
3 Ergebnisse

Die Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin kontrolliert Konvergenz und Extension im Zebrafischembryo

Das in Vertebraten vorkommende Ankyrin-Repeat-Protein Diversin wurde in unserer Arbeitsgruppe als naher Verwandter des Fliegenproteins Diego identifiziert und beschrieben. Diego reguliert in der Fliege den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg und die planare Zellpolarität (Planar Cell Polarity, PCP) während der Embryonalentwicklung (Feiguin et al., 2001; Schwarz-Romond et al., 2002). Im Zebrafisch ist Diversin in frühen Phasen der Embryonalentwicklung stark exprimiert und kontrolliert die Induktion des dorsalen Spemann-Organisators, d. h. die Spezifikation der dorso-ventralen Körperachse, die durch den Kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg gesteuert wird. Diversin reguliert in späteren Embryonalstadien, unabhängig von β -Catenin, durch den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg die Etablierung der antero-posterioren Körperachse (Schwarz-Romond et al., 2002). In diesem Prozess werden Zellwanderungen mesendodermaler Zellen zur dorsalen Seite der Körperachse angeregt, was zu einer Ausdehnung der antero-posterioren Längsachse führt (Keller, 2002; Wallingford et al., 2002). Dieser Prozess wird als Konvergenz und Extension bezeichnet (englisch: Convergence and Extension, CE) und wird vom Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg reguliert (Heisenberg et al., 2000; Kilian et al., 2003; Schier and Talbot, 2005). Der zugrunde liegende Mechanismus von Diversin in diesem Signalweg war jedoch gänzlich unbekannt. Des Weiteren war nur teilweise bekannt, in welchen Phasen der Embryonalentwicklung Diversin im Zebrafisch exprimiert ist. In der vorliegenden Arbeit habe ich die biologische Funktion von Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg der Vertebraten untersucht.

Im Zebrafischembryo findet Konvergenz und Extension während der Gastrulation und der Segmentierungsperiode statt (5-10 Std. und 10-24 Std. nach Befruchtung, Kimmel et al., 1995). In-Situ-Hybridisierungen gegen Diversin in Embryonen während der Gastrulation (60, 70, 80, 90 und 100% Epibolie) zeigen, dass Diversin durchgehend ubiquitär exprimiert ist (Beispiel für 80% in Abb. 8A, B). Diversin ist während der Segmentierungsperiode bis zum 15 Somitenstadium ubiquitär (Abb. 8 C-F und Daten nicht gezeigt) und in späteren Phasen (18-24 Stunden, Abb. 8G, H und Daten nicht gezeigt) stärker in anterioren Regionen des Embryos exprimiert (Abb. 8C-H). Diese Expressionsstudien von Diversin im sich entwickelnden Zebrafischembryo belegen,

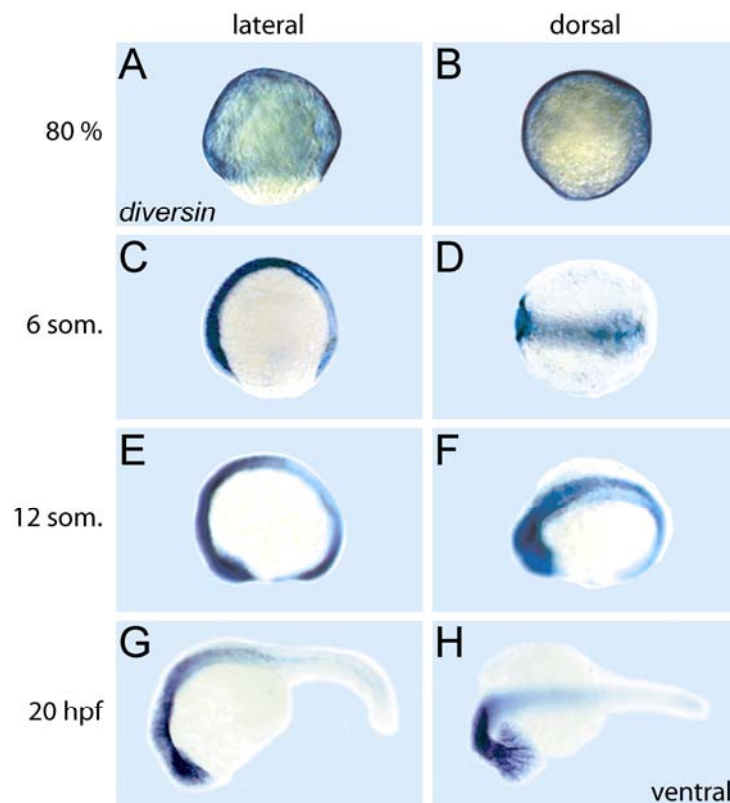


Abb. 8 Diversin ist im Zebrafischembryo während der Gastrulation und der Segmentierungsperiode ubiquitär exprimiert. (A-H) Abgebildet sind In-Situ-Hybridisierungen von Diversin in Zebrafischembryonen. Expressionsmuster von Diversin in Embryonen bei 80% Epiboly (A, B) und während frühen (C, D), mittleren (E, F) und späten (G, H) Phasen der Somitogenese sind gezeigt. Anterior ist links, Animalpol ist oben, Ansichten wie angezeigt.

dass Diversin in allen Phasen der Embryogenese stark exprimiert ist und vermutlich während des gesamten embryonalen Entwicklungsprozesses essentielle Funktionen besitzt. Diversin reguliert im Zebrafisch Konvergenz und Extension von mesendodermalen Zellen (Schwarz-Romond et al., 2002). Um dies zu demonstrieren, wurden gegen Zebrafisch-Diversin gerichtete Antisense-Morpholinos (MO) in Zebrafischembryonen injiziert, was zu einer Repression der Diversin-Expression während der frühen Zebrafischentwicklung führt. In Abbildung 9 sind Zebrafischembryonen abgebildet, denen MO gegen Zebrafisch-Diversin in zunehmender Konzentration injiziert wurde. Die Zebrafische weisen typische Merkmale für gestörte Migration von Zellen während der Gastrulation auf. Am markantesten sind hierbei die Verkürzung der antero-posterioren Körperachse (vergleiche Abb. 9A mit 9B-D) und das wellenförmige Notochord (Abb. 9C und Abb. 10B). Es ist klar zu erkennen, dass der Grad der Verkürzung der Embryonen proportional zur Menge der

injizierten Morpholinos ansteigt, und sich dies insbesondere an dem verkürzten Schwanz verdeutlicht (Abb. 9A-D). Die Kopfstrukturen und der Rumpf zeigen dagegen weniger schwere Defekte. Während Embryonen, denen 0,75 ng Diversin-MOs injiziert wurden, eine gekrümmte Körperlängsachse und einen leicht verkürzten Schwanz aufweisen (Abb. 9B), zeigen mit 2,5 ng Diversin-MOs injizierte Embryonen schwere Defekte mit einer stark verkürzten Körperachse (Abb. 9D). Verwendet man noch höhere MO-Konzentrationen, so führt der Verlust von Diversin zu ektoptischer Aktivierung des Kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges und verhindert dadurch die Etablierung der dorso-ventralen Körperachse im Zebrafischembryo (Schwarz-Romond et al., 2002). Injiziert man Zebrafischembryonen 1, 5 ng MO, so erhält man einen exemplarischen Konvergenz- und Extensions-Phänotyp, der charakterisiert ist durch eine wellenförmige Chorda dorsalis, verbreiterte Somiten, geringere intersomitische Abstände und eine verkürzte antero-posteriore Körperachse (Abb. 9C, vergleiche in Abb. 10B Nr. 2 mit Nr. 1). Zur Analyse der veränderten Morphologie der Zebrafischembryonen wurden die Somiten

