

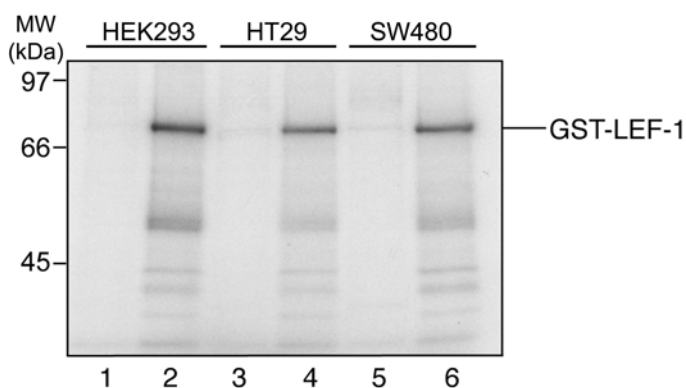
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung und Charakterisierung LEF-1 assoziierter Kinasen

#### 4.1.1 Nachweis LEF-1 assoziierter Kinasen

Zur Identifizierung LEF-1 assoziierter Kinasen, wurde LEF-1 als Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein exprimiert und mit Zelllysaten von HEK293, HT29 sowie SW480 inkubiert. GST-LEF-1 und daran assoziierte Proteine wurden mit Hilfe von Glutathion-Agarose Beads aus dem Zelllysat rückisoliert. Um zu testen, ob die isolierten Proteinkomplexe eine Kinaseaktivität enthalten, wurden die Beads mit radioaktivem  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$  versetzt. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie. Auf dem Röntgenfilm zeigte sich unabhängig vom verwendeten Zelllysat eine hochphosphorylierte Bande bei ca. 70 kDa, die in ihrer Molekülmasse GST-LEF-1 entsprach. In Kontrollen mit dem GST-Protein (ca. 30 kDa) konnte keine Kinaseaktivität nachgewiesen werden.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde erhalten, wenn die mit GST-LEF-1 präzipitierten Proteine vor der Kinasierungsreaktion mit einem Hochsalzpuffer von den Glutathion-Agarose Beads eluiert wurden und das verdünnte Eluat im Anschluss mit GST-LEF-1 in Phosphorylierungsassays eingesetzt wurde (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Isolierung LEF-1 assoziierter Kinasen.**

GST-LEF-1 interagierende Kinasen wurden über GSH-Agarose Beads aus HEK293 (Lane 1 und 2), HT29 (Lane 3 und 4) und SW480 (Lane 5 und 6) Lysat isoliert, mit Hochsalzpuffer eluiert und im *in vitro* Phosphorylierungsassay mit  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$  und GST-LEF-1 als Substrat (Lane 2, 4, 6) oder GST als Kontrolle (Lane 1, 3, 5) eingesetzt. Nach SDS-PAGE wurde durch Autoradiographie auf eine vorhandene Kinaseaktivität analysiert.

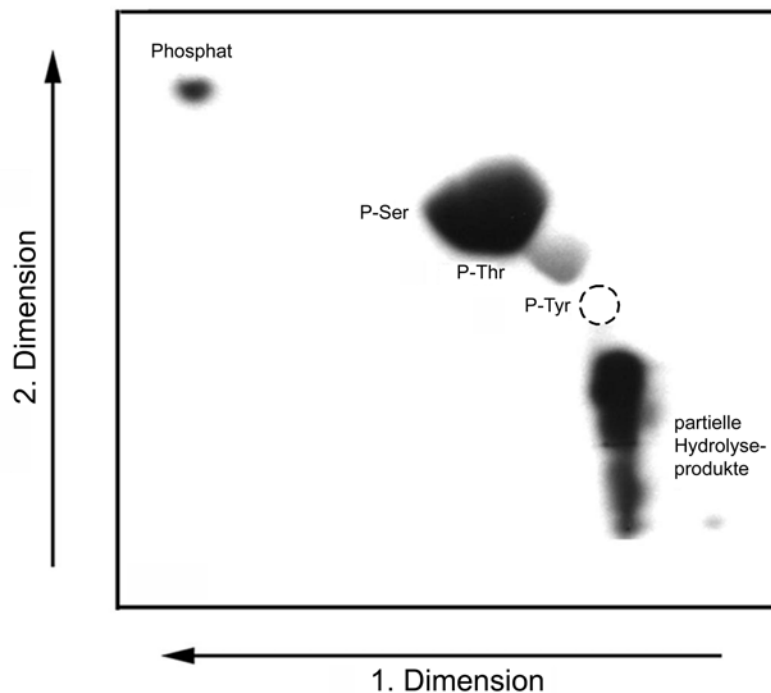
Diese Versuche zeigten, dass LEF-1 Substrat einer oder mehrerer Proteinkinasen ist und diese mit GST-LEF-1 Fusionsprotein aus Zelllysaten isoliert werden können.

#### **4.1.2 Charakterisierung der LEF-1 assoziierten Kinase(n) als Mitglied(er) der Serin/Threonin Proteinkinase Familie**

Um die mit LEF-1 interagierenden Kinasen der Familie der Serin/Threonin- bzw. Tyrosin-Proteinkinasen zuordnen zu können, wurde eine Phosphoaminosäure-Analyse durchgeführt.

Dazu wurde GST-LEF-1 zunächst mit den aus HT29 Lysat isolierten Kinasen unter Zugabe von  $^{32}\text{P}_\gamma\text{ATP}$  phosphoryliert und im Anschluss durch saure Hydrolyse in die einzelnen Aminosäuren gespalten. Die Aminosäuren des Hydrolysats wurden zusammen mit den Referenz-Aminosäuren Phospho-Serin (P-Ser), Phospho-Threonin (P-Thr) und Phospho-Tyrosin (P-Tyr) durch zweidimensionale Hochspannungselektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Detektion der phosphorylierten Aminosäuren durch Autoradiographie bzw. im Falle der Referenz-Phosphoaminosäuren durch Färbung mit Ninhydrin. Durch Vergleich der Lokalisation der phosphorylierten Aminosäuren der Probe mit der der Referenz-Phosphoaminosäuren, konnten die in GST-LEF-1 phosphorylierten Aminosäuren identifiziert werden.

Das Ergebnis einer derartigen Phosphoaminosäure-Analyse ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass durch die aus HT29 Zellen isolierte(n) Kinase(n) bevorzugt Serine und im wesentlich geringeren Maße die Aminosäure Threonin in LEF-1 phosphoryliert werden. Eine Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin war nicht detektierbar. So konnte als Ergebnis der Phosphoaminosäure-Analyse festgehalten werden, dass die mit dem GST-LEF-1 Fusionsprotein assoziierte(n) Kinase(n) zur Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen gehören.



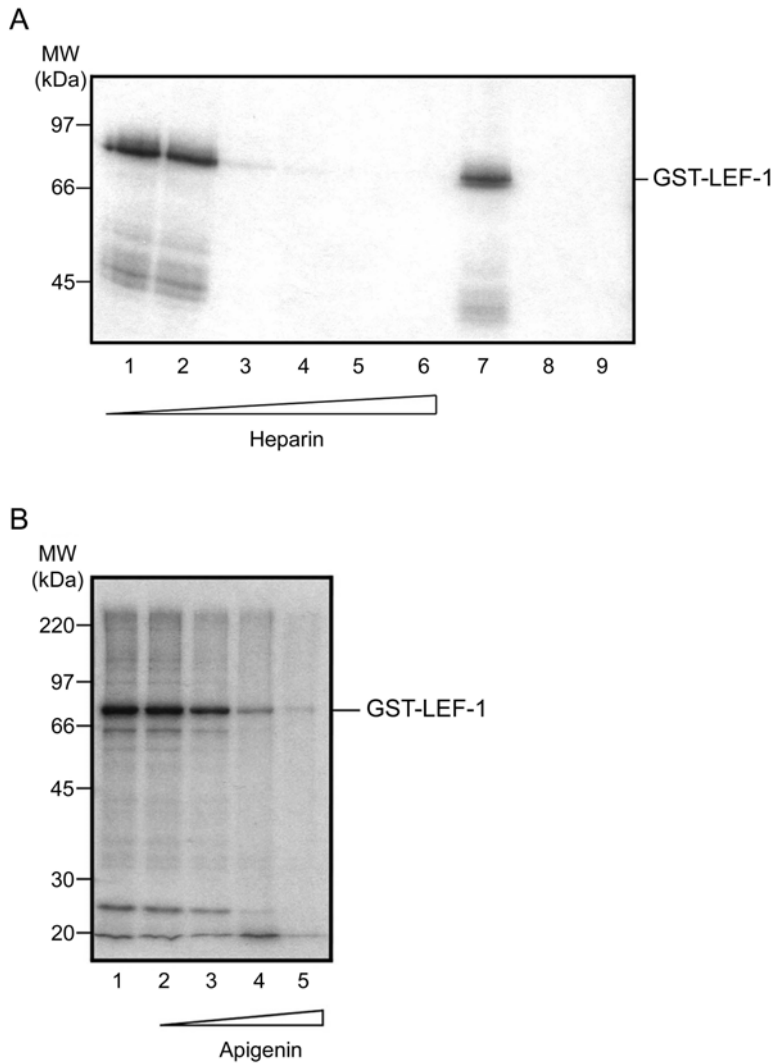
**Abb. 4.2: Phosphoaminosäure-Analyse von LEF-1.**

GST-LEF-1 wurde mit aus HT29 Lysat isolierten Kinasen in Gegenwart von  $^{32}\text{P}_\gamma\text{ATP}$  phosphoryliert. Nach saurer Hydrolyse wurde das Aminosäuregemisch über zweidimensionale Hochspannungs-Dünnschichtelektrophorese aufgetrennt und die phosphorylierten Aminosäuren durch Autoradiographie detektiert.

