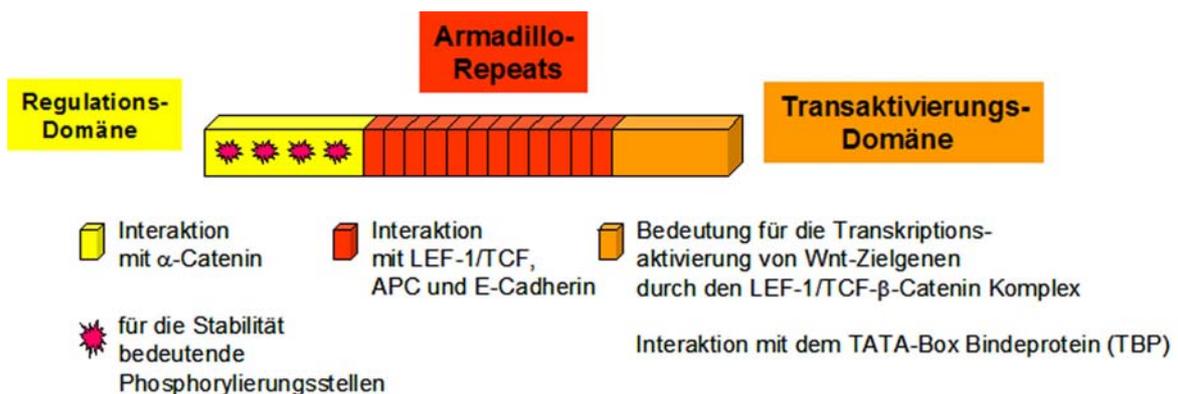


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Struktur von β -Catenin.

1.3 Der Abbau von β -Catenin in nicht Wnt-stimulierten Zellen

In Zellen, die nicht durch Wnt-Signale stimuliert werden, wird β -Catenin sehr schnell über den zuvor beschriebenen, cytoplasmatische Multiproteinkomplex in den Ubiquitin-Proteasomen Weg eingeschleust und abgebaut (siehe 1.1.1). Dieser Multiproteinkomplex wird daher auch als β -Catenin Degradationskomplex bezeichnet. Verschiedene funktionelle Analysen haben gezeigt, dass Axin als Gerüstprotein an APC, GSK3 β und β -Catenin bindet und die Proteine dieses Komplexes Substrate der GSK3 β sind (Seidenstricker und Behrens, 2000). Eine Phosphorylierung von Axin durch GSK3 β führt dabei zu einer Stabilisierung von Axin (Yamamoto *et al.*, 1999) und erleichtert die durch GSK3 β vermittelte Phosphorylierung von APC (Fagotto *et al.*, 1999; Hart *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von APC resultiert wiederum in einer verstärkten Bindung von β -Catenin (Fagotto *et al.*, 1999; Hart *et al.*, 1998; Rubinfeld *et al.*, 1996). Die Aktivität der GSK3 β ist daher für die Integrität des Komplexes von entscheidender Bedeutung. Die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β ist zudem

Voraussetzung für den Abbau von β -Catenin über das Ubiquitin-Proteasomen System (Aberle *et al.*, 1997; Jiang und Struhl, 1998; Marikawa und Elinson, 1998). Lange Zeit blieb unklar über welchen Mechanismus die Phosphorylierung erfolgt, da GSK3 β Substrate im allgemeinen ein sogenanntes „Priming“ durch eine zweite Kinase benötigen (Fiol *et al.*, 1987). Unter „Priming“ wird eine Vorphosphorylierung des Substrats verstanden, die der allgemeinen Konsensussequenz der GSK3 β entsprechend, an einem Serin- oder Threonin-Rest an Position 4 C-terminal zu der von GSK3 β phosphorylierten Aminosäure erfolgt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Vorphosphorylierung an der Aminosäure Serin 45 von β -Catenin durch die Proteinkinase CK1 erfolgt (früher Casein Kinase I) (Amit *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). CK1 wird dabei durch das Ankyrin-Repeat Protein Diversin an den Axin/Conductin-GSK3 β Komplex rekrutiert (Schwarz-Romond *et al.*, 2002). Die CK1-vermittelte Phosphorylierung von β -Catenin gilt nun als Voraussetzung für die nachfolgend sequentielle Phosphorylierung durch GSK3 β an Threonin 41, Serin 37 und Serin 33 (Amit *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Für die Interaktion mit dem β -TrCP/Slimb Komplex und die nachfolgende Einschleusung von β -Catenin in den Ubiquitin-Proteasomen Abbauweg ist die Phosphorylierung der Serine an Position 37 und 33 entscheidend (Hart *et al.*, 1999; Kitagawa *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999). Für CK1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass Axin-gebundene CK1 auch APC phosphoryliert und dies ebenfalls zu einem verstärkten Abbau von β -Catenin führt (Rubinfeld *et al.*, 2001).