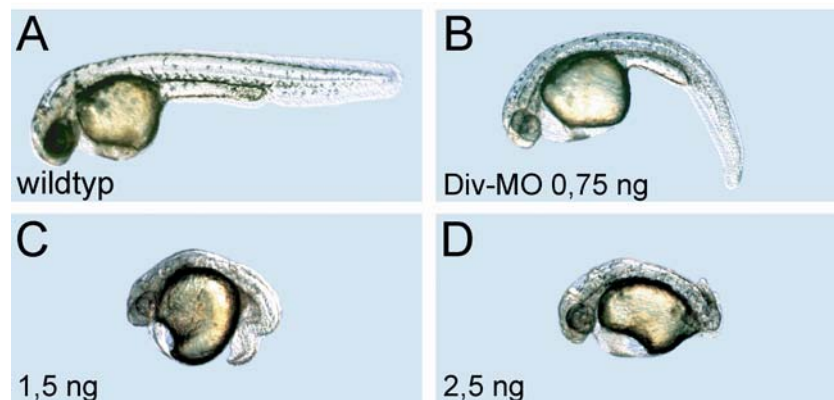


Abb. 9 Diversin kontrolliert Konvergenz und Extension im Zebrafischembryo. (A-D) Zebrafischembryonen 36 Stunden nach Fertilisation sind gezeigt. Im Vergleich zum nichtinjizierten Embryo (A), zeigen mit Diversin-Antisense-Morpholino (Div-MO) injizierte Embryonen je nach Morpholino-Menge einen schwachen (0,75 ng, B), einen mittleren (1,5 ng, C) oder einen starken Konvergenz- und Extensions-Phänotyp (2,5 ng, D). ng, Nanogramm

und adaxiale Muskelzellen, die die Chorda dorsalis umranden, mittels In-Situ-Hybridisierung des Muskelzellmarkers MyoD angefärbt. Hirnstrukturen, genauer gesagt die Rhombomere 3 und 5, können mit Sonden gegen einen hirnspezifischen Transkriptionsfaktor, Krox20, indiziert werden (Abb. 10B). Die Krox20-Färbung diente zur Kontrolle, da zu hoher Verlust der Diversin-Expression zu einer ektoptischen

Aktivierung des Kanonischen Wnt-Signalweges führt und es dadurch zu einer Dorsalisierung des Embryos käme, was an einer sehr stark verbreiteten Expressionsdomäne Krox20s erkennbar wäre. Insgesamt zeigen diese Experimente, dass der Grad der CE-Defekte im Zebrafischembryo direkt von der verwendeten Diversin-MO-Konzentration abhängig ist.

Diversin ist im Kanonischen und im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg aktiv. Es wurde bereits gezeigt, welche Domänen von Diversin für dessen Aktivität im Kanonischen Wnt-Signalweg notwendig sind (Schwarz-Romond et al., 2002). Daher stellte sich zunächst die Frage, welche Diversin-Domäne(n) zur Vermittlung der Konvergenz und Extension im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg erforderlich waren. Unsere Experimente zeigten, dass Diversin-MO-induzierte Defekte der Konvergenz und Extension durch Koinjektion muriner Diversin-mRNA aufgehoben werden konnten (Abb. 10B, Quantifizierung in Abb. 10C). Bemerkenswerterweise wurde der gleiche Effekt mit einer trunkierten Diversin-Variante erzielt, die nur die Ankyrin-Repeats (mDiv-ANK) beinhaltet (Abb. 10A-C). Im Gegensatz dazu wurde der CE-Defekt nicht durch Koinjektion einer Ankyrin-Repeat-defizienten Diversin-Mutante (Div- Δ ANK) aufgehoben (Abb. 10A-C), sondern es war eher eine Verstärkung des CE-Defekts zu beobachten. Die koinjizierten Mengen mRNA zeigten alleine keinen erkennbaren Effekt auf die Entwicklung der Embryonen (Tabelle 2 und nicht gezeigte Daten). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Ankyrin-Repeats von Diversin sowohl notwendig als auch hinreichend sind, um Konvergenz und Extension während der Zebrafischembryogenese zu regulieren. Das Diversin-Konstrukt ohne Ankyrin-Repeats (Div- Δ ANK) war nicht in der Lage, Konvergenz und Extension zu vermitteln, sondern verstärkte den CE-Defekt der Diversin-Morpholinos. Dies ist ein Hinweis auf einen dominant-negativen Effekt, den diese Diversin-Mutante ausübt.

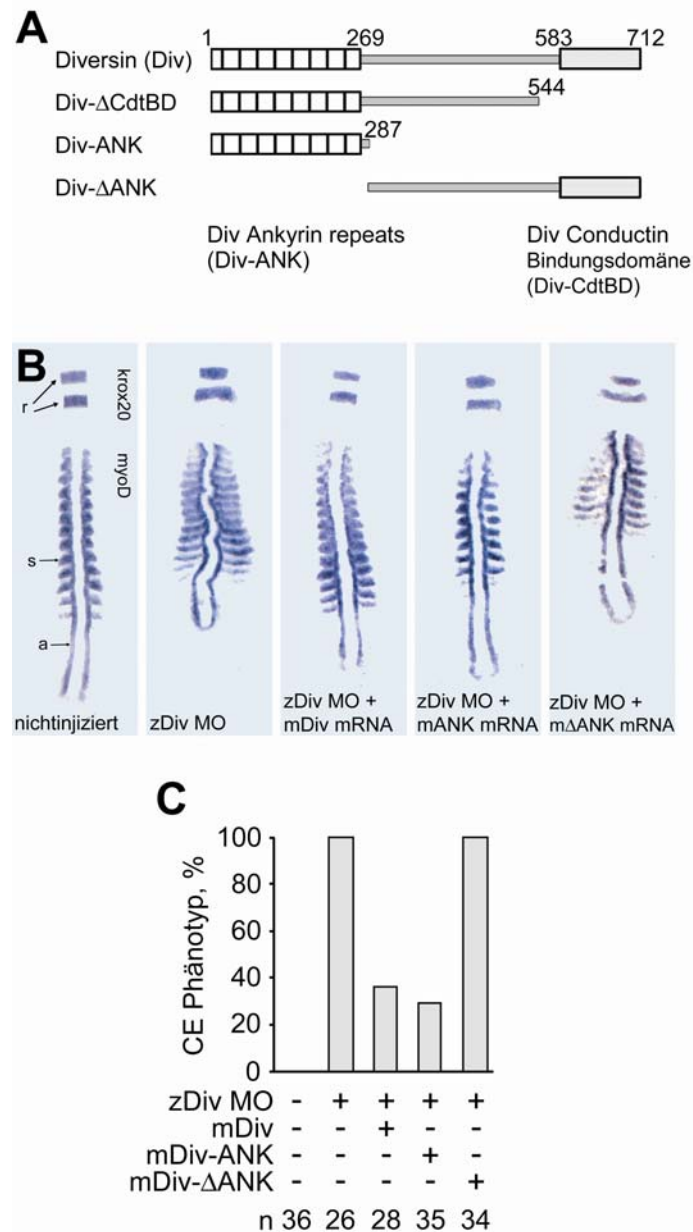


Abb. 10 Die Ankyrin Repeat Domäne von Diversin ist entscheidend für die Regulation der Gastrulationsbewegungen in Zebrafisch-Embryonen. (A) Struktur der Diversin-Domänen und verwendete Deletionsmutanten, die für mRNA Injektionen verwendet wurden. Zahlen zeigen die Positionen der Aminosäuren von murinem Diversin an. (B) In-Situ-Hybridisierungen von *krox20* und *myoD* von flach eingebetteten Zebrafisch-Embryonen sind gezeigt (12 bis 15 Somitenstadium, dorsale Ansicht, anterior nach oben). Embryonen im Ein- bis Zweizellstadium wurden mit Antisense-Morpholinos gegen Zebrafisch-Diversin (Div MO, 1,5 ng) injiziert oder wurden koinjiziert mit MO und 50 Picogramm der angezeigten murinen Diversin-mRNAs. (C) Quantifizierung der Experimente in Abb. B. Embryonen wurden als mit CE-Phänotyp klassifiziert, wenn die Länge der anterioposterioren Körperachse, die Form des Notochords und die Kompression der Somiten den MO injizierten Embryonen ähnlich war (vergleiche in Abb. B Embryos 2 und 5 mit Embryos 1, 3, und 4). r, Rhombomere; s, Somiten; a, adaxiale Zellen; n, Anzahl der Embryonen

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass nicht nur der Knock-down von Diversin durch Injektion von Antisense-MO zu einer defekten Konvergenz und Extension im Zebrafisch führt, sondern auch die Überexpression von Diversin-mRNA einen ähnlichen Defekt hervorruft, der als „gain of function“ (Funktionsgewinn) Phänotyp bezeichnet wird (Schwarz-Romond et al., 2002). Ich konnte beobachten, dass die Injektion von je 100 pg mRNA in Zebrafischembryonen, die für die Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin oder für Diversin- Δ ANK codierte, einen vergleichbaren Gain-of-Function-Phänotyp hervorrief (Abb. 11J-L). Starke Expression von Diversin in Zebrafischembryonen wirkt sich auch auf den Kanonischen Wnt-Signalweg aus, was an einer veränderten Expression spezifischer Markergene offenbar wird (Schwarz-Romond et al., 2002). Es war schon bekannt, dass das Diversin Δ ANK-Konstrukt für die Diversin-Funktion im Kanonischen Wnt-Signalweg ausreichend ist, während die Ankyrin-Repeats von Diversin in Reporter-Assays in diesem Signalweg keinen Effekt zeigten. Um einschätzen zu können, inwieweit die Störung der Konvergenz und Extension womöglich das Resultat eines gestörten Wnt/ β -Catenin-Signalweges war, überprüfte ich die Expression der Markergene *evenskipped1* (*eve1*), *goosecoid* (*gsc*) und *T-Box6* (*tbx6*) in Embryonen, denen jeweils 100 pg Div-ANK-mRNA (zur Kontrolle) oder Div- Δ ANK-mRNA injiziert wurde (Abb. 11A-I). Im Vergleich zu nichtinjizierten Embryonen (Wildtyp, Abb. 11A, D und G) zeigte weder die Überexpression von Div-ANK (Abb. 11B, E und H), noch von Div- Δ ANK (Abb. 11C, F und I) eine Veränderung der Expression der untersuchten Markergene. Diese Resultate lassen daher, unter Einbeziehung der Ergebnisse der Experimente von Abbildung 10, den Schluss zu, dass die Deletionsmutante Diversin- Δ ANK einen dominant-negativen Effekt auf die Vermittlung Diversin-abhängiger Signale hat, die Konvergenz und Extension während der Zebrafischembryogenese kontrollieren. Aufgrund der unveränderten Expression der untersuchten Markergene kann ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelt, der durch Veränderungen im Wnt/ β -Catenin Signalweg hervorgerufen wurde. Auch geht aus den Resultaten hervor, dass die Ankyrin-Repeats den Gain-of-Function-Effekt von Diversin vermitteln.