#### 4.1.3 Identifizierung der Kinase(n)

Die Aminosäuresequenz von LEF-1 wurde im nächsten Schritt auf Konsensusmotive für Serin/Threonin-Proteinkinasen untersucht. Dabei fanden sich eine Reihe potentieller Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase CK2 (früher: Casein Kinase II). CK2 phosphoryliert Serin- (S) bzw. Threonin- (T) Reste, denen C-terminal die saure Aminosäure Aspartat (D) oder Glutamat (E) folgt. Das in der Literatur beschriebene, allgemeine Konsensusmotiv lautet dabei wie folgt: S/T XX D/E, S/T X D/E oder S/TD/E, wobei „X“ für einen variablen Aminosäurerest steht.

Ob LEF-1 tatsächlich ein Substrat der CK2 ist, wurde durch Kinasierungsassays in Gegenwart von Inhibitoren getestet. Zum Einsatz kamen dabei Heparin und Apigenin, die als spezifische Inhibitoren der CK2 beschrieben wurden (Critchfield *et al.*, 1997; Hathaway *et al.*, 1980). Wie in Abbildung 4.3 gezeigt, konnte die Phosphorylierung von GST-LEF-1 dosisabhängig durch beide Inhibitoren gehemmt werden.

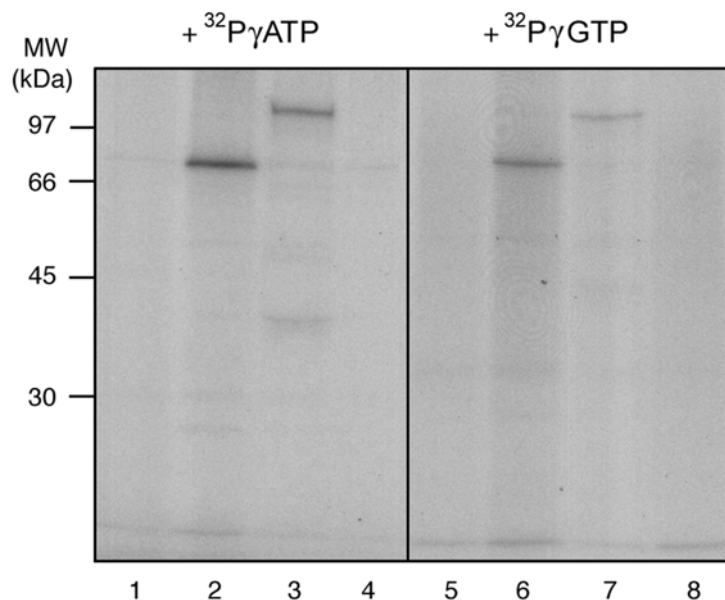


**Abb. 4.3: Phosphorylierung von LEF-1 in Gegenwart spezifischer CK2 Inhibitoren.**

A) Phosphorylierungsassay mit aus HT29 Lysat isolierten Kinasen in Gegenwart steigender Konzentrationen Heparin (Lane 1, 1,2 mU; Lane 2, 12 mU; Lane 3, 0,12 U; Lane 4, 1,2 U; Lane 5, 12 U; Lane 6, 60 U Heparin; Lane 7, Kontrolle; Lane 8 und 9, Kontrollansätze mit GST und GST + 60 U Heparin). B) Phosphorylierung von GST-LEF-1 mit gereinigter, rekombinanter CK2 in Gegenwart steigender Konzentrationen Apigenin (Lane 1, Kontrolle; Lane 2, 0,1  $\mu$ M; Lane 3, 1,0  $\mu$ M; Lane 4, 10,0  $\mu$ M; Lane 5, 0,1 mM Apigenin).

CK2 besitzt im Vergleich zu anderen Serin/Threonin-Kinasen die besondere Eigenschaft, neben ATP auch GTP mit nahezu gleicher Effizienz als Phospho-Donor zu verwenden (Tuazon und Traugh, 1991). Diese charakteristische Eigenschaft wurde herangezogen, um zu bestätigen, dass CK2 eine LEF-1 Kinase darstellt. Dazu wurden Phosphorylierungsassays mit aus HT29 isolierten Kinasen unter Zugabe von radioaktivem  $^{32}\text{P}_\gamma\text{GTP}$  durchgeführt. In Übereinstimmung mit den vorherigen Befunden wurde GST-LEF-1 in Gegenwart von  $^{32}\text{P}_\gamma\text{GTP}$  phosphoryliert, aber mit einer geringeren Effizienz als mit  $^{32}\text{P}_\gamma\text{ATP}$  (siehe Abb. 4.4).

In weiteren Kinasierungsassays sollte zudem die Spezifität der Phosphorylierung getestet werden. Dazu wurde neben GST-LEF-1 auch GST- $\beta$ -Catenin und GST-Pontin52 Fusionsproteine als weitere Substrate eingesetzt. GST- $\beta$ -Catenin wurde sowohl in Gegenwart von  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$  als auch von  $^{32}\text{P}\gamma\text{GTP}$  phosphoryliert, wobei das Phosphorylierungssignal mit radioaktivem  $^{32}\text{P}\gamma\text{GTP}$ , ähnlich wie bei GST-LEF-1, schwächer war. Dies stimmt mit neusten Ergebnissen aus der Literatur überein, wonach  $\beta$ -Catenin als Substrat der CK2 beschrieben wurde (Bek und Kemler, 2002; Song *et al.*, 2000). GST-Pontin52 wurde hingegen weder in der Gegenwart von  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ , noch in der Gegenwart von  $^{32}\text{P}\gamma\text{GTP}$  phosphoryliert (siehe Abb. 4.4).



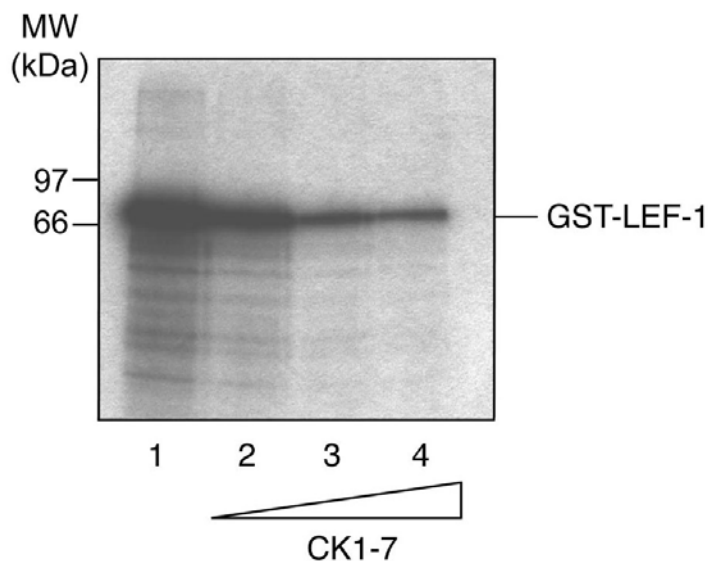
**Abb. 4.4: Spezifität der Phosphorylierung (CK2 phosphoryliert GST-LEF-1 und GST- $\beta$ -Catenin).**

Phosphorylierungsassays mit aus HT29 isolierten Kinasen. GST-LEF-1 (Lane 2 und 6) und GST- $\beta$ -Catenin (Lane 3 und 7), nicht aber GST-Pontin52 (Lane 4 und 8) werden in Gegenwart von  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$  bzw.  $^{32}\text{P}\gamma\text{GTP}$  phosphoryliert. Eine Phosphorylierung von GST (Lane 1 und 5) konnte nicht detektiert werden.

Die Inhibitorstudien mit Heparin und Apigenin, sowie die Phosphorylierungsassays unter Verwendung von radioaktivem  $^{32}\text{P}\gamma\text{GTP}$  gaben einen guten Hinweis, dass LEF-1 ein Substrat der CK2 darstellt. Die stärkere Phosphorylierung von GST-LEF-1 und GST- $\beta$ -Catenin in Gegenwart von  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$  im Vergleich zu  $^{32}\text{P}\gamma\text{GTP}$  wies aber darauf hin, dass eine oder weitere Kinase(n) aus dem HT29 Lysat an das GST-LEF-1 Fusionsprotein binden.

Die Aminosäuresequenz von LEF-1 weist neben den potentiellen CK2-Phosphorylierungsstellen zudem Konsensussequenzen für die Proteinkinase CK1 (früher: Casein Kinase I) auf. Im Gegensatz zu CK2 phosphoryliert CK1 Serin- bzw. Threonin-Reste, die amino-terminal die sauren Aminosäuren Aspartat (D) oder Glutamat (E) aufweisen. Ein allgemeines Konsensusmotiv lautet dabei: D/E XX S/T. Ein allgemeines Konsensusmotiv lautet dabei: D/E XX S/T.

Durch Einsatz des spezifischen CK1 Inhibitors CK1-7 (Chijiwa *et al.*, 1989), sollte herausgefunden werden, ob LEF-1 tatsächlich durch CK1 phosphoryliert werden kann. Sowohl in Kinasierungsassays mit aus HT29 Lysat isolierten Kinasen als auch in Versuchen mit gereinigter, rekombinanter CK1 $\delta$  (siehe Abb. 4.5) konnte durch CK1-7 dosisabhängig die Phosphorylierung von GST-LEF-1 gehemmt werden. Damit lag ein starker Hinweis vor, dass auch CK1 als LEF-1 phosphorylierende Kinase wirkt.