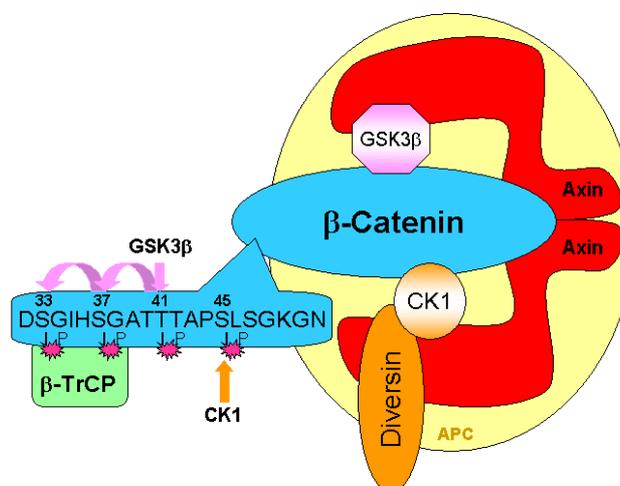


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des β -Catenin Degradationskomplexes.

1.4 Die Stabilisierung von β -Catenin in Wnt-stimulierten Zellen

Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt zur Destabilisierung des β -Catenin Degradationskomplexes, so dass β -Catenin nicht mehr in den Abbauweg eingeschleust werden kann und in der Folge in der Zelle akkumuliert. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Eine entscheidende Rolle spielt jedoch die Inhibition der GSK3 β , wodurch die Phosphorylierung der Komponenten des β -Catenin Degradationskomplexes unterbleibt und so die Stabilität des Komplexes beeinträchtigt wird.

In genetischen und entwicklungsbiologischen Experimenten wurde das cytoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled als ein in der Signaltransduktionskaskade direkt nach den Frizzled-Rezeptoren wirkendes Protein identifiziert. (Noordermeer *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1997). Jedoch wurde bisher keine direkte Interaktion mit Frizzled Rezeptoren nachgewiesen. Dishevelled gilt als intrazellulärer Verzweigungspunkt des Wnt/ β -Catenin- und des Wnt/JNK-Signalwegs (Boutros *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999). Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt zu einer Hyperphosphorylierung von Dishevelled, die durch verschiedene Kinasen, wie CK1, CK2 und PAR-1, katalysiert werden kann und zu einer Stabilisierung von β -Catenin führt (Gao *et al.*, 2002; Kishida *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 1999; Sakanaka *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001; Willert *et al.*, 1997). In Bezug auf CK1 stehen diese Beobachtungen jedoch im Gegensatz zu der unter 1.3 beschriebenen Rolle von CK1.

Die molekularen Mechanismen, über die die Aktivierung von Dishevelled zur Inhibition der GSK3 β führt, sind unklar. Es wurde gezeigt, dass Dishevelled mit Axin interagiert und dadurch die von Axin unterstützte Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β inhibiert (Kishida *et al.*, 1999). Die Interaktion von Dishevelled mit dem GSK3 β -bindendem Protein Frat-1/GBP trägt möglicherweise zusätzlich zur Inhibition von GSK3 β bei. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Überexpression von Frat-1/GBP zur Hemmung der GSK3 β und zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt (Yost *et al.*, 1998). Zudem wurde eine Interaktion von Frat-1/GBP mit Axin nachgewiesen (Salic *et al.*, 2000; Smalley *et*

al., 1999). Interessant war auch die Beobachtung, dass Axin nach Bindung von Wnt an den LRP-Frizzled Rezeptorkomplex an die Zellmembran transloziert und mit der cytoplasmatischen Domäne der LRP-Rezeptoren interagiert. Möglicherweise wird Axin so aus dem Degradationskomplex entfernt und trägt damit zur Destabilisierung des Komplexes bei (Mao *et al.*, 2001).