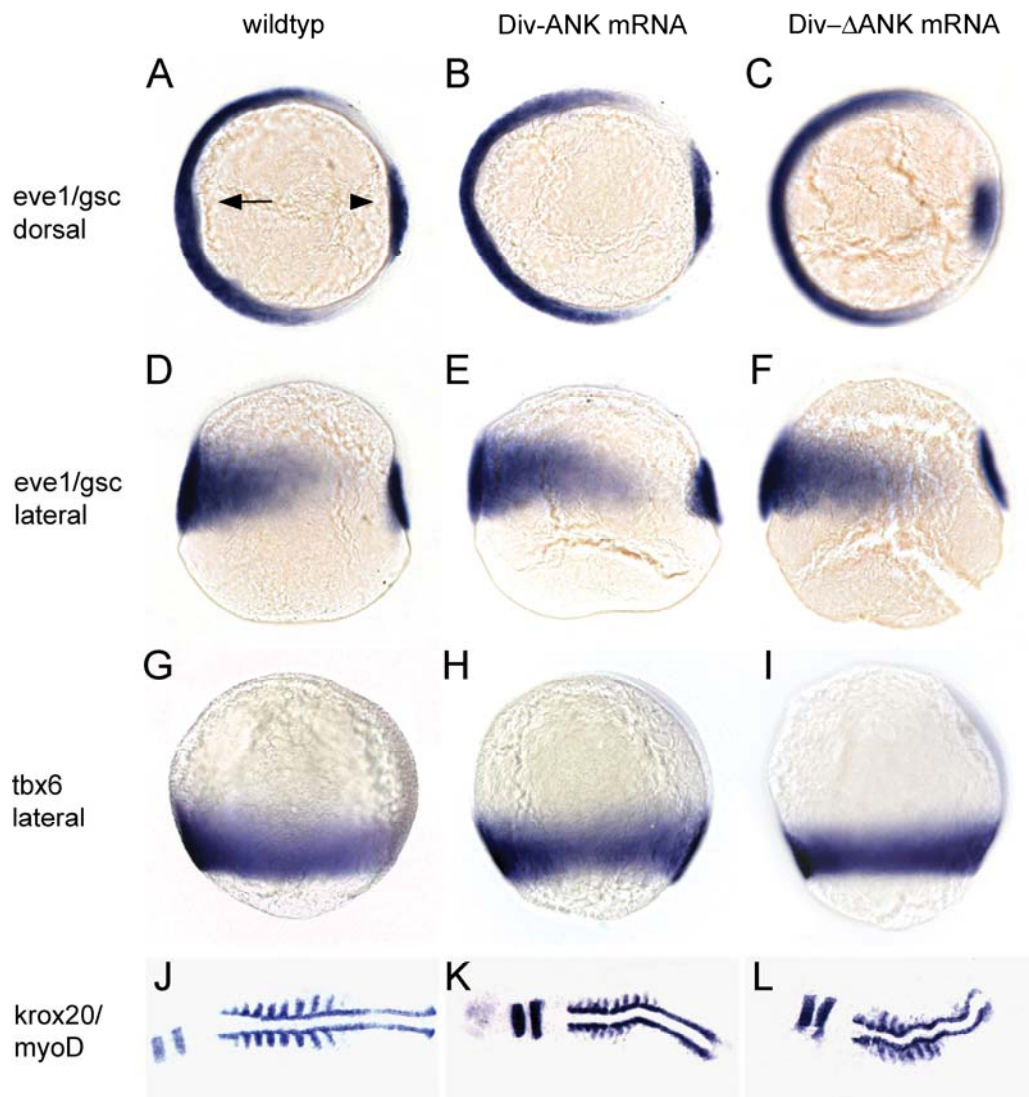


Abb. 11 Diversin- Δ ANK hat einen dominant-negativen Effekt auf Konvergenz und Extension, aber keinen Einfluss auf die Expression von Markergenen des Kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Abgebildet sind In-Situ-Hybridisierungen von *eve1* und *gsc* (A-F, markiert durch Pfeil und Pfeilspitze in A) von Embryonen bei ~60% Epiboly und von *tbx6* (G-I) von Embryonen bei ~80% Epiboly (A-C, Aufsicht, Animalpol, dorsal nach rechts, D-I, Seitenansicht, Animalpol nach oben und dorsal nach rechts). (J-L) Gezeigt sind In-Situ-Hybridisierungen von *krox20* und *myoD* von flach eingebetteten Zebrafisch-Embryonen (8 bis 10 Somitenstadium (dorsale Ansicht, anterior nach links). Den Zebrafischembryonen wurden 100 Picogramm der angezeigten Diversin-mRNAs im Ein- bis Zweizellstadium injiziert.

Diversin vermittelt Signale stromabwärts der Nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 und des putativen Wnt-Korezeptors Glypican-4/6/Knypek

Im Zebrafischembryo werden Zellbewegungen während der Gastrulation durch die Nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a/pipetail und Wnt11/silberblick kontrolliert (Hammerschmidt et al., 1996; Heisenberg et al., 2000; Lele et al., 2001; Kilian et al., 2003). Injiziert man Zebrafischembryonen im Ein- bis Zweizellstadium mit Antisense-

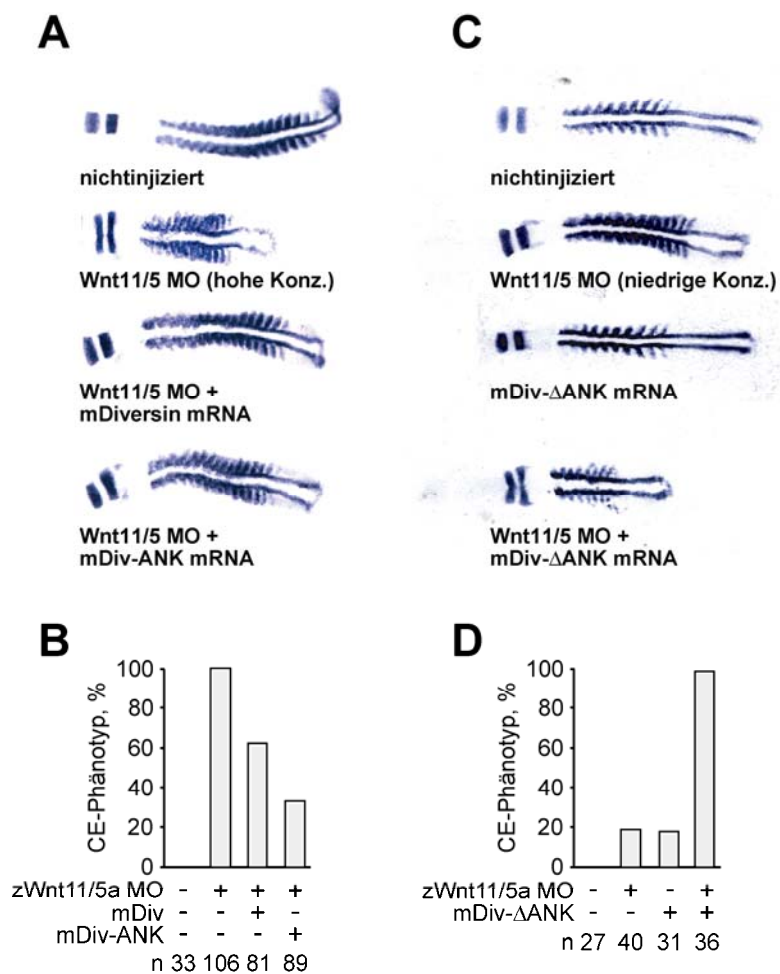


Abb. 12 Diversin kontrolliert Konvergenz und Extension unterhalb von Wnt5a und Wnt11
A, B) Vollständige Diversin oder dessen Ankyrin-Repeats alleine können den durch Wnt5a und Wnt11 Morpholino induzierten CE Phänotyp aufheben. Embryonen im Ein- bis Zweizellstadium wurden mit antisense Morpholinos gegen Zebrafisch-Wnt11 und -Wnt5a (Wnt11/5a MO, 1 +2 ng) oder wurden koinjiziert mit MO und 50 pg der angezeigten murinen Diversin-mRNAs. C, D) Diversin ohne Ankyrin-Repeat-Domäne, Diversin- Δ ANK, verstärkt synergistisch die Induktion von CE Defekten, die von Wnt5a und Wnt11 MOs induziert wurden. Zebrafisch-Embryonen wurden injiziert mit Wnt11 und Wnt5a MOs (0,5 + 1 ng) oder Diversin- Δ ANK-mRNA (50 pg) oder wurden koinjiziert mit beidem. Konz., Konzentration, MO, Morpholinos