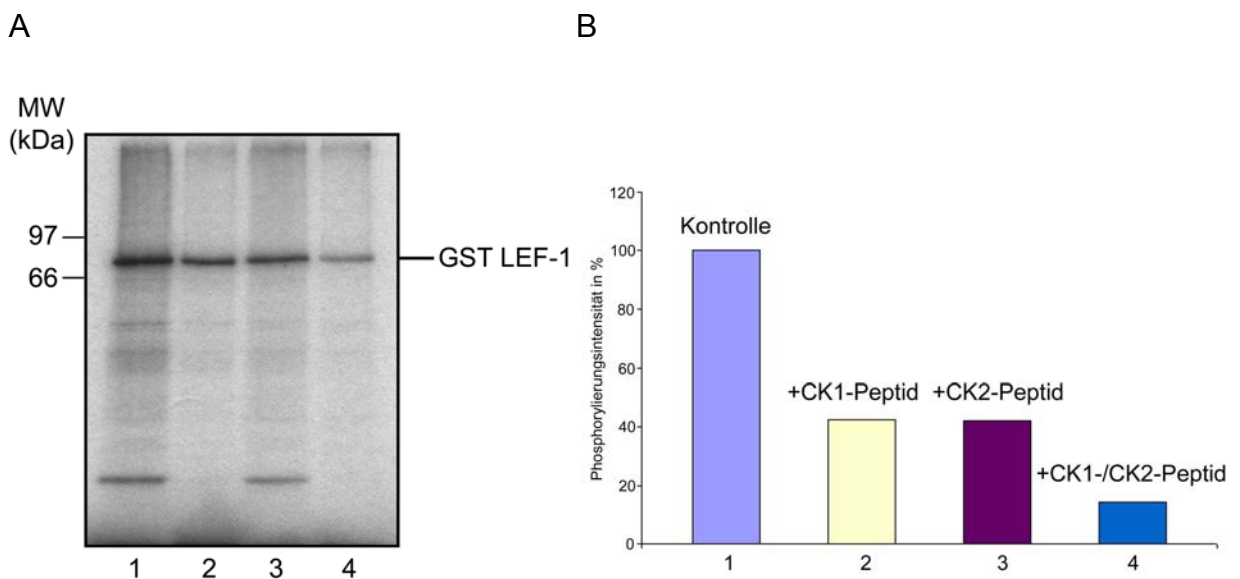


**Abb. 4.5: Phosphorylierung von LEF-1 in Gegenwart des spezifischen CK1 Inhibitors CK1-7.**

Die Phosphorylierung von GST-LEF-1 durch rekombinante CK1 $\delta$  wird durch steigende Konzentrationen des CK1 Inhibitors CK1-7 inhibiert (Lane 1, Kontrolle; Lane 2, 0,1 mM; Lane 3, 0,5 mM; Lane 4, 1,0 mM CK1-7).

Um zu bestätigen, dass CK2 und CK1 mit GST-LEF-1 Fusionsprotein aus HT29 Zellen isoliert wurden und beide Kinasen GST-LEF-1 phosphorylieren, wurde die Phosphorylierung von LEF-1 in Gegenwart spezifischer, synthetischer CK1- bzw. CK2-Substratpeptide untersucht. Die Substratpeptide kompetieren dabei mit LEF-1 um die Phosphorylierung durch CK1 und CK2. Es zeigte sich, dass sowohl

die Zugabe des spezifischen CK1-Phospho-Substratpeptides als auch die Zugabe des spezifischen CK2-Substratpeptides die Phosphorylierung von GST-LEF-1 durch die aus den HT29 Lysat isolierten Kinasen deutlich inhibierte. Die Quantifizierung der Phosphorylierungsraten im Phospho-Imager zeigte eine Reduktion der Phosphorylierung auf rund 40 % in Gegenwart des CK1- oder des CK2-Peptides. Beide Substratpeptide zusammen führten zu einer noch weiter verstärkten Hemmung der Phosphorylierung von GST-LEF-1 auf 15 % (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Phosphorylierung von LEF-1 in Gegenwart spezifischer CK1- bzw. CK2-Substratpeptide.**

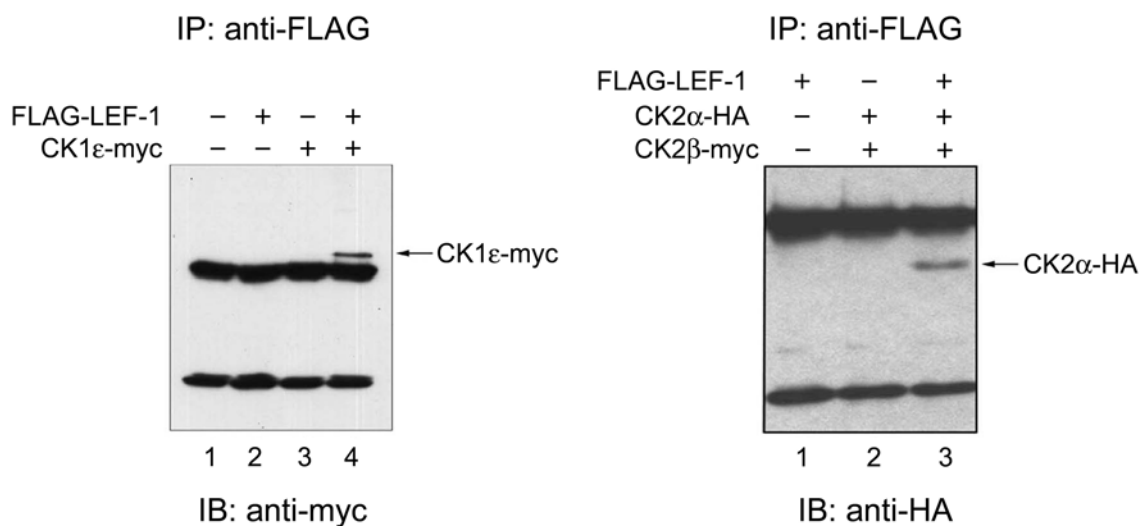
A) Phosphorylierungsassay mit aus HT29 isolierten Kinasen in Gegenwart von  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$  und spezifischen Substratpeptiden (Lane 1, Kontrolle; Lane 2, 0,7 mM CK1-Phospho-Substratpeptid, Lane 3, 0,7 mM CK2-Substratpeptid, Lane 4: 0,7 mM CK1- + 0,7 mM CK2-Substratpeptid). B) Quantitative Auswertung des unter A) gezeigten Phosphorylierungsassays im Phospho-Imager.

Das Ergebnis dieses Phosphorylierungsassays zeigte, dass die Phosphorylierung von GST-LEF-1 mit spezifischen Substratpeptiden für CK1 und CK2 kompetitiert werden kann. Damit wurde bestätigt, dass sowohl CK1 als auch CK2 aus HT29 Lysat mit dem GST-LEF-1 Fusionsprotein präzipitiert und isoliert werden können und im Kinasierungsassay zu einer Phosphorylierung von GST-LEF-1 führen.

#### 4.1.4 Nachweis von zellulären LEF-1/CK1 und LEF-1/CK2 Komplexen

Nachdem CK1 und CK2 als LEF-1 assoziierte Kinasen identifiziert worden waren, sollte im nächsten Schritt durch Co-Immunopräzitationsexperimente nachgewiesen werden, dass LEF-1 in Zellen im Komplex mit CK1 und CK2 vorliegt.

Dazu wurden HEK293 Zellen in verschiedenen Kombinationen mit den Expressionsplasmiden pFLAG/CMV4-LEF-1, pCS2+CK1 $\epsilon$ -myc, pRc/CMV-HA-CK2 $\alpha$  + pRc/CMV-myc-CK2 $\beta$  transient transfiziert. Nach Lyse der Zellen wurde LEF-1 über das FLAG-Tag mit dem anti-FLAG M2 Antikörper und Protein A-Sepharose Beads präzipitiert. Das Immunopräzipitat wurde über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. CK1 $\epsilon$  wurde dabei mit dem anti-myc (9E10) Antikörper und CK2 mit dem anti-HA (12CA5) Antikörper nachgewiesen. Eine Co-Immunopräzitation von CK1 $\epsilon$  und LEF-1 bzw. CK2 und LEF-1 konnte nur detektiert werden, wenn Zellen sowohl mit FLAG-LEF-1 als auch mit der jeweiligen Kinase transfiziert wurden, nicht aber wenn FLAG-LEF-1 oder CK1 $\epsilon$  bzw. CK2 allein transfiziert wurden (Abb. 4.7).