Neben den beschriebenen Kinasen sind auch Phosphatasen als Gegenspieler an der Weiterleitung des Signals beteiligt. In diesem Zusammenhang wurde für die Proteinphosphatase PP2C und PP2A gezeigt, dass sie in einem Komplex mit Dishevelled, β -Catenin und Axin vorliegen können und die Menge an β -Catenin regulieren (Ikeda *et al.*, 2000; Seeling *et al.*, 1999; Strovel und Sussman, 1999; Strovel *et al.*, 2000; Willert *et al.*, 1999). Jedoch gibt es widersprüchliche Aussagen in der Literatur zu einer aktivierenden oder inhibierenden Funktion von PP2A in der Wnt-Signaltransduktion (Li *et al.*, 2001; Seeling *et al.*, 1999; Willert *et al.*, 1999).

1.5 Der LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex

Eine weitere wichtige Regulationsebene im Wnt-Signalweg stellt der LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex dar. Er soll im folgenden näher beschrieben werden.

Die Stabilisierung von β -Catenin hat zur Folge, dass β -Catenin in den Zellkern transloziert, wo es mit Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie interagiert (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996; Molenaar *et al.*, 1996; van de Wetering *et al.*, 1997) und die Expression von Wnt-Zielgenen, wie z. B. Siamois (Brannon *et al.*, 1997), c-myc (He *et al.*, 1998), Cyclin D (Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu und McCormick, 1999) und c-jun (Mann *et al.*, 1999) aktiviert. Dabei stellt LEF-1/TCF die DNA-Bindungsdomäne und β -Catenin die Transaktivierungsdomäne.

1.5.1 Die Familie der LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren

LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren wurden ursprünglich bei der Suche nach T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren entdeckt. In Screening-Experimenten konnten zunächst TCF-1 (T-Cell Factor-1) als ein an den CD3 ϵ Enhancer-bindendes Protein und LEF-1 (Lymphoid Enhancer Factor-1) als ein an den TCR α (T-Cell Receptor α) Enhancer-bindendes Protein identifiziert werden (Oosterwegel *et al.*, 1991; Travis *et al.*, 1991; Waterman *et al.*, 1991). Später wurden mit TCF-3 und -4 zwei weitere Familienmitglieder beschrieben (Korinek *et al.*, 1998). Detaillierte Untersuchungen zur Expression von LEF-1/TCF-Proteinen ergaben, dass diese nicht auf Lymphozyten beschränkt sind, sondern viele Gewebe einen oder mehrere dieser Transkriptionsfaktoren exprimieren. Das komplexe Transkriptionsmuster während der embryonalen Entwicklung wies auf eine Beteiligung dieser Faktoren an Differenzierungsprozessen hin.

LEF-1/TCF-Proteine sind eine hochkonservierte Familie von Transkriptionsfaktoren. Ein gemeinsames Merkmal ist eine 80 Aminosäuren lange Domäne, die als „high mobility group“ oder kurz als HMG-Box bezeichnet wird (Grosschedl *et al.*, 1994; Laudet *et al.*, 1993). Die HMG-Box ist im C-terminalen Bereich der Proteine lokalisiert und stellt die DNA-Bindungsdomäne dar, mit der LEF-1/TCF-Proteine sequenzspezifisch an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix binden (Love *et al.*, 1995). Als DNA-Bindungsmotiv gilt dabei die Sequenz (A/T) (A/T) CAA (A/T) GG (Giese *et al.*, 1991; van Beest *et al.*, 2000; van de Wetering *et al.*, 1991). Ein weiteres gemeinsames Merkmal stellt die Bindungsstelle für β -Catenin im Bereich der 56 amino-terminalen Aminosäuren der LEF-1/TCF-Proteine dar.