Morpholinos gegen Zebrafisch-Wnt5a und -Wnt11, so weisen diese Embryonen schwere Defekte der Konvergenz und Extension auf (Abb. 12A, B). Ich konnte zeigen, dass mRNA, die für murines Vollängen-Diversin codierte oder nur für die Diversin-Ankyrin-Repeat-Domäne, den CE-Phänotyp aufheben konnte, der durch Injektion von Wnt5a/11-MO induziert wurde (Abb. 12A, Quantifizierung in B). Darüber hinaus zeigte sich, dass die Kombination niedriger Konzentrationen von Wnt5a/11-Antisense-Morpholinos und mRNA, die für dominant-negatives Diversin, Div- Δ ANK, kodiert, die einzeln nahezu keinen Effekt zeigten, aber zusammen synergisierten und einen starken CE-Defekt hervorriefen (Abb. 12C, Quantifizierung in D). Diese Experimente zeigten, dass Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg stromabwärts von Wnt5a und Wnt11 Konvergenz und Extension während der Zebrafischgastrulation kontrolliert. Zusätzlich bestätigten die Ergebnisse die Annahme, dass es sich bei der trunkierten Diversin-Mutante, Div- Δ ANK, um eine dominant-negative Variante von Diversin handelt.

Das Proteoglykan Glypican-4/6/Knypek wird als putativer Wnt-Korezeptor betrachtet, der Konvergenz und Extension im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg reguliert (Topczewski et al., 2001). Knypek-Mutanten zeigen typische Defekte in konvergenter Extension (Abb. 12A). Es wurde nachgewiesen, dass der Knypek-CE-Phänotyp durch Injektion von Wnt11-mRNA partiell aufgehoben werden kann (Topczewski et al., 2001). Auch ist bekannt, dass Wnt11 und Wnt5a synergistische Effekte im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg ausüben und der CE-Phänotyp von Wnt5a/pipetail-Mutanten ebenfalls durch Injektionen von Wnt11-mRNA aufgehoben werden kann (Kilian et al., 2003). Wir injizierten Diversin-Vollängen-mRNA in Zebrafischembryonen im Ein- bis Zweizellstadium, die aus Verpaarungen heterozygoter Knypek-Mutanten stammten. Nichtinjizierte Embryonen wiesen eine erwartete Mendelsche Verteilung der Nachkommen auf, d. h. ca. 25% der Embryos waren homozygot für die Knypek-Mutation (Abb. 13A, B). Dagegen war die Anzahl der homozygoten Knypek-Mutanten von mit Diversin-mRNA injizierten Embryonen mit ca. 15% signifikant kleiner ($p < 0,02$; Abb. 13B). Im Gegensatz dazu führten weder Injektionen von Diversin-Morpholinos, noch von dominant-negativem Diversin (Div- Δ ANK) zu einer Veränderung der Mendelschen Verteilung (Abb. 13B). Diese Experimente zeigen daher, dass Diversin unterhalb des Proteoglykan4/6/Knypek Konvergenz und Extension kontrolliert.

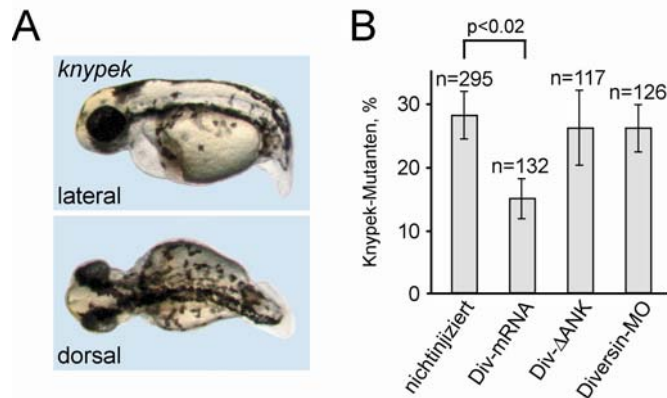


Abb. 13 Diversin kontrolliert Konvergenz und Extension unterhalb von Knypek. A) Knypek-Zebrafisch-Mutanten weisen schwere CE-Defekte auf. Dargestellt ist ein 36 Stunden alter Zebrafischembryo, der homozygot für das Knypek-Allel $knypek^{fr6}$ ist. B) Diversin agiert unterhalb von Knypek. Anteil der homozygoten $knypek^{fr6/fr6}$ Embryonen nach Injektion von Vollängen-Diversin-mRNA (50 pg), Diversin- Δ ANK-mRNA (50 pg) oder Diversin-Morpholinos (1,5 ng) im Vergleich zu nichtinjizierten Embryonen. Gezählt wurden die Mutanten (36 hpf), die einen eindeutigen Knypek-Phänotypen aufwiesen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test berechnet (Zwei Stichproben, gleiche Varianz, zweiseitiger Test).

Diversin wirkt im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg auf gleicher Ebene wie Dishevelled und stromaufwärts der kleinen GTPasen RhoA und Rac1

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg unterhalb der Liganden Wnt5a und Wnt11 und dem Proteoglykan Glypican-4/6/Knypek Zellbewegungen kontrolliert, die Konvergenz und Extension während der Gastrulation vermitteln. Ein entscheidender Vermittler Nicht-kanonischer Wnt-Signale ist das zytoplasmatische Multiadapter-Molekül Dishevelled, das epistatisch unterhalb von Wnt11/Silberblick im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg operiert (Boutros et al., 1998; Heisenberg et al., 2000; Wharton, Jr., 2003; Wang et al., 2006a). Ich untersuchte die Epistasie zwischen Diversin und Dishevelled in Bezug auf die Regulation von Konvergenz und Extension während der Embryonalentwicklung im Zebrafisch. Hierbei versuchte ich die CE-Defekte, die durch den Funktionsverlust eines der beiden Proteine bewirkt wurden, durch Koinjektion der mRNA des jeweils anderen Proteins aufzuheben. Diversin-mRNA konnte die CE-Defekte, die durch dominant-negatives Dishevelled (Dvl-2 Δ DEP, siehe Abb. 14) hervorgerufen wurde, nicht aufheben. In ähnlicher Weise konnten die CE-Defekte, die durch Diversin-MO-Injektionen induziert wurden, nicht durch Koinjektion von Dishevelled-2 Δ DIX-mRNA (Dvl-2 Δ DIX) gerettet werden (Tabelle1). Dishevelled ist ebenfalls an der Regulation des kanonischen Wnt-

Tabelle 2 Epistase von Diversin und Dishevelled in der Zebrafischembryogenese

Art der Injektion	n	CE Embryos, % (nicht gerettet)
Nichtinjiziert	208	0
Diversin MO (1.5 ng)	86	100
Diversin MO (1.5 ng) + Dvl-2ΔDIX (50 pg)	50	100
Diversin MO (1.5 ng) + Rac1-V12 (2 pg)	60	100
Diversin MO (1.5 ng) + RhoA-V14 (2 pg)	86	98
Diversin MO (1.5 ng) + RhoA-V14 (1 pg) + Rac1-V12 (1 pg)	50	64
Dvl-2ΔDEP (100 pg)	127	99
Dvl-2ΔDEP (100 pg) + Diversin (50 pg)	58	98
Dvl-2ΔDEP (100 pg) + Rac1-V12 (2 pg)	56	93
Dvl-2ΔDEP (100 pg) + RhoA-V14 (2 pg)	60	95
Dvl-2ΔDEP (100 pg) + RhoA-V14 (1 pg) + Rac1-V12 (1 pg)	108	63
Div-ΔANK (100 pg)	152	96
Div-ΔANK (100 pg) + Rac1-V12 (2 pg)	136	97
Div-ΔANK (100 pg) + RhoA-V14 (2 pg)	144	95
Div-ΔANK (100 pg) + RhoA-V14 (1 pg) + Rac1-V12 (1 pg)	141	58
Wnt5/11 MOs (2 +1 ng)	28	98
Wnt5/11 MOs (2 +1 ng) + Dvl-2ΔDIX (50 pg)	41	56
<u>Kontroll-Injektionen</u>		
Diversin-mRNA (50 pg)	76	4
Dvl-2ΔDIX-mRNA (50 pg)	69	0
Rac1-V12 (2 pg)	41	0
RhoA-V14 (2 pg)	34	0
RhoA-V14 (1 pg) + Rac1-V12 (1 pg)	39	1

Experimente wurden durchgeführt und quantifiziert wie für Abb. 10B und C beschrieben.