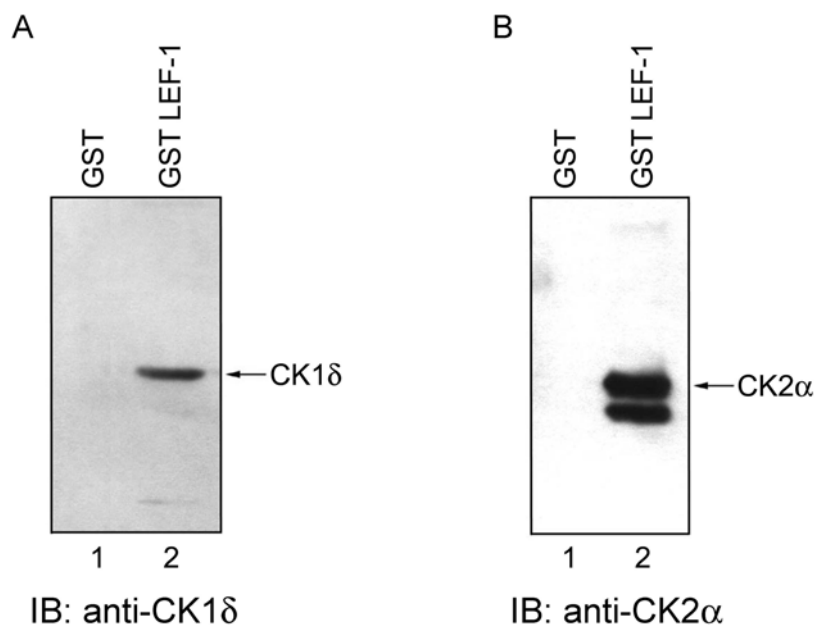
**Abb. 4.7: Co-Immunopräzitation von CK1 und CK2 mit LEF-1.**

HEK293 Zellen wurden mit pFLAG/CMV4-LEF-1, pCS2+CK1 $\epsilon$ -myc und/oder pRc/CMV-HA-CK2 $\alpha$  + pRc/CMV-myc-CK2 $\beta$  transient transfiziert. Die Immunopräzitation von FLAG-LEF-1 erfolgte mit dem anti-FLAG M2 Antikörper. Co-präzipitierte CK1 $\epsilon$  (A) oder CK2 (B) wurden mit dem anti-myc (9E10) Antikörper oder mit dem anti-HA (12CA5) Antikörper detektiert.



#### 4.1.5 Direkte Assoziation von CK1 und CK2 mit LEF-1

Um nachzuweisen, dass CK1 und CK2 direkt mit LEF-1 interagieren und nicht andere Proteine wie z. B.  $\beta$ -Catenin als Linkermoleküle vorliegen, wurden Bindungsstudien mit GST-LEF-1 Fusionsprotein und rekombinant exprimierter, gereinigter CK1 $\delta$  oder CK2 durchgeführt. GST-LEF-1 wurde dazu mit rekombinanter Kinase inkubiert und im Anschluss über Glutathion-Agarose Beads isoliert. Nach elektrophoretischer Auftrennung über ein SDS-PAGE wurde die Interaktion mit Antikörpern gegen die jeweilige Kinase im Western Blot nachgewiesen. CK1 $\delta$  (49 kDa) wurde mit einem gegen den N-Terminus gerichteten, polyklonalen Anti-Peptid Antikörper detektiert. Der Nachweis der Bindung von CK2, die aus zwei katalytischen  $\alpha$ -Untereinheiten (40-44 kDa) und zwei regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten (26 kDa) aufgebaut ist, erfolgte über einen monoklonalen Antikörper gegen die  $\alpha$ -Untereinheit. Wie in Abbildung 4.8 gezeigt, binden sowohl CK1 $\delta$  als auch CK2 direkt an GST-LEF-1.

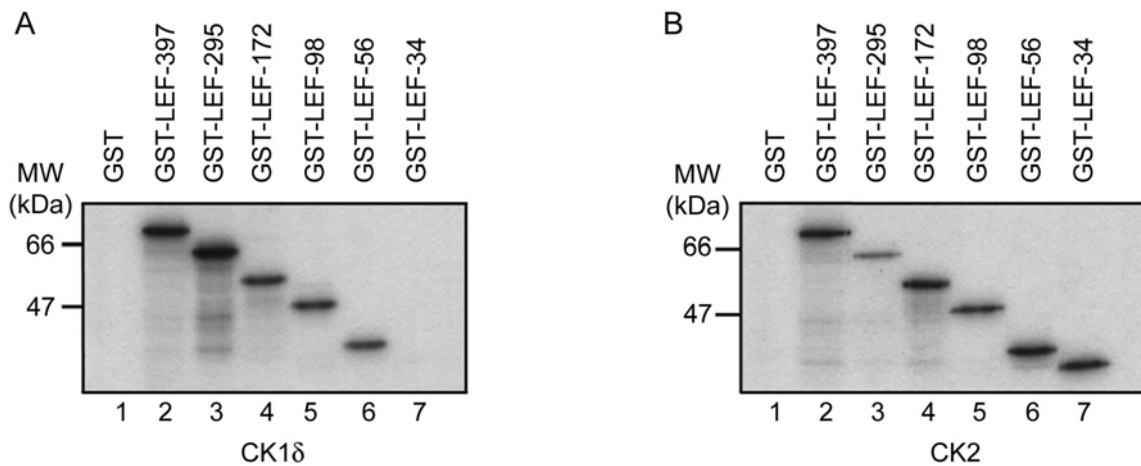


**Abb. 4.8: CK1 und CK2 interagieren direkt mit LEF-1.**

GST (Lane 1) und GST-LEF-1 (Lane 2) wurden mit rekombinant exprimierter CK1 $\delta$  (A) bzw. CK2 (B) inkubiert. Die sich ausbildenden Proteinkomplexe wurden im Anschluss über GSH-Agarose Beads isoliert. Nach SDS-PAGE erfolgte die Detektion im Western Blot mit anti-CK1 $\delta$  Antikörper (A) bzw. mit anti-CK2 $\alpha$  Antikörper (B).

#### 4.1.6 Phosphorylierung von LEF-1 Deletionskonstrukten

Im nächsten Schritt sollten die Phosphorylierungsstellen von CK1 bzw. CK2 in LEF-1 mit Hilfe von GST-LEF-1 Deletionskonstrukten näher eingengt werden. Dazu wurden gleiche Proteinmengen der C-terminal verkürzten GST-LEF-1 Fusionsproteine mit gereinigter, rekombinanter CK1 $\delta$  bzw. CK2 in Gegenwart von  $^{32}\text{P}_\gamma\text{ATP}$  inkubiert und im Anschluss über Glutathion-Agarose Beads isoliert. Nach SDS-PAGE wurde die Phosphorylierung durch Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Phosphorylierung von LEF-1 und seinen Deletionskonstrukten durch rekombinante CK1 $\delta$  bzw. CK2.**

Kinasierungsassay mit GST als Kontrolle (Lane 1), GST-LEF-1 (Lane 2) und den C-terminal verkürzten GST-LEF-1 Konstrukten (Lane 3-7) - A) mit rekombinanter CK1 $\delta$  B) mit rekombinanter CK2. Die jeweils C-terminale Aminosäure der verschiedenen LEF-1 Deletionskonstrukte ist als Aminosäureposition angegeben. Dabei entspricht GST-LEF-397 dem Volllängenprotein.

Die Abbildung zeigt, dass die Phosphorylierung nicht auf bestimmte Bereiche des Proteins beschränkt ist. Neben GST-LEF-1 wurden auch die GST-LEF-1 Deletionskonstrukte von rekombinanter CK1 $\delta$  bzw. CK2 phosphoryliert.

Im Unterschied zu CK2, die alle Deletionskonstrukte phosphorylierte, findet mit CK1 $\delta$  im Bereich der N-terminalen 34 Aminosäuren keine Phosphorylierung statt. Dies stimmt mit den potentiell vorhandenen Phosphorylierungsstellen für CK1 und CK2 in LEF-1 überein. Die ersten 34 Aminosäuren des N-Terminus zeigen dabei nur eine potentielle Phosphorylierungsstelle für CK2.

In diesem Zusammenhang soll zudem erwähnt werden, dass es mit den

Deletionskonstrukten nicht möglich war, CK1 und CK2 aus dem Zellysate zu präzipitieren (nicht gezeigt). Möglicherweise fehlen den Deletionskonstrukten Interaktionsstellen, die eine hochaffine Bindung an CK1 und CK2 nicht mehr erlaubt.

## **4.2 Die funktionelle Charakterisierung der CK1- und CK2-abhängigen Phosphorylierung von LEF-1**

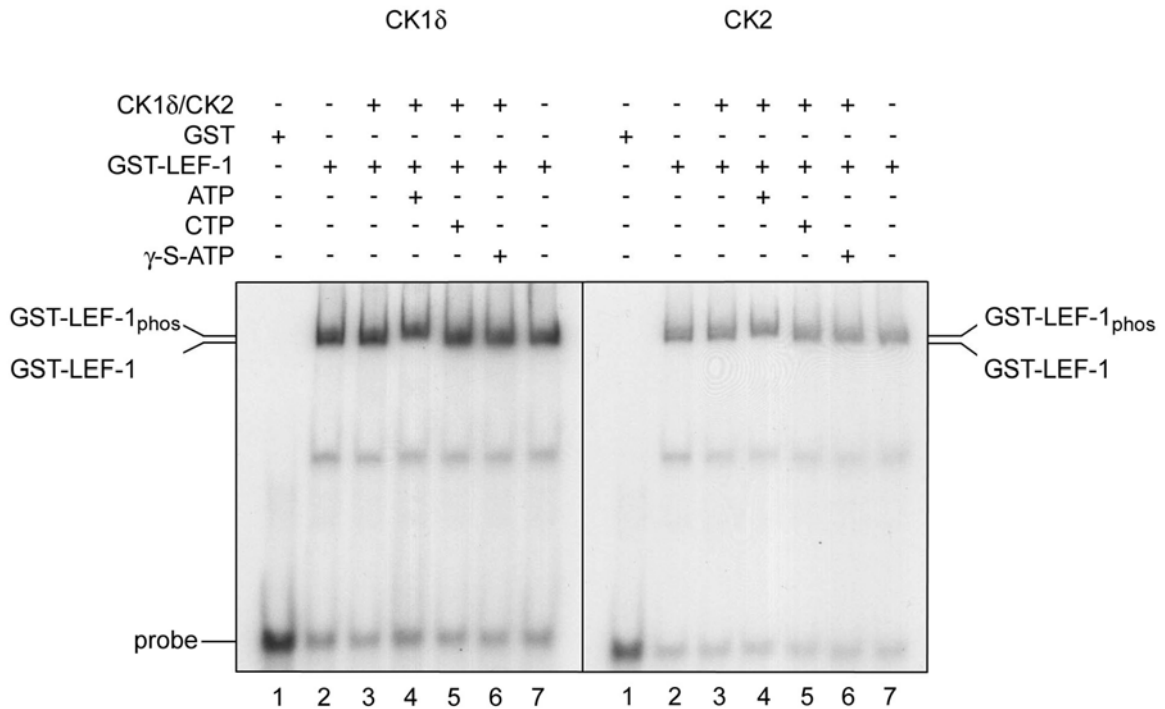
Nachdem eine direkte Interaktion von LEF-1 mit CK1 und CK2 nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, welche Auswirkungen eine Phosphorylierung durch diese beiden Kinasen auf die Funktion von LEF-1 und den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex hat. Dazu wurden elektrophoretische Mobilitätsshift-Assays durchgeführt.