LEF-1 unterscheidet sich von den meisten TCF-Familienmitgliedern in der Primärstruktur durch das Fehlen einer an die HMG-Box folgenden C-terminalen Domäne, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Es wird vermutet, dass TCF-Proteine über diese C-terminale Domäne einer zusätzlichen Regulation unterliegen. In diesem Zusammenhang wurde für TCF-3 und TCF-4 eine Interaktion mit dem C-terminalen Bindeprotein (CtBP) beschrieben, die zu einer verstärkten Repression der Transkription von Wnt-Zielgenen führt (Brannon *et al.*,

1999). Durch alternatives Splicen entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher Proteinvarianten, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Es gibt jedoch Hinweise, dass die alternativen Splicevarianten die Zelltyp-spezifischen Antworten auf ein Wnt-Signal modulieren können (Gradl *et al.*, 2002; Pukrop *et al.*, 2001).

Die Beobachtungen, dass die von der HMG-Box vermittelte Bindung eine starke Krümmung der DNA hervorruft und LEF-1/TCF-Proteine nicht direkt eine Transkriptionsaktivierung induzieren, lassen vermuten, dass diese Proteine in erster Linie eine architektonische Funktion haben.

Am TCR α Enhancer konnte jedoch gezeigt werden, dass LEF-1 über eine Kontext-abhängige Aktivierungsdomäne verfügt. Über diese Domäne interagiert LEF-1 mit dem Co-Faktor ALY, der durch seine Bindung an den Transkriptionsfaktor AML-1 (acute myeloid leukemia factor-1) (Bruhn *et al.*, 1997) die Transkriptionsaktivierung am TCR α Enhancer vermittelt (Carlsson *et al.*, 1993; Giese und Grosschedl, 1993).

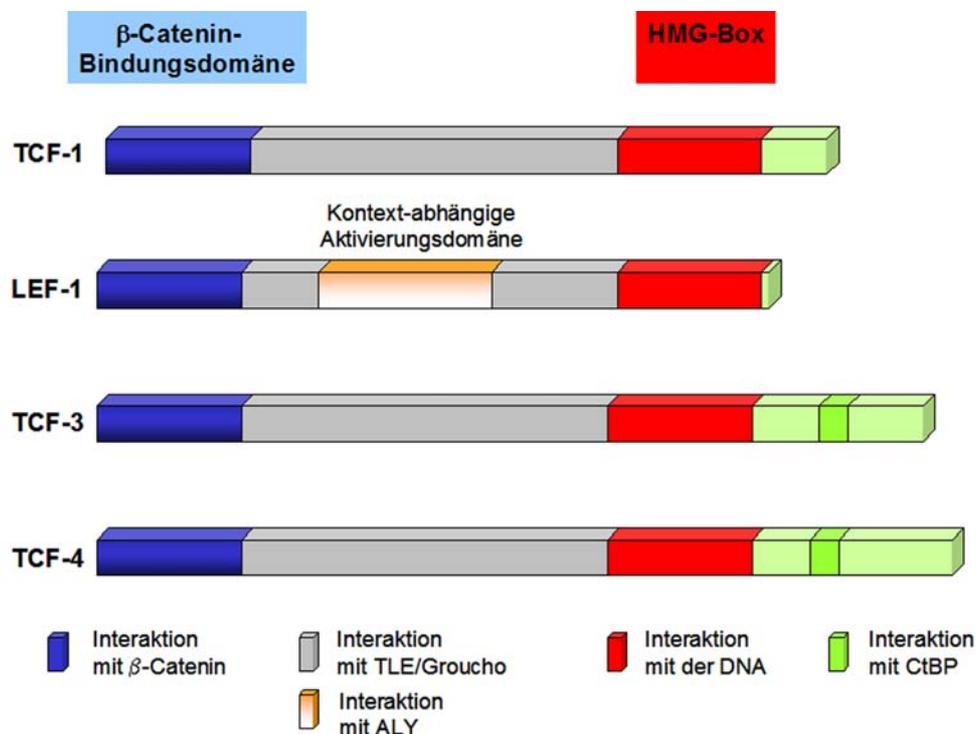


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Struktur der LEF-1/TCF-Proteine.

Die β -Catenin-bindende Domäne und die DNA-bindende HMG-Box sind innerhalb der Familie hochkonserviert. Die einzelnen TCF-Familienmitglieder unterscheiden sich vor allem in der Länge ihrer an die HMG-Box folgenden C-terminalen Domäne. LEF-1 fehlt die C-terminale Domäne.