Signalwegs beteiligt. Das Dishevelled-2ΔDIX-Konstrukt wurde verwendet, um eine Interferenz mit dem kanonischen Wnt-Signalweg zu verhindern, weil bekannt war, dass die Deletion der DIX-Domäne zu einem Funktionsverlust von Dishevelled im Kanonischen, aber nicht im Nicht-kanonischen Zweig des Wnt-Signalwegs führt (Boutros and Mlodzik, 1999). Um die Funktionalität des verwendeten Dishevelled-Konstrukts zu testen, koinjizierten wir es mit Wnt5a- und Wnt11-MO (Tabelle 2). Embryonen, die nur mit Wnt5a- und Wnt11-MO injiziert wurden, zeigten einen CE-Defekt. Dieser CE-Defekt konnte durch Koinjektion mit Dvl-2ΔDIX-mRNA deutlich

reduziert werden (Tabelle 2). Es ist in der Literatur beschrieben, dass die kleinen GTPasen RhoA und Rac1 unterhalb von Dishevelled während der Gastrulation in *Xenopus* agieren (Habas et al., 2003). Wir konnten die CE-Defekte in Zebrafischembryonen, die durch Diversin-MO- oder Dvl-2- Δ DEP-mRNA-Injektionen induziert wurden, durch Koinjektionen von mRNAs konstitutiv aktiver Varianten von RhoA (V14) und Rac1 (V12) retten (Tabelle 2). Auch CE-Defekte nach Injektion von Div- Δ ANK-mRNA, konnten durch Koinjektion mit RhoA (V14) und Rac1 (V12) aufgehoben werden (Tabelle 2). Die Kontrollinjektionen belegen, dass die gewählten mRNA-Konzentrationen, die für die Rettung der CE-Defekte in diesen Experimenten verwendet wurden, alleine keinen Effekt, d.h. keinen Gain-of-Function-Phänotyp verursachten. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl Diversin als auch Dishevelled stromabwärts von Wnt5a und Wnt11 und oberhalb der kleinen GTPasen RhoA und Rac1 agieren. Die epistatische Beziehung zwischen Diversin und Dishevelled konnte jedoch nicht aufgeklärt werden, was vermuten lässt, dass die beiden Moleküle eher als Partner auf gleicher Ebene operieren, als in einem linearen Signalweg.

Diversin ist essentiell für die Herzentwicklung im Zebrafisch

Wir haben bereits beschrieben, dass Zebrafischembryonen, denen dominant-negative Diversin-mRNA (Div- Δ ANK, Abb. 14A) injiziert wurde, Defekte in Konvergenz und Extension mesendodermaler Zellen aufweisen (Tabelle 2). In späteren Entwicklungsstadien zeigte sich, dass diese Embryonen Cardia Bifida entwickelten, d.h. zwei separate, schlagende Herzen (Abb. 14B). Im Zebrafisch kommt es zur Entwicklung von Cardia Bifida, wenn während einer späten Phase der Gastrulation die bilateralen Herzanlagen nicht fusionieren. Die Ursache dafür ist eine gestörte Migration der Herzvorläuferzellen zur dorsalen Mittelachse des Embryos, die durch den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg gesteuert wird (Stainier, 2001; Thisse and Zon, 2002; Matsui et al., 2005). Die unterbrochene Fusion der Herzvorläufer in mit Div Δ ANK-

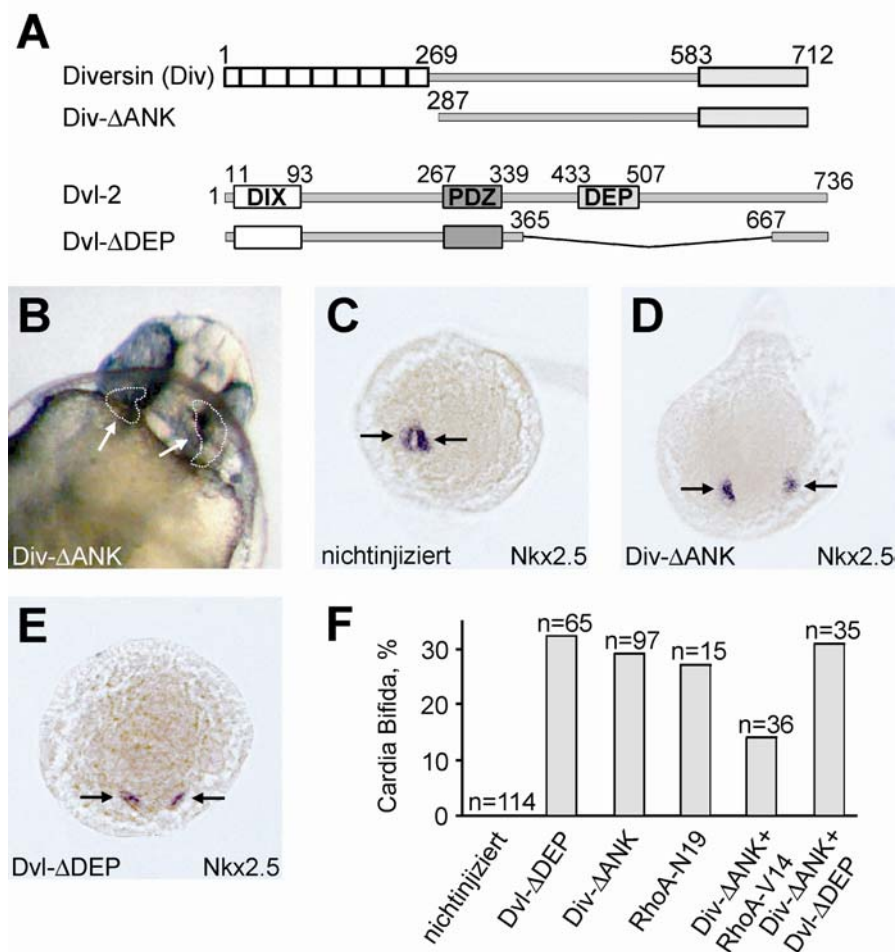


Abb. 14 Diversin kontrolliert die Fusion von Herzvorläuferzellen im Zebrafischembryo

A) Struktur der Diversin- und Dishevelled-Deletionsmutanten, die für mRNA Injektionen verwendet wurden. Zahlen zeigen die Positionen der Aminosäuren von murinem Diversin und Dishevelled an. B) Ein Zebrafischembryo im Alter von 48 Std., dem 75 pg DivΔANK-mRNA im 1-2 Zellstadium injiziert wurden, zeigt zwei separate Herzen (markiert durch Pfeile und gestrichelte Linien). Schlagende Herzen in diesem Embryo sind in einem zusätzlichem Video gezeigt. C-E) In-Situ-Hybridisierung mit *Nkx2.5* von 20 Stunden alten Zebrafischembryonen ermöglicht die Detektion einzelner und doppelter Herzvorläufer in injizierten Embryonen (Pfeile, dorsale Sicht). C) Herzvorläufer von nichtinjizierten Embryonen sind an der dorsalen Mittelachse gepaart. D, E) Embryonen, die entweder mit 75 pg DivΔANK oder DvlΔDEP mRNA injiziert wurden, zeigen Herzvorläufer, die seitlich der dorsalen Mittelachse des Embryos lokalisiert sind. F) Diversin kontrolliert Herzentwicklung über den RhoA-Signalweg. Quantifizierung der Cardia-Bifida-Phänotypen von Zebrafisch-Embryonen, die mit den angezeigten mRNAs injiziert wurden. Menge der injizierten mRNAs: DivΔANK und DvlΔDEP, 75 pg in Einzelinjektionen, 37,5 pg in Doppelinjektionen, RhoA(N19) 30 pg; RhoA(V14) 2 pg.