### **4.2.1 Die phosphorylierungsabhängige Veränderung der Struktur des LEF-1/DNA Komplexes**

In ersten Ansätzen sollte zunächst die DNA-Bindung von LEF-1 in Abhängigkeit der CK1 und CK2 Phosphorylierung analysiert werden. Dazu wurde GST-LEF-1 in verschiedenen Kombinationen mit gereinigter, rekombinanter CK1 $\delta$  oder CK2 in Gegenwart oder Abwesenheit von ATP vorinkubiert und anschließend mit einem radioaktiv-markierten LEF-DNA-Fragment inkubiert. Als DNA-Fragment wurde ein 31 Basen langes Oligonukleotidpaar aus dem T-Brachyury Promotor eingesetzt, das eine charakteristische LEF-1/TCF Bindungsstelle enthält, die an der Wnt-abhängigen Regulation des T-Brachyury Promotors beteiligt ist (Arnold *et al.*, 2000). Die entstehenden Protein-DNA Komplexe wurden anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie über Nacht analysiert.

Dabei zeigte sich, dass GST-LEF-1, nicht aber das GST-Protein als Kontrolle, an die DNA bindet und einen Mobilitätsshift im Gel induziert. Zugabe von rekombinanter CK1 $\delta$  oder CK2 führte zu keiner zusätzlichen Retardierung der geshifteten Bande. Erst bei Zugabe von ATP war ein kleiner, weiterer Mobilitätsshift festzustellen. Da CK1 $\delta$  und CK2 erst in Gegenwart von ATP ihre

Substrate phosphorylieren, war davon auszugehen, dass die Phosphorylierung von LEF-1 eine Konformationsänderung des LEF-1/DNA Komplexes induziert, die diesen Supershift hervorruft. In Kontrollexperimenten bei denen ATP gegen  $\gamma$ -S-ATP oder CTP ausgetauscht wurde, war dieser Supershift nicht nachweisbar (siehe Abb. 4.10).



**Abb. 4.10: Die Phosphorylierung von LEF-1 durch CK1 $\delta$  bzw. CK2 verändert das Laufverhalten des LEF-1/DNA-Komplexes.**

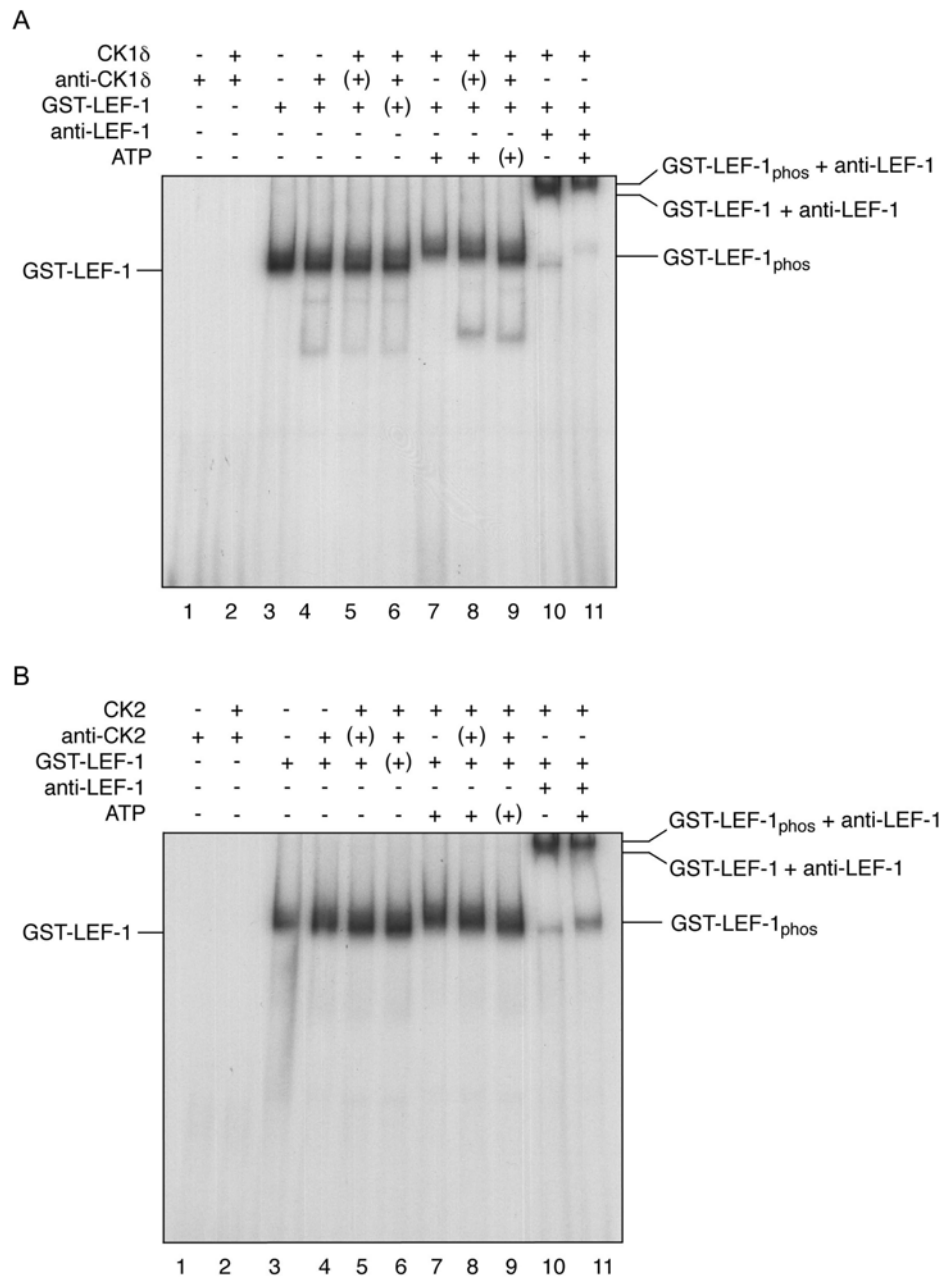
Durch die Bindung von GST-LEF-1 wird ein Mobilitätsshift des radioaktiv-markierten LEF-DNA-Fragments induziert (Lane 2 und 7). Dieser Shift wird nach Phosphorylierung durch CK1 $\delta$  bzw. CK2 verstärkt (Lane 4). In Abwesenheit von ATP (Lane 3) bzw. in Gegenwart von CTP (Lane 5) oder  $\gamma$ -S-ATP (Lane 6) ist dieser Supershift nicht sichtbar. GST (Lane 1) als Kontrolle bindet nicht an die DNA. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 4 %igen nativen Gelen. Die Bezeichnung „probe“ steht für das freie, radioaktiv-markierte LEF-DNA-Fragment.

Um zu überprüfen, dass der detektierte Supershift auf die CK1 $\delta$ - und CK2-abhängige Phosphorylierung von LEF-1 zurückführbar ist und nicht etwa durch Bindung der Kinasen an den GST-LEF-1/DNA Komplex hervorgerufen wird, wurden Shift-Assays in Gegenwart von anti-CK1 $\delta$ , anti-CK2 und anti-LEF-1 (13E5) Antikörpern durchgeführt. Bei Vorliegen eines dieser Proteine im Komplex, sollte die Bindung des jeweiligen Antikörpers eine weitere Veränderung im Laufverhalten hervorrufen.

Dabei zeigte sich, dass weder der anti-CK1 $\delta$  noch der anti-CK2 Antikörper einen stärkeren Bandenshift im Vergleich zu dem durch GST-LEF-1 hervorgerufen Shift induzierte. Auch nach Blot der Gele auf PVDF-Membran konnten die Kinasen mit anti-CK1 $\delta$  oder anti-CK2 Antikörper nicht auf Höhe des GST-LEF-1/DNA Komplexes nachgewiesen werden. Ein schwaches Signal konnte hingegen im Bereich der Geltaschen detektiert werden, was vermuten ließ, dass die Kinasen nicht mit der Probe in das Gel einwandern. Dies kann auf die möglicherweise zu geringe Affinität der Kinasen zu LEF-1 unter den gegebenen Versuchsbedingungen zurückgeführt werden.