Vor allem in entwicklungsbiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass LEF-1/TCF-Proteine in Abwesenheit eines Wnt-Signals als Repressoren von Wnt-Zielgenen wirken (Cavallo *et al.*, 1998; Riese *et al.*, 1997; Roose *et al.*, 1998). Durch Interaktion mit sogenannten Co-Repressoren kann dieser Einfluß verstärkt werden. Mitglieder der TLE/Groucho-Familie wurden als Co-Repressoren von LEF-1/TCF-Transkriptionsfaktoren beschrieben. In Reporter-gen-Assays konnte gezeigt werden, dass die Co-Expression verschiedener TLE/Groucho-Proteine die LEF-1/TCF- β -Catenin-vermittelte Transkription vollständig zu reprimieren vermag (Brantjes *et al.*, 2001; Cavallo *et al.*, 1998; Roose *et al.*, 1998). Dabei herrscht weitgehend Unklarheit darüber wie sich TLE/Groucho-Proteine und β -Catenin bei der Transkriptionsaktivierung bzw. -repression gegenseitig beeinflussen. Studien in *Drosophila* haben gezeigt, dass Groucho-Proteine die Histon-Deacetylase Rpd3 rekrutieren (Rpd3/HDAC) (Chen *et al.*, 1999). Rpd3/HDAC deacetyliert Lysin-Reste im N-terminalen Bereich der Nukleosomen-Histone und führt damit über bisher ungeklärte molekulare Mechanismen zu einer kompakteren Struktur des Chromatingerüsts. Die Deacetylierung über Rpd3/HDAC gilt heute als der primäre Mechanismus über den TLE/Groucho-Proteine wirken. Studien in Gegenwart des HDAC Inhibitors TSA (Trichostatin A) zeigten, dass die TLE/Groucho-vermittelte Repression zwar vermindert aber nicht aufgehoben werden konnte, so dass von einem komplexeren Mechanismus ausgegangen werden muss.

1.5.2 Die Transkriptionsregulation durch den LEF-1/TCF- β -Catenin Komplex

Die molekularen Mechanismen, über die der LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex die Transkription von Wnt-Zielgenen initiiert bzw. reguliert sind noch nicht genau verstanden. Als ein möglicher Mechanismus gilt die direkte Interaktion von β -Catenin mit TBP, dem TATA-Box bindendem Protein (Hecht *et al.*, 1999). TBP ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors IID (TFIID) und die Bindung von TBP an die TATA-Box von Promotoren gilt als initialer Schritt der Transkription durch die RNA Polymerase II.

In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die mit dem LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex interagieren und mittlerweile als Teil einer komplexen Transkriptionsmaschinerie angesehen werden. Durch

diese als Co-Faktoren wirkenden Proteine wird die Aktivität des LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplexes moduliert.

Mit dem als Adapterprotein fungierenden BCL9 (B cell lymphoma 9)/Legless Protein, welches an β -Catenin bindet und für die Rekrutierung von Pygopus sorgt, wurden kürzlich zwei für die LEF-1/TCF- β -Catenin vermittelte Signaltransduktion essentielle Komponenten identifiziert (Kramps *et al.*, 2002).

Ebenso konnten die beiden Proteine Pontin52 und Reptin52 als Interaktionspartner von β -Catenin identifiziert werden. Pontin52 und Reptin52 weisen eine starke Homologie zueinander auf und besitzen charakteristische, als Walker A und B Sequenzmotive bezeichnete ATP/GTP-Bindungsstellen. Ferner besteht eine geringe Homologie zu RuvB-ähnlichen DNA-Helicasen. Durch Reporter-gen-Analysen konnte gezeigt werden, dass Pontin52 und Reptin52 die Transkriptionsaktivität des LEF-1/TCF- β -Catenin Komplexes antagonistisch beeinflussen, wobei Pontin52 aktivierend und Reptin52 inhibierend wirkt. Dieser antagonistische Einfluss auf die Signalfunktion von β -Catenin konnte in genetischen Experimenten in *Drosophila* bestätigt werden (Bauer *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 1998).