injizierten Embryonen konnte bereits 20 Stunden nach Befruchtung der Eizelle anhand von in situ Hybridisierung mit dem herzspezifischen Marker Nkx2.5 beobachtet werden (Abb. 14C, D, Quantifizierung in Abb. 14F). Vermutlich inhibiert Diversin, dessen Ankyrin-Repeats deletiert sind, auch die Herzentwicklung aufgrund seines dominant-negativen Effekts. Wir konnten den Cardia-Bifida-Phänotyp jedoch nicht in Embryonen durch Injektion von Diversin-MO induzieren, weil keine ausreichend hohen Konzentrationen verwendet werden konnten, ohne mit dem Kanonischen Wnt-Signalweg zu interferieren (Daten nicht gezeigt, Schwarz-Romond et al., 2002). Injektionen in Zebrafisch-Embryonen mit dominant-negativem Dishevelled, das eine Deletion der DEP-Domäne (Dvl- Δ DEP) aufweist, induzieren ebenfalls Cardia Bifida und Defekte der Konvergenz und Extension (Abb. 14E, F, Tabelle2, Matsui et al., 2005). Wir konnten zeigen, dass der Cardia-Bifida-Phänotyp, der durch dominant-negatives Diversin induziert wurde, durch Koinjektion einer konstitutiv aktiven Form von RhoA (RhoA-V14) reduziert wurde (Abb. 14F). Folglich reguliert Diversin die Herzentwicklung über den RhoA-Signalweg. Es war bereits bekannt, dass auch Dishevelled die Herzentwicklung über den RhoA-Signalweg reguliert und dementsprechend die Injektion einer dominant-negativen Form von RhoA, RhoA-N19, ebenfalls Cardia Bifida induzierte (Abb. 14F, Matsui et al., 2005). Koinjektion beider dominant-negativer Moleküle, Div- Δ ANK und Dvl- Δ DEP, zeigte keine synergistischen Effekte, d. h. die Häufigkeit von Cardia Bifida war nicht erhöht (Abb. 14F). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl Diversin als auch Dishevelled während der Zebrafischembryogenese die Herzentwicklung und die Nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktion durch ähnliche Mechanismen kontrollieren.

Diversin und Diego sind funktional nur partiell identisch

Das *Drosophila*-Gen Diego ist mit dem in Vertebraten vorkommenden Diversin verwandt und kontrolliert die Etablierung planarer Zellpolarität in der Entwicklung des Fliegenauges (Feiguin et al., 2001; Klein and Mlodzik, 2005). In Zusammenarbeit mit Andreas Jenny und Marek Mlodzik (Mount Sinai School of Medicine, New York) haben wir die Funktionen von Diversin und Diego im Fliegenauge verglichen, um eine mögliche Konservierung der Protein-Funktionen zu bestimmen. Überexpression von

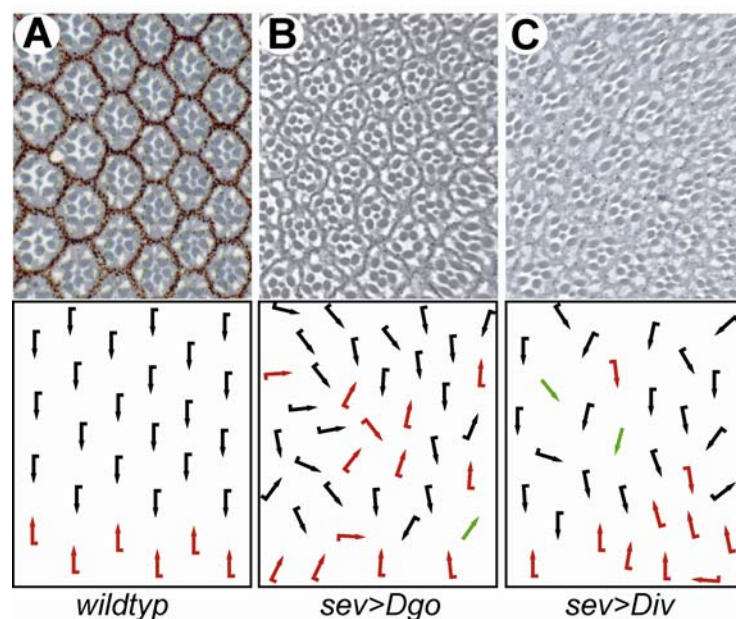


Abb. 15 Diversin beeinträchtigt den PCP-Signalweg in *Drosophila*. Alle Bilder zeigen tangentielle Querschnitte adulter Fliegenaugen der angezeigten Genotypen mit den entsprechenden schematischen Darstellungen darunter. Die Pfeile symbolisieren die Orientierung der Ommatidien, wobei dorsale und chirale in schwarz, ventrale und chirale in rot und symmetrische Ommatidien in grün (R3/R3 Typ) oder blau (R4/R4 Typ) gekennzeichnet sind (gilt auch für Abb. 9 und 10). Im Vergleich zu Wildtyp-Augen (A) führt die Überexpression von Diego (*sev>Dgo*; B) oder Diversin (*sev>Diversin*; C) zum Zeitpunkt der PCP-Signaltransduktion zu typischen PCP-Phänotypen, wie Rotations- und Chiralitätsdefekten. Transgene wurden unter der Kontrolle des Sevenless-Promotors exprimiert (Basler et al., 1991).

Diego oder Diversin beeinträchtigte die Etablierung der planaren Zellpolarität in vergleichbarer Weise (Abb. 15B, C). Die Überexpression im R3- oder R4-Photorezeptor im Auge führte zu Chiralitäts-Umkehrungen und Rotationsdefekten, was kennzeichnend ist für Veränderungen, die mit einer defizienten planaren Zellpolaritäts-Signaltransduktion zusammenhängen. Obwohl die Überexpression von Diversin einen

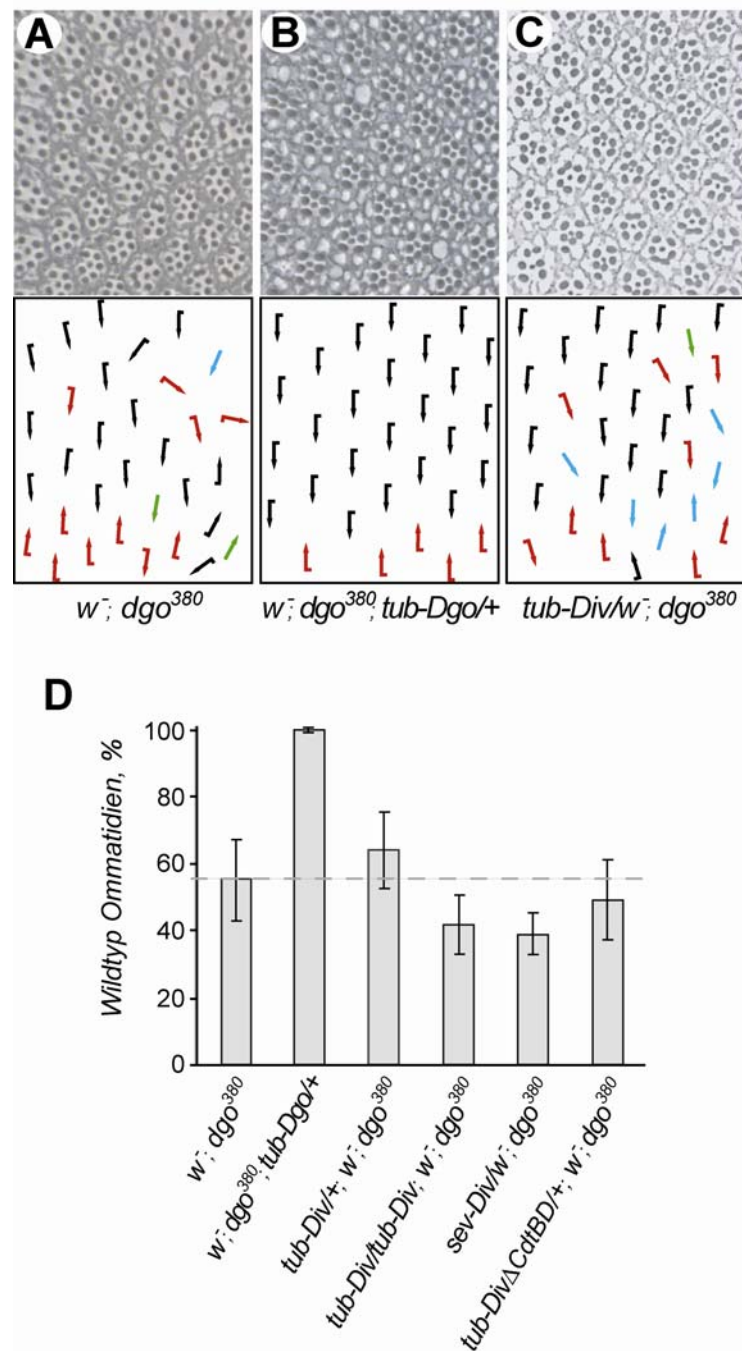


Abb. 16 Diversin kann Diego in Drosophila nicht ersetzen. A) Querschnitt eines Auges einer Dgo^{380} -Mutante. Im Gegensatz zu Dgo (B) kann die Expression von Diversin (C) die Defekte der Diego-Nullmutante nicht kompensieren. B-D) Transgene wurden unter der Kontrolle des ubiquitären Tubulin-Promotors oder unter Kontrolle des Sevenless-Promotors exprimiert. D) Quantifizierung der Experimente von A-C und zusätzlicher Experimente (siehe Text).