In weiteren Shift-Assays konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von anti-CK1 $\delta$  oder anti-CK2 Antikörper in Gegenwart von ATP eine kleine Reduktion des durch die Phosphorylierung von LEF-1 verursachten Shifts zur Folge hatte. Dieser Effekt konnte noch verstärkt werden, wenn CK1 $\delta$  oder CK2 mit anti-CK1 $\delta$  oder anti-CK2 Antikörper vorinkubiert wurden. Möglicherweise fangen die Antikörper einen Teil der Kinasemoleküle ab, so dass sie nicht mehr zur Phosphorylierung von LEF-1 beitragen können. LEF-1 wird so im geringeren Umfang phosphoryliert und der resultierende Supershift fällt schwächer aus.

In Gegenwart des monoklonalen anti-LEF-1 (13E5) Antikörpers, zeigte sich ein starker Mobilitätsshift durch Ausbildung eines Antikörper/GST-LEF-1/DNA Komplexes. Dieser Mobilitätsshift vergrößerte sich in Übereinstimmung mit den vorher beschriebenen Beobachtungen nochmals in Gegenwart von ATP in Folge der Phosphorylierung von LEF-1. Um diese Unterschiede deutlicher sichtbar zu machen, wurden die Ansätze auf 8 %igen nicht denaturierenden Gelen über einen längeren Zeitraum aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen läuft das freie, radioaktiv-markierte LEF-DNA-Fragment aus dem Gel heraus und war daher nicht mehr detektierbar (Abb. 4.11).

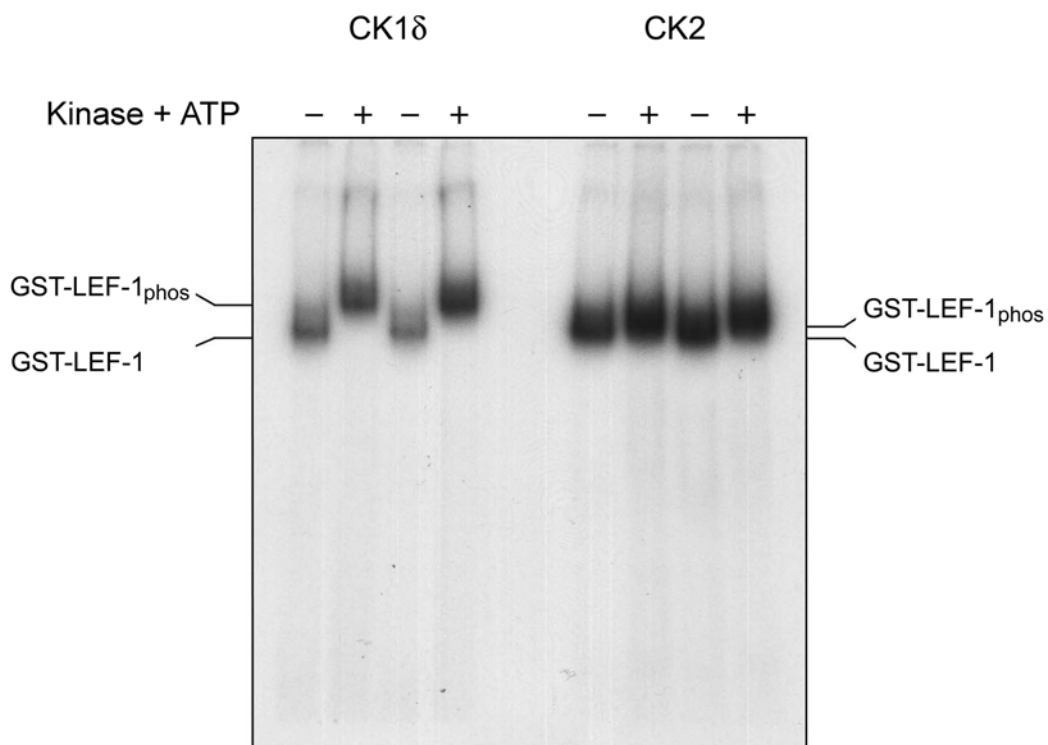


**Abb. 4.11: Die Phosphorylierung von LEF-1 bewirkt eine Konformationsänderung des LEF-1/DNA Komplexes.**

Der durch GST-LEF-1 induzierte Shift (Lane 3) führt nach Phosphorylierung durch CK1δ (A) oder CK2 (B) zu einem kleinen Supershift (Lane 7). In Abwesenheit von ATP (Lane 5 und 6) ist der Supershift nicht detektierbar. In Anwesenheit von anti-CK1δ bzw. anti-CK2 Antikörper ist eine Reduktion der nach Phosphorylierung detektierten Bande erkennbar (Lane 8 und 9). Die Stärke der Reduktion ist dabei vom Zeitpunkt der Antikörper Zugabe abhängig; die in Klammern gesetzte Komponente wurde jeweils nach Vorinkubation der anderen Komponenten zugegeben. Die Zugabe von anti-LEF-1 (13E5) Antikörper resultierte in einem starken Mobilitätsshift, der durch Phosphorylierung noch verstärkt wurde (Lane 10 und 11). Anti-CK1δ oder anti-CK2 Antikörper bildeten weder allein noch in Gegenwart von CK1 oder CK2 mit LEF-1 einen DNA-bindenden Komplex (Lane 1 und 2) und hatten damit keinen Einfluss auf das Laufverhalten des GST-LEF-1/DNA Komplexes (Lane 5 und 6). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 8 %igen nativen Gelen über einen Zeitraum von 2 h. Das freie LEF-DNA-Fragment läuft unter diesen Bedingungen aus dem Gel heraus.

Diese Shift-Assays zeigten, dass die Phosphorylierung von LEF-1 durch CK1 $\delta$  oder CK2 zu einem veränderten Laufverhalten des GST-LEF-1/DNA Komplexes führt. Dabei fiel vor allem bei einer elektrophoretischen Auftrennung über 8 %ige, native Polyacrylamidgele auf, dass eine Phosphorylierung von LEF-1 durch CK1 $\delta$  einen stärkeren Mobilitätsshift hervorruft als eine Phosphorylierung durch CK2. Aufgrund dieses Unterschiedes und der Tatsache, dass die durch Phosphorylierung bedingte Molekülmassenänderung von GST-LEF-1 nicht allein einen solchen Supershift induzieren kann, ist davon auszugehen, dass durch die CK1 $\delta$ - und CK2-abhängige Phosphorylierung unterschiedliche Konformationsänderungen induziert werden. Diese Beobachtung ist insbesondere hinsichtlich der architektonischen Funktion von LEF-1 von Interesse.

Der Unterschied im Laufverhalten wurde im direkten Vergleich noch einmal deutlicher herausgearbeitet und ist in Abbildung 4.12 gezeigt:



**Abb. 4.12: Die CK1 $\delta$ - und CK2-abhängige Phosphorylierung von LEF-1 führt zu unterschiedlichen Konformationsänderungen des GST-LEF-1/DNA Komplexes.**

Die Phosphorylierung von GST-LEF-1 durch CK1 $\delta$  oder CK2 führt zu einem unterschiedlich starken Mobilitätsshift des GST-LEF-1/DNA Komplexes. Um die Unterschiede deutlicher sichtbar zu machen, wurde jede Probe zweimal auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 8 %igen, nativen Gel und wurde über einen Zeitraum von 2 h durchgeführt. Das freie, radioaktiv-markierte LEF-DNA-Fragment läuft unter diesen Bedingungen aus dem Gel heraus.