β -Catenin interagiert darüber hinaus mit dem CREB-bindenden Protein (CBP). CBP besitzt eine Acetyltransferaseaktivität, die durch Acetylierung entsprechender Lysin-Reste in Nukleosomen-Histonen zu einer lokalen Lockerung der Chromatinstruktur führt (Ogryzko *et al.*, 1996). Für CBP liegen hinsichtlich seiner Funktion bei der LEF-1/TCF- β -Catenin vermittelten Transkription widersprüchliche Beobachtungen vor. So wurde für *Drosophila* CBP gezeigt, dass es durch Acetylierung von Pangolin, dem LEF-1 homologen Protein in *Drosophila* (Brunner *et al.*, 1997), die Transkriptionsaktivität reprimiert (Waltzer und Bienz, 1998). In *Xenopus*- und Zellkultur-Experimenten wurde jedoch eine aktivierende Funktion nachgewiesen (Hecht *et al.*, 2000; Takemaru und Moon, 2000).

Neben LEF-1/TCF konnte für Sox3 und Sox17 α/β , die ebenfalls in die Familie der HMG-Box Transkriptionsfaktoren eingeordnet werden, eine Interaktion mit β -Catenin nachgewiesen werden. Eine Überexpression dieser HMG-Box Proteine führte zu einer Reduktion der Aktivität des LEF-1/TCF- β -Catenin Komplexes und wird auf eine Konkurrenz von LEF-1/TCF und den Sox-Proteinen um β -Catenin zurückgeführt (Zorn *et al.*, 1999). Vergleichbare Einflüsse zeigen auch der

Retinsäurerezeptor (RAR) und der Androgenrezeptor, die ebenfalls als β -Catenin Interaktionspartner identifiziert wurden (Easwaran *et al.*, 1999; McGrew *et al.*, 1999; Pawlowski *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Das kürzlich identifizierte Protein ICAT (Inhibitor of β -Catenin and ICF-4) inhibiert die Wnt-Signaltransduktion, indem es die Bindung von β -Catenin an LEF-1/TCF verhindert (Daniels und Weis, 2002; Graham *et al.*, 2002; Tago *et al.*, 2000). Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob die Bindung von ICAT an β -Catenin auch die Bindung an die oben genannten Transkriptionsfaktoren inhibiert.

Mit der Beschreibung der Interaktion von Smad3 mit der HMG-Box von LEF-1 und der darauf beruhenden synergistischen Regulation des *Xenopus* Homeobox-Gens Twin durch den TGF β - und den Wnt-Signalweg zeigte sich, dass der LEF-1/ β -Catenin Komplex auch als Integrator verschiedener Signalwege dient (Labbe *et al.*, 2000).

1.6 Wnt-Signaling und Tumorgenese

Eine Fehlregulation des Wnt-Signalwegs ist entscheidend an der Entstehung von Tumoren beteiligt. β -Catenin spielt dabei eine zentrale Rolle. In einer Vielzahl menschlicher Tumore sind genetische Veränderungen zu finden, die zu einer Wnt-unabhängigen, dauerhaften Stabilisierung von β -Catenin im Cytoplasma und Zellkern und damit zu einem konstitutiv aktiven Signalweg führen (Korinek *et al.*, 1997; Morin, 1999; Peifer, 1997). In der Folge kommt es zu einer fehlgesteuerten Transkription von Wnt-Zielgenen, die durch den LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex reguliert werden, wie z. B. c-myc (He *et al.*, 1998), Cyclin D (Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu und McCormick, 1999) und c-jun (Mann *et al.*, 1999). Dies resultiert in einer übermäßigen und unkontrollierten Proliferation von Zellen.

Den ersten Hinweis auf das onkogene Potential von β -Catenin lieferte die Beobachtung, dass APC mit β -Catenin interagiert und Zellen mit mutierten APC eine starke cytoplasmatische Akkumulation von β -Catenin aufweisen. So zeigten unter anderem Untersuchungen an Colocarzinomen und davon abgeleiteten Zelllinien, dass Mutationen von APC mit einem hohen Level an freiem, nicht