typischen PCP-Phänotyp verursachte, konnte der Funktionsverlust des Diego-Gens in der Diego-Mutante Dgo^{380} (Feiguin et al., 2001) zwar durch Expression von Diego aber nicht von Diversin aufgehoben werden (Fig. 16A-D). Eine Kompensation der PCP-Defekte konnte auch nicht durch Verwendung einer Diversin-Deletionsmutante (Div- Δ CdtBD, Konstrukt siehe Abb. 18A) erreicht werden, die defizient für den Kanonischen Wnt-Signalweg ist (Abb. 16D, Schwarz-Romond et al., 2002). Auch spielte es keine Rolle, ob Diversin unter der Kontrolle des sevenless-Promotors (*sev*-Div) exprimiert wurde oder zwei Diversin-Kopien (*tub*-Div/*tub*-Div) in der Fliege vorlagen (Abb. 16D).

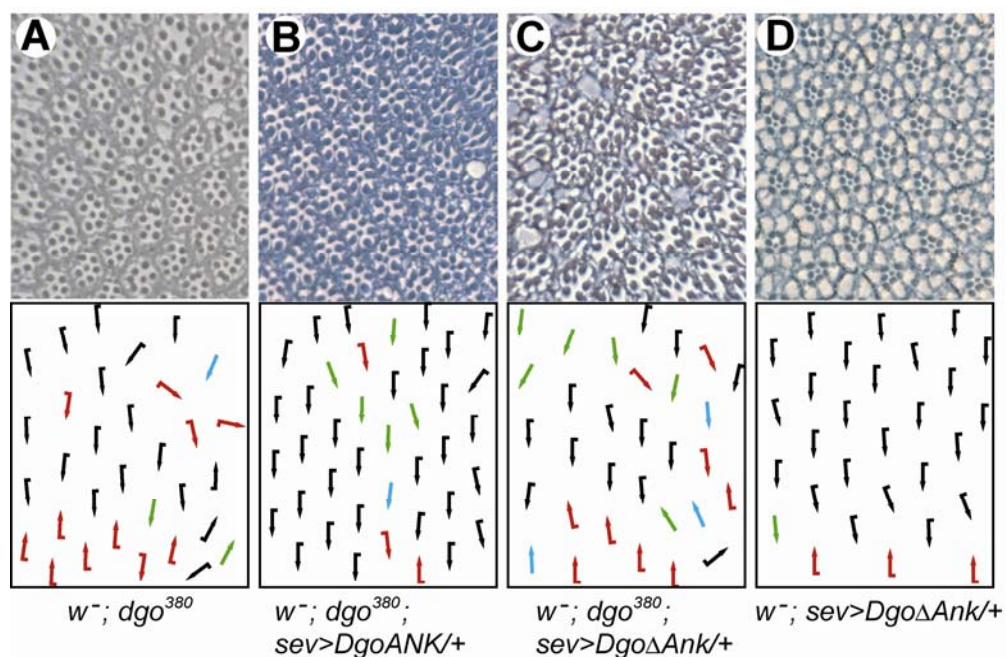


Abb. 17 Der Verlust der Diego-Funktion kann nicht durch Expression einzelner Diego-Domänen kompensiert werden. A) Der PCP-Phänotyp einer Dgo^{380} -Mutante ist gezeigt. Weder die Expression der Ankyrin-Repeats von Diego (*sev*>*Dgo*-ANK, B), noch die Expression von Diego ohne Ankyrin-Repeats (*sev*>*Dgo* Δ ANK, C) können den PCP-Phänotyp der Dgo^{380} -Mutante aufheben. D) Die Expression der Diego-Mutante *Dgo* Δ ANK im Auge der Wildtyp-Fliege erzeugt einen leichten PCP-Phänotyp.

Im Zebrafisch konnten wir zeigen, dass die Diversin-Ankyrin-Repeats sowohl notwendig als auch hinreichend für die Vermittlung von Signalen im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg waren. Dagegen konnte in der Fliege weder die Expression der Diego-Ankyrin-Repeats alleine, noch einer Diego-Deletionsmutante ohne Ankyrin-Repeats, die PCP Defekte in Dgo^{380} -Mutanten kompensieren (Abb. 17A-C). Wenn wir das *Dgo* Δ ANK-Konstrukt in Wildtyp-Fliegen überexprimierten, konnten wir leichte PCP-Defekte im Auge beobachten (Abb. 17D). Dies deutet auf einen dominant-negativen

Effekt dieser Diego-Deletionsmutante hin und stellt eine Parallele zum Effekt im Zebrafisch dar, der durch Diversin- Δ ANK-mRNA induziert wird. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass Diversin mit Komponenten des Signalwegs interagieren kann, der in *Drosophila* die Etablierung der planaren Zellpolarität reguliert. Dennoch bestehen Unterschiede zwischen Diversin und Diego, und folglich können nicht alle Funktionen von Diego durch Diversin ersetzt werden. Weitere funktionelle Unterschiede sind offensichtlich, denn Diversin spielt, im Gegensatz zu Diego, eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Kanonischen Wnt-Signalweges (Schwarz-Romond et al., 2002).

Dishevelled interagiert mit der Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg

Im zweiten Teil meiner Arbeit befasste ich mich mit der Aufklärung des molekularen Mechanismus von Diversin im Nicht-kanonischen Wnt Signalweg. Wir fanden Hinweise darauf, warum Dishevelled und Diversin in ähnlicher Weise während der Gastrulation und Organentwicklung wirken. Die entscheidende Diversin-Domäne für die Nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktion ist die Ankyrin-Repeat-Domäne (siehe oben). Wir haben deshalb einen Hefe-2-Hybrid-Screen durchgeführt, in dem die Ankyrin-Repeat-Domäne als Köder (Bait) verwendet wurde, um essentielle Interaktionspartner zu identifizieren. Beim Screenen einer humanen cDNA Bibliothek (Clontech, HY4004AH) identifizierten wir Dishevelled-2 als ein Protein, das an die Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin bindet (Tabelle 3). Neben Dishevelled-2 konnten wir weitere Proteine identifizieren, die in Hefe mit der Diversin-Ankyrin-Repeat-Domäne interagierten (Tabelle 3). Jedoch stellte sich bei Retransformation der identifizierten Klone mit Kontrollvektoren heraus, dass außer Dishevelled-2, TCP1 und JOSD3, die Klone vergleichsweise starke unspezifische Wechselwirkungen zeigten (Tabelle 3). Von den positiv getesteten Klonen konnte nur Dishevelled, dessen Klon ein ca. 2,3 kB großes Fragment enthielt, das für das vollständige Protein kodierte, eine Funktion im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg zugeordnet werden (Wharton, Jr., 2003; Wallingford and Habas, 2005).

Name der cDNA	Anzahl isolierter Klone	Transformation/ Bait (ANK)	Transformation/ Δ ANK	Transformation/ p53	Transformation/ LaminC
Marlin-1	2	++	+/-	+/-	-
DIP1	2	+/-	+/-	-	-
RANK	2	++	-	+/-	+/-
ZNF668	1	++	+/-	+/-	+/-
Snapin	1	++	+/-	+/-	+
DVL-2	1	+++	-	+/-	+/-
TCP1	1	++	-	-	-
JOSD3	1	++	-	-	-

Tabelle 3 Im Hefe-2-Hybrid-Screen identifizierte Bindungspartner der Diversin-Ankyrin-Repeat-Domäne. Dargestellt sind Namen und Anzahl der isolierten Klone und deren Bindungsverhalten in der Retransformation mit den Ankyrin-Repeats von Diversin (ANK). Als Negativkontrollen dienten eine Diversin-Deletionsmutante ohne Ankyrin-Repeats (Δ ANK), p53 und Lamin C. Starke Wechselwirkungen sind symbolisiert durch +++ und schwache bzw. nicht vorhandene durch -.

Koimmunopräzipitations-Experimente bestätigten, dass Diversin und Dishevelled-2 interagieren und dass die Ankyrin-Repeat-Domäne, aber nicht die Conductin-Bindungs-Domäne von Diversin für die Bindung von Dishevelled-2 ausreichend ist (Abb. 18A, B).