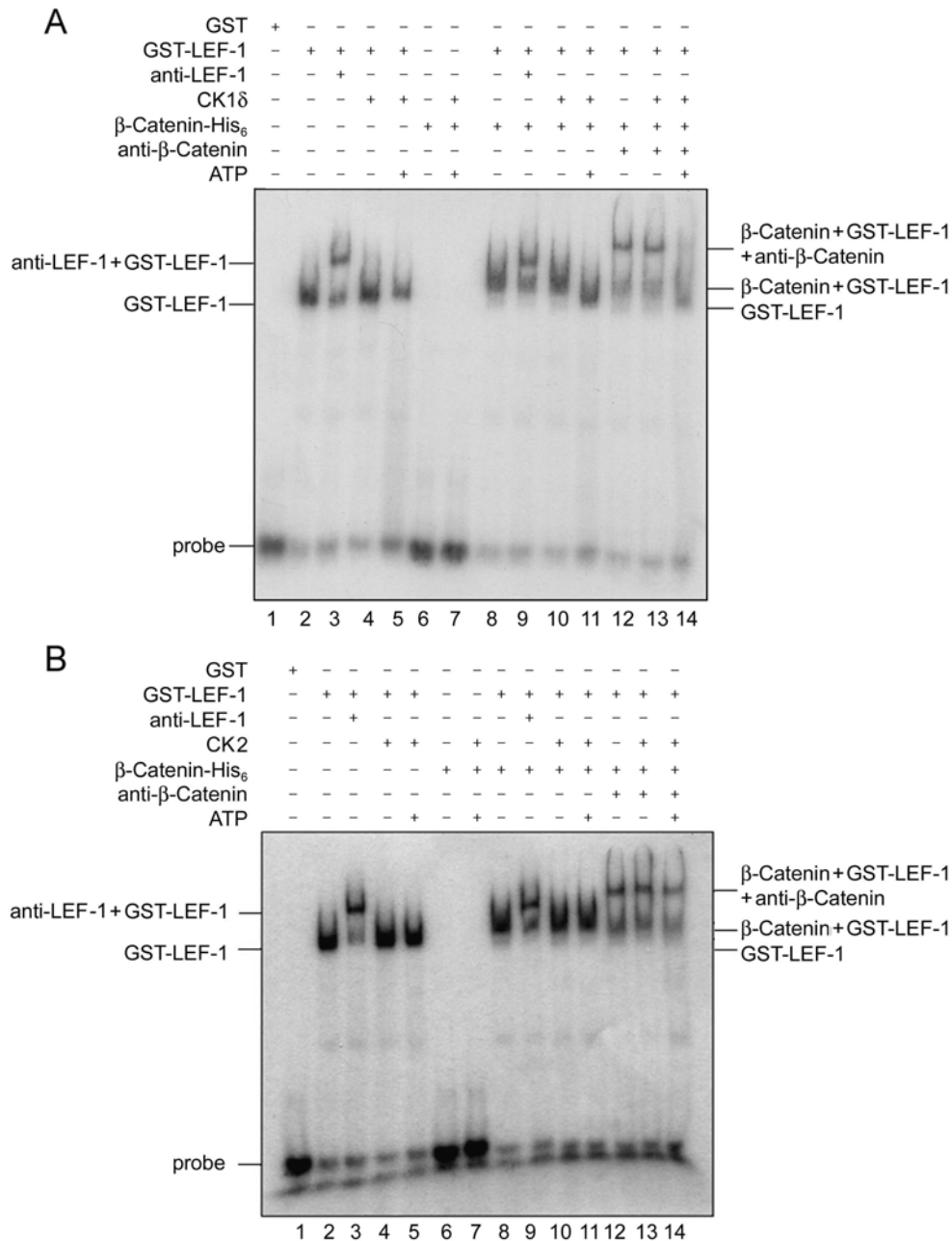
#### 4.2.2 Die CK1 $\delta$ -abhängige Dissoziation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Phosphorylierung durch CK1 $\delta$  und CK2 auf den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex und seine DNA-Bindung hat. Dazu wurde GST-LEF-1 und rekombinant hergestelltes  $\beta$ -Catenin Fusionsprotein mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag entweder allein oder in Kombination mit gereinigter, rekombinanter CK1 $\delta$  oder CK2 in Gegenwart oder Abwesenheit von ATP vorinkubiert und anschließend mit dem radioaktiv-markierten LEF-DNA-Fragment inkubiert. Die entstehenden Protein-DNA Komplexe wurden anschließend in einem 4 %igen, nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Zugabe von  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> zu GST-LEF-1 induzierte den zu erwartenden stärkeren Mobilitätsshift durch Ausbildung eines  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplexes. In Gegenwart von CK1 $\delta$  konnte keine zusätzliche Retardierung des Komplexes im Gel detektiert werden. War allerdings ATP im Ansatz enthalten, so konnte nur noch die dem GST-LEF-1/DNA Komplex entsprechende Bande detektiert werden. Der Komplex mit  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> war nicht mehr sichtbar, was dadurch zu erklären ist, dass durch die CK1 $\delta$ -vermittelte Phosphorylierung der  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplex dissoziiert wird. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden die Proben zusätzlich mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörper inkubiert. Dies resultierte in einem weiteren, starken Mobilitätsshift durch Ausbildung eines Antikörper/ $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplexes. CK1 $\delta$  allein hatte wie zuvor keinen Einfluß auf den Komplex, wohingegen in Gegenwart von ATP, d. h. nach Phosphorylierung, der Antikörper/ $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplex zerstört wurde und wiederum nur noch der GST-LEF-1/DNA Komplex detektierbar war. Dadurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine CK1 $\delta$ -abhängige Phosphorylierung den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex zerstört.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in Shift-Assays mit CK2, dass eine Phosphorylierung durch CK2 keinen Einfluss auf den GST-LEF-1/ $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> Komplex hat (siehe Abb. 4.13).





**Abb. 4.13: Die CK1 $\delta$ -abhängige Phosphorylierung von LEF-1 zerstört den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex.**

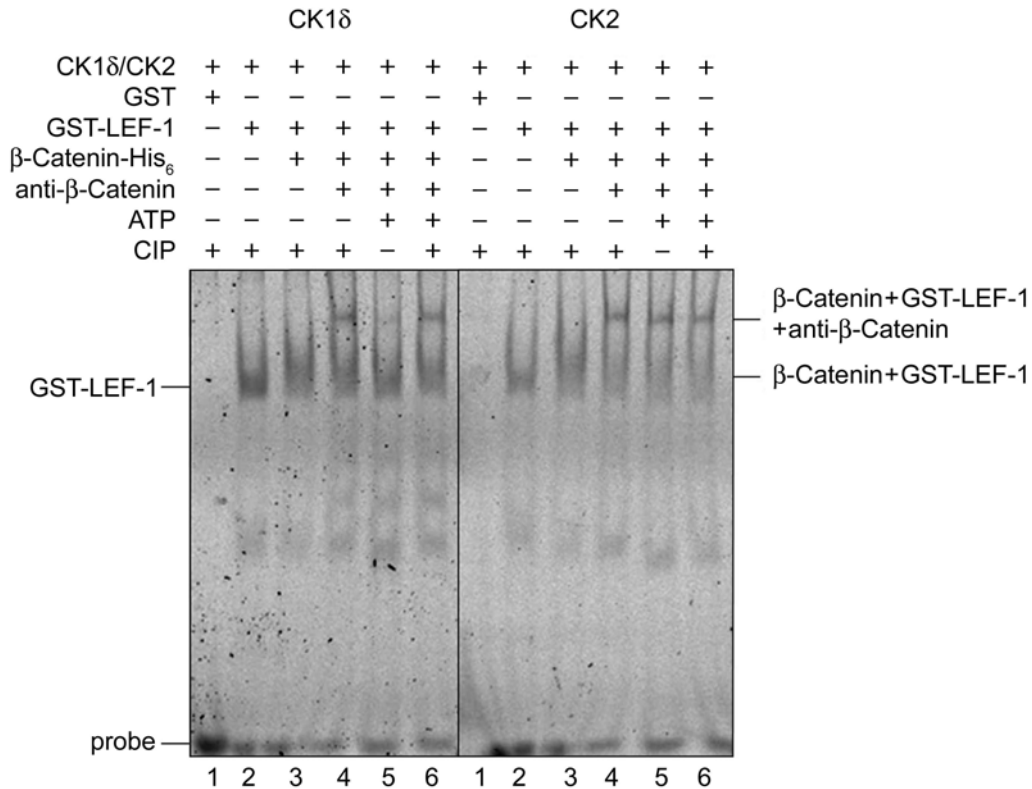
Zum Nachweis des Einflusses der CK1-abhängigen Phosphorylierung auf den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex wurden Shift-Assays mit verschiedenen Kombinationen von GST-LEF-1, CK1 $\delta$ ,  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>, anti-LEF-1 (13E5) und anti- $\beta$ -Catenin Antikörper durchgeführt. Die Zugabe von  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> induziert einen charakteristischen Mobilitätsshift (Lane 8), der in Gegenwart von anti- $\beta$ -Catenin Antikörper weiter verstärkt wurde (Lane 12). In Anwesenheit von  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> führte anti-LEF-1 Antikörper zu einem Mobilitätsshift (Lane 9), identisch zu der Probe, die kein  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> enthielt (Lane 3). A) CK1 $\delta$  allein hatte keinen Effekt auf den  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1 Komplex (Lane 10). Nach Phosphorylierung zerfällt der GST-LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplex und es war nur noch der GST-LEF-1/DNA Komplex detektierbar (Lane 11). Diese Ergebnisse wurden in Gegenwart von anti- $\beta$ -Catenin Antikörper bestätigt (Lane 12-14). B) In vergleichbaren Experimenten zeigte eine CK2-abhängige Phosphorylierung keinen Einfluß auf den  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1 Komplex. Die Analyse erfolgte in 4 %igen, nativen Gelen. Die Bezeichnung „probe“ steht für das freie, radioaktiv-markierte LEF-DNA-Fragment.

### 4.2.3 Inhibition der Dissoziation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes in Gegenwart von Phosphatase

Mit den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch eine CK1 $\delta$ -abhängige Phosphorylierung der LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes zerstört wird. Um zu bestätigen, dass die Dissoziation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes wirklich Folge einer Phosphorylierung ist, sollte im nächsten Schritt versucht werden, diese Effekte durch Zugabe einer Phosphatase aufzuheben. Dazu wurden Shift-Assays in Gegenwart von alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP) durchgeführt. Da die CIP auch zu einer Dephosphorylierung des radioaktiv-markierten LEF-DNA-Fragments führt, wurde für diese Versuche ein fluoreszenzmarkiertes LEF-DNA-Fragment eingesetzt. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines Fluoreszenz-Imagers. Dabei zeigte sich, dass die Schärfe der Fluoreszenzsignale im Gel im Vergleich zu den radioaktiven Signalen schlechter ist. Die Verwendung des fluoreszenzmarkierten LEF-DNA-Fragments erlaubte daher keine klare Trennung des GST-LEF-1/DNA Komplexes von dem  $\beta$ -catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplex. In Übereinstimmung mit den vorher beschriebenen Experimenten war jedoch eindeutig das Verschwinden des anti- $\beta$ -Catenin/ $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplexes in Folge der Phosphorylierung nachweisbar.

Wie in Abbildung 4.14 gezeigt, hatte die Zugabe von CIP bei fehlender Phosphorylierung weder einen Einfluß auf den GST-LEF-1/DNA Komplex noch auf den  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA-Komplex oder den anti- $\beta$ -Catenin/ $\beta$ -catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA-Komplex. In Gegenwart von CIP wurde jedoch die durch die CK1 $\delta$ -abhängige Phosphorylierung induzierte Dissoziation des anti- $\beta$ -Catenin/ $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplexes inhibiert.

In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen hatte die Phosphatase keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Komplexes in Gegenwart von CK2.