Cadherin-assoziierten, cytoplasmatischen und nukleären β -Catenin einhergehen. Durch die Expression von Wildtyp APC konnte in diesen Zellen der hohe cytoplasmatische bzw. nukleäre Pool von β -Catenin reduziert werden (Munemitsu *et al.*, 1995). Damit übereinstimmend wurde in diesen Zelllinien die hohe onkogene Aktivität des LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplexes durch die Transfektion von intaktem APC reduziert (Korinek *et al.*, 1997). Die Bedeutung dieses Pathomechanismus zeigte sich in der Beobachtung, dass 80-85 % aller spontan auftretenden colorectalen Tumore Mutationen im APC Tumorsuppressorgen aufweisen (Kinzler und Vogelstein, 1996). Heute gilt es als gesichert, dass die tumorsuppressive Wirkung von APC aus einer Schlüsselfunktion des Proteins bei der Regulation der Menge und der Lokalisierung von β -Catenin in der Zelle resultiert (Smits *et al.*, 1999; von Kries *et al.*, 2000). In colorectalen Carcinomen, die keinen Funktionsverlust von APC zeigen, werden häufig Punktmutationen in β -Catenin gefunden. Diese betreffen unter anderem die kritischen Serin- und Threonin-Reste von β -Catenin, die durch GSK3 β phosphoryliert werden (Morin *et al.*, 1997). Durch Austausch bzw. Deletion nur einer dieser Aminosäuren unterbleibt die effiziente Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β und damit der kontinuierliche Abbau von β -Catenin über das Ubiquitin-Proteasomen System. Mutationen dieser Art konnten außer in Colonicarcinomen auch in einer Reihe weiterer Tumore gefunden werden, so z. B. in Melanomen, hepatozellulären Carcinomen, Pilomatricomen und Lungencarcinomen (Polakis, 2000; Rubinfeld *et al.*, 1997b). In hepatozellulären Carcinomen ohne aktivierende Mutationen im β -Catenin Gen, konnten zudem Mutationen in Axin nachgewiesen werden (Sato *et al.*, 2000). Daneben wurden in colorectalen Carcinomen mit intaktem APC auch Mutationen in Conductin gefunden (Liu *et al.*, 2000). All diese Mutationen führen zu einer Stabilisierung von β -Catenin und einer fehlgesteuerten Expression von Wnt-Zielgenen. Axin und Conductin wird daher, wie APC, eine tumorsuppressive Funktion zugeschrieben.

Die Wnt-unabhängige Stabilisierung von β -Catenin durch das Auftreten von Mutationen in APC, β -Catenin, Axin und Conductin und die resultierende Fehlverteilung des Proteins machen deutlich, dass die Zelle über präzise Mechanismen verfügen muss, durch die die Menge und Verteilung von β -Catenin

und damit die Wechselwirkung von β -Catenin mit verschiedenen Interaktionspartnern kontrolliert werden. Als wichtige, zentrale Regulationsebenen des Wnt-Signalwegs werden in diesem Zusammenhang der β -Catenin Degradationskomplex im Cytoplasma, sowie der LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex im Kern angesehen. Sie stellen daher mögliche therapeutische Angriffspunkte dar. Insbesondere der LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex rückte dabei in den Mittelpunkt des Interesses.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die duale Rolle von β -Catenin bei der Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion und bei der Wnt-Signaltransduktion, sowie der Nachweis der zentralen Bedeutung für Carcinogeneseprozesse, richten ein primäres Interesse der derzeitigen Forschung auf die Aufklärung der Regulationsmechanismen, die die Menge und Verteilung von β -Catenin und damit die Wechselwirkung von β -Catenin mit verschiedenen Interaktionspartnern kontrollieren. Phosphorylierungsereignisse spielen dabei eine bedeutende Rolle (siehe 1.3 und 1.4). Über den LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplex lagen in dieser Hinsicht keine Erkenntnisse vor. Es war daher das Ziel der Arbeit, den LEF-1/ β -Catenin Transkriptionskomplex unter diesen Gesichtspunkten genauer zu untersuchen. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Wird LEF-1 in der Zelle durch Proteinkinasen phosphoryliert?
- Handelt es sich dabei um Serin/Threonin- oder Tyrosin-Kinasen?
- Welche Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von LEF-1?
- Welchen Einfluss haben die Phosphorylierungsereignisse auf die Stabilität und Aktivität des LEF-1/ β -Catenin Transkriptionskomplexes?

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten zu einem besseren Verständnis der an der Regulation des LEF-1/ β -Catenin Transkriptionskomplexes beteiligten Mechanismen beitragen.