

6 Zusammenfassung und Ausblick

Mit den Ergebnissen meiner Arbeit konnten folgende neue Erkenntnisse gewonnen werden:

- Die beiden Serin/Threonin-Proteinkinasen CK1 und CK2 binden an den Transkriptionsfaktor LEF-1 und phosphorylieren diesen.
- Die CK1- bzw. CK2-abhängige Phosphorylierung führt zu strukturellen Änderungen innerhalb des LEF-1 Proteins, die wiederum zu strukturellen Änderungen der DNA führen.
- Die durch CK1 katalysierte Phosphorylierung von LEF-1 führt zu einer Dissoziation des LEF-1/ β -Catenin Komplexes. Übereinstimmend damit zeigte CK1 einen negativen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität eines durch den LEF-1/ β -Catenin Transkriptionskomplex regulierten Promotors eines Wnt-Zielgens.
- Die Phosphorylierung von LEF-1 durch CK2 zeigte keinen Einfluß auf die Integrität des LEF-1/ β -Catenin Komplexes, stimulierte aber in Reporteragen-Assays die Transkriptionsaktivität.

CK1 und CK2 besitzen damit nicht nur auf der Ebene des β -Catenin Degradationskomplexes, sondern auch auf der Ebene des LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplexes eine regulatorische Funktion im Wnt-Signalweg.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit hat CK1 die Rolle eines negativen Regulators und für CK2 wird die Rolle eines positiven Regulators postuliert.

In Hinsicht auf die dramatischen Konsequenzen, die durch eine fehlregulierte Aktivierung von Wnt-Zielgenen induziert werden, stellt die koordinierte Regulation auf zwei Ebenen einen wichtigen, zellulären Mechanismus für die Kontrolle des kanonischen Wnt-Signalwegs dar. Zu diesem Zeitpunkt bleibt allerdings unklar, welche Signale die Aktivität von CK1 und CK2 beeinflussen und zu den in dieser Arbeit beschriebenen positiven bzw. negativen Effekten auf der Ebene des LEF-1/TCF- β -Catenin Transkriptionskomplexes führen.

In künftigen Untersuchungen soll daher die Regulation des LEF-1/ β -Catenin Transkriptionskomplexes durch CK1 und CK2 genauer untersucht werden.

Um die Regulation des LEF-1/ β -Catenin Komplexes durch CK1 genauer zu analysieren, gilt es, die Phosphorylierungsstellen der CK1 in LEF-1 zu identifizieren, die die Dissoziation des LEF-1/ β -Catenin Transkriptionskomplexes induzieren. Einzelne, potentielle CK1-Phosphorylierungsstellen in der β -Catenin Bindungsdomäne von LEF-1 wurden bereits mutiert. Der Einsatz der entsprechenden GST-LEF-1 Mutanten in Shift-Assays zeigte eine verminderte Dissoziation des LEF-1/ β -Catenin Komplexes. Dies lässt vermuten, dass die Phosphorylierung mehrerer Serin- und/oder Threonin-Reste in diesem Bereich zur Dissoziation des Komplexes beiträgt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass CK1 auch in anderen Bereichen von LEF-1 phosphoryliert, dadurch eine Konformationsänderung induziert und auf diese Weise die Interaktion von LEF-1 mit β -Catenin beeinträchtigt.

Weitere Untersuchungen sind zur Aufklärung des genauen Mechanismus notwendig.

Um die Regulation des LEF-1/ β -Catenin Komplexes durch CK2 genauer zu analysieren, soll untersucht werden, ob CK2 tatsächlich die Transkription durch Bildung eines aktiveren Nukleoproteinkomplexes an Promotoren von LEF-1/TCF- β -Catenin regulierten Wnt-Zielgenen stimuliert. Dazu soll die Interaktion von LEF-1 bzw. LEF-1/ β -Catenin mit Co-Faktoren, die die Transkriptionsaktivität beeinflussen, wie z. B. TLE/Groucho, Pontin52 und Reptin52, in Gegenwart von CK2 untersucht werden.

Mit dem Ziel die Regulation des Wnt-Signalwegs auf der Ebene des LEF-1/ β -Catenin Transkriptionskomplexes genauer zu verstehen, sollen weitere, neue Interaktionspartner von LEF-1 identifiziert werden.

In Vorversuchen mit Lysaten von ³⁵S-Methionin/Cystein markierten Zellen konnten in Pull-down Experimenten eine Reihe mit GST-LEF-1 interagierender Proteine nachgewiesen werden, deren Identität und Funktion es aufzuklären gilt.

Summary

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

- The serine/threonine proteinkinases 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 promotor.
- 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.