**Abb. 4.14: CIP inhibiert die durch die CK1 $\delta$ -abhängige Phosphorylierung hervorgerufene Dissoziation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes.**

Eine Zugabe von CIP hatte keinen Einfluß auf den GST-LEF-1/DNA-Komplex (Lane 2), den  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplex (Lane 3) oder den anti- $\beta$ -Catenin/ $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA Komplex in Gegenwart von CK1 $\delta$  (Lane 4). Die phosphorylierungsabhängige Dissoziation des  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1 Komplexes (Lane 5) wurde durch Zugabe von CIP inhibiert (Lane 6). Die Anwesenheit von CIP und die Phosphorylierung durch CK2 hatten keinen Einfluß auf den Komplex. Für die hier vorgestellten Experimente wurde ein Cy5-gelabeltes LEF-DNA-Fragment eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in einem 4 %igen, nativen Polyacrylamidgel.

Da sowohl LEF-1 als auch  $\beta$ -Catenin Substrate der CK1 sind, stellte sich die Frage, ob eine Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an der Freisetzung von  $\beta$ -Catenin aus dem Komplex beteiligt ist. Durch sequentielle Phosphorylierung sollte versucht werden, diese Frage zu beantworten. Dazu wurde GST-LEF-1 mit CK1 $\delta$  vorphosphoryliert, die Kinase mit dem Inhibitor CK1-7 gehemmt und anschließend  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> zugegeben. Umgekehrt wurde zunächst  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> durch CK1 $\delta$  phosphoryliert, dann die Kinase blockiert und GST-LEF-1 zugegeben. Führt die Vorphosphorylierung von LEF-1 zur Dissoziation des GST-LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes, jedoch nicht die Vorphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, dann würde dies bedeuten, dass die Phosphorylierung von LEF-1

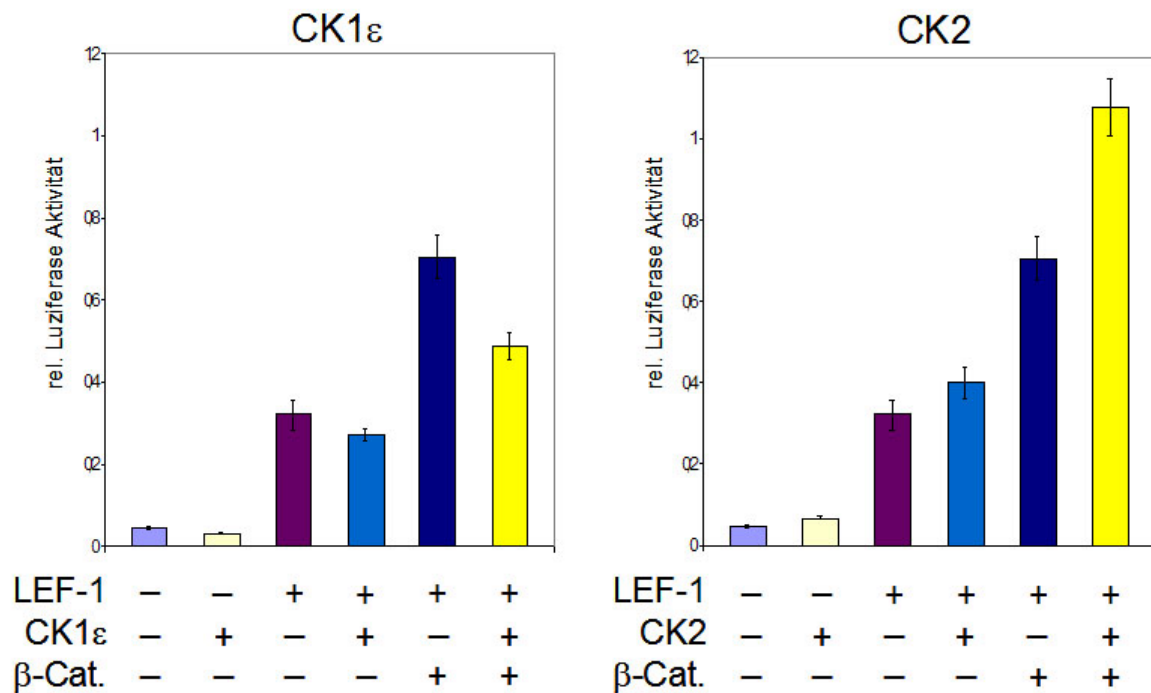
entscheidend für die Dissoziation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes ist.

Sowohl nach Vorphosphorylierung von LEF-1 als auch von  $\beta$ -Catenin war eine partielle Dissoziation des GST-LEF-1/ $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub> Komplexes detektierbar (nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass entweder die Phosphorylierung von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin zur Dissoziation beiträgt, oder dass CK1 $\delta$  durch CK1-7 nicht vollständig inhibiert worden war. Eine Erhöhung der Inhibitor-Konzentration war jedoch nicht möglich, da dies die Bindung von GST-LEF-1 an die DNA und die Ausbildung des  $\beta$ -Catenin-His<sub>6</sub>/GST-LEF-1/DNA-Komplexes beeinflusste. Daher kann über dieses Experiment keine Aussage getroffen werden und es bleibt zu diesem Zeitpunkt ungeklärt, ob die Phosphorylierung von LEF-1 oder die Phosphorylierung von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin zur Dissoziation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes führt.

### **4.3 Der Einfluss der CK1- und CK2-abhängigen Phosphorylierung auf die Promotoraktivität von Wnt-Zielgenen**

Um die Effekte von CK1 und CK2 auf die Aktivität von Wnt-abhängigen Promotoren im zellulären Kontext zu untersuchen, wurden Reportergen-Assays mit einem Siamois-Firefly-Luziferase Reporterkonstrukt in HEK293 Zellen durchgeführt. In diesem Konstrukt steht das Luziferase-Gen unter der Kontrolle des Siamois-Promotors, der als ein über den LEF-1/TCF- $\beta$ -Catenin Komplex regulierter Promotor beschrieben wurde (Brannon *et al.*, 1997).

HEK293 Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode und unterschiedlichen Kombinationen der Expressionsplasmide für LEF-1,  $\beta$ -Catenin, CK1 $\epsilon$  und CK2 $\alpha/\beta$  transient transfiziert. Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz wurde ein Expressionsplasmid für Renilla-Luziferase unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Thymidin-Kinase Promotors co-transfiziert. Nach Lyse der Zellen wurde die Aktivität der beiden Luziferasen mit dem Dual-Luziferase<sup>®</sup> Reporter-Assay System in einem Luminometer gemessen. Die relative Luciferase-Aktivität jedes Ansatzes ist als Mittelwert von 4 unabhängigen Versuchen in Abb. 4.15 graphisch dargestellt:



**Abb. 4.15: CK1 $\epsilon$  und CK2 modulieren die Transkriptionsaktivität des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes.**

HEK293 Zellen wurden in den angegebenen Kombinationen mit Expressionsplasmiden für LEF-1,  $\beta$ -Catenin, CK1 $\epsilon$  und CK2 $\alpha/\beta$  in Gegenwart des Siamois und Renilla Reporter-Gen-Plasmids transient transfiziert. Damit gleiche Mengen an DNA im Transfektionsansatz vorliegen, wurde in den jeweiligen Ansätzen mit dem Leervektor pcDNA3 aufgefüllt.

HEK293 Zellen, die mit LEF-1 transient transfiziert wurden, zeigten eine schwache Aktivierung der Reporter-Gen-Aktivität. Eine Co-Transfektion von CK1 $\epsilon$  zusammen mit LEF-1 führte zu einer leichten Inhibition der Transkriptionsaktivität.

Wird LEF-1 mit dem Transkriptionsaktivator  $\beta$ -Catenin co-transfiziert, so führt dies erwartungsgemäß zu einer deutlichen Steigerung der Transkriptionsaktivität. Vergleicht man diese Werte mit denen von Zellen, in die zusätzlich CK1 $\epsilon$  transfiziert wurde, dann zeigte sich ein CK1 $\epsilon$ -abhängiger inhibitorischer Effekt.

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Shift-Assays, nach denen die Phosphorylierung durch CK1 zu einer Dissoziation des LEF-1/ $\beta$ -Catenin Komplexes führt.

CK2 führte im Gegensatz dazu zu einer Transkriptionsaktivierung. Dieser Effekt konnte sowohl bei der Co-Transfektion von LEF-1 und CK2, als auch bei der Transfektion von LEF-1 zusammen mit  $\beta$ -Catenin und CK2 beobachtet werden. Die Steigerung der Transkriptionsaktivität kann dadurch erklärt werden, dass die

Phosphorylierung von LEF-1 durch CK2 zu einer Konformationsänderung des LEF-1/DNA-Komplexes führt, die die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes ermöglicht, der die Transkription am Siamois-Promotor aktiviert.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass CK1 und CK2 auch durch Phosphorylierung anderer Substrate in der Zelle regulatorisch in den Wnt-Signalweg eingreifen können, so z. B. auf der Ebene des  $\beta$ -Catenin Degradationskomplexes.

Die Ergebnisse dieser Reporteragen-Assays können damit nicht als spezifischer Effekt von CK1 oder CK2 auf den LEF-1/ $\beta$ -Catenin Transkriptionskomplex betrachtet werden. Sie spiegeln vielmehr die Summe der von CK1 oder CK2 in der Zelle hervorgerufenen Effekte auf das Siamois-Luziferase Reportersystem wieder. Es zeigte sich aber auch in diesem Untersuchungssystem, dass CK1 als negativer Regulator des Wnt-Signalwegs wirkt.