Die Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinase (JNK) wird experimentell genutzt, um Nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktion in Zellkultur aufzuzeigen (Boutros et al., 1998; Yamanaka et al., 2002). Ich konnte zeigen, dass die Expression von Diversin und Dishevelled-2 synergisiert, um JNK in humanen kultivierten Zellen (HEK293, Abb. 18C) zu aktivieren. Die Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin war essentiell und ausreichend, um mit Dishevelled-2 bei der Aktivierung von JNK zu kooperieren. So zeigte sich, dass alle Diversin-Konstrukte, die die Ankyrin-Repeats enthielten, zusammen mit Dishevelled die Aktivierung des JNK-Reporters unterstützten (Abb. 18C). Dagegen konnte keine Aktivierung der JNK bei Transfektion des dominant-negativen Diversins, Div- Δ ANK, mit Dishevelled beobachtet werden. Während der Zebrafischentwicklung agiert Diversin unterhalb des Liganden Wnt11. Wir konnten beobachten, dass Ko-Expression von Wnt11 in HEK293-Zellen zu einer verstärkten Bindung der Diversin-Ankyrin-Repeat-Domäne mit Dishevelled führt (Abb. 19A).

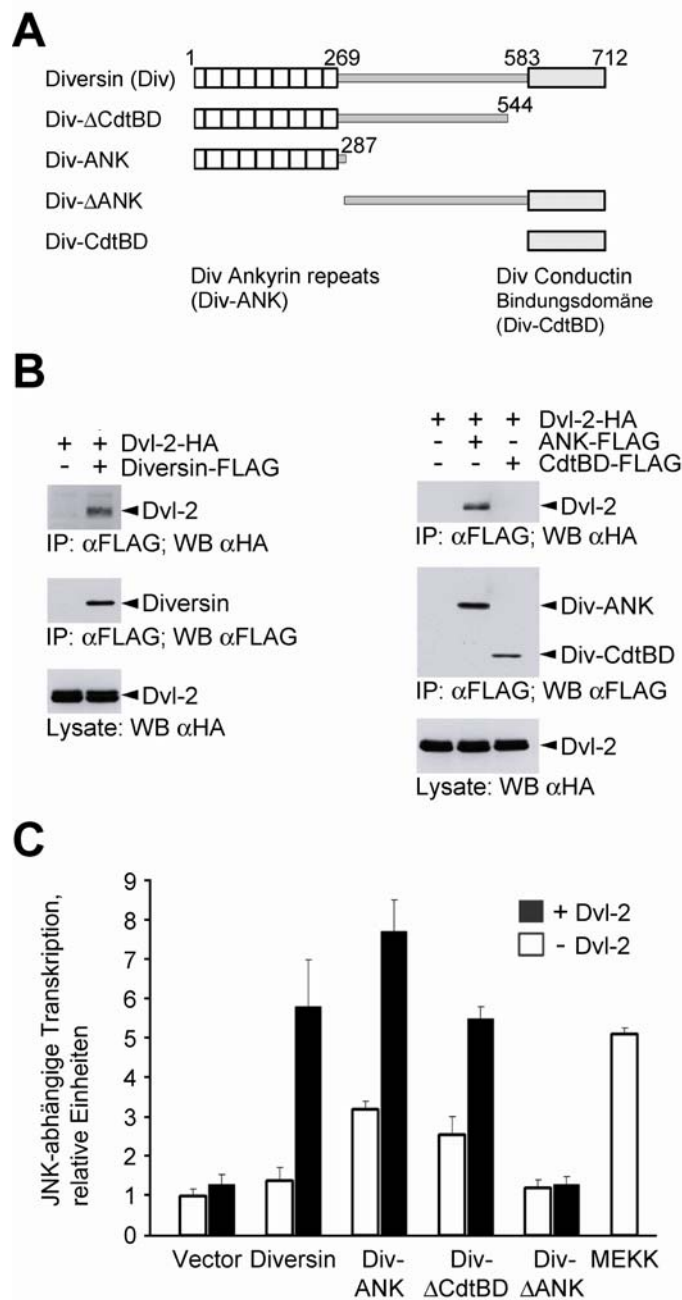


Abb. 18 Die Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin bindet an Dishevelled und ist essentiell für Dishevelled-abhängige Aktivierung des Nicht-kanonischen Wnt/JNK-Signalweges. (A) Struktur der Diversin-Domänen und -Mutanten, die verwendet wurden. (B) Interaktion von Diversin mit Dishevelled in Säugetierzellen (HEK293). Dargestellt sind Western-Blots von Anti-Dishevelled- oder Anti-Diversin-Immünpräzipitaten unter Verwendung der angezeigten Antikörper. (C) Die Ankyrin-Repeats von Diversin sind essentiell für Nicht-kanonische Wnt/JNK-Signaltransduktion. HEK293 Zellen wurden mit den angezeigten Diversin-Konstrukten (0,25 μ g) und entweder mit Dishevelled (0,25 μ g, schwarze Balken) oder Leervektor (0,25 μ g, weiße Balken) ko-transfiziert. JNK-abhängige Transkription wurde anhand von Luziferase-Aktivität bestimmt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Ein JNK aktivierendes MEKK-Konstrukt (0,25 μ g) diente als Positivkontrolle.

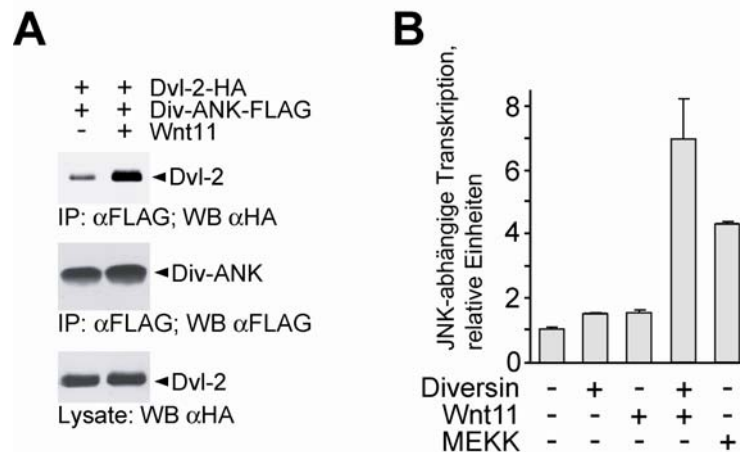


Abb. 19 Ko-Expression von Wnt11 verstärkt die Affinität zwischen Diversin und Dishevelled und führt zu synergistischer Aktivierung von JNK mit Diversin. A) Ko-Expression von Wnt11 erhöht die Affinität zwischen Diversins Ankyrin-Repeat-Domäne (Div-ANK) und Dishevelled. Westernblots von Anti-Dishevelled- und Anti-Diversin-Koimmunpräzipitaten mit und ohne Wnt11 sind gezeigt. B) Ko-Expression von Diversin (0, 25 μ g) mit Wnt11 (0, 1 μ g) führt zu synergistischer Aktivierung von JNK-abhängiger Transkription. HEK293 Zellen wurden entweder mit Diversin oder Wnt11 und Leervektor oder zusammen transfiziert.

Wnt11 induziert, in gleicher Weise wie Dishevelled, mit Diversin eine synergistische Aktivierung von JNK in HEK293-Zellen (Abb. 19B). Diese Daten belegen, dass die Interaktion von Diversin und Dishevelled durch den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, insbesondere durch Wnt11, kontrolliert wird. Um die funktionelle Interaktion von Diversin und Dishevelled bei der Vermittlung Nicht-kanonischer Wnt-Signale weiter zu untersuchen, reduzierten wir deren Expression in Säugetierzellen mittels siRNA. Die Northern-Blot-Analyse diverser Zelllinien ergab, dass Kolonkarzinomzellen SW480 Diversin und speziell Dishevelled-3 exprimieren (Daten nicht gezeigt). Die Transfektion von SW480-Zellen mit spezifischer siRNA gegen Diversin oder Dishevelled-3 führte zu einer deutlichen Reduzierung der Expression beider Gene (Abb. 20A und B). Es zeigte sich, dass der Nicht-kanonische Wnt-Signalweg in diesen Zellen durch Expression von Wnt5a und Wnt11 konzentrationsabhängig aktiviert werden kann (Abb. 20C). Die Ko-Transfektion von siRNA gegen Diversin oder Dishevelled-3, aber nicht von unspezifischer Kontroll-siRNA, blockierte die Aktivierung des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges (Abb. 20D-F). Diese Experimente zeigen deutlich, dass sowohl Diversin als auch Dishevelled für die Vermittlung Nicht-kanonischer Wnt-Signale, nicht nur im Zebrafisch, sondern auch in Säugetierzellen essentiell sind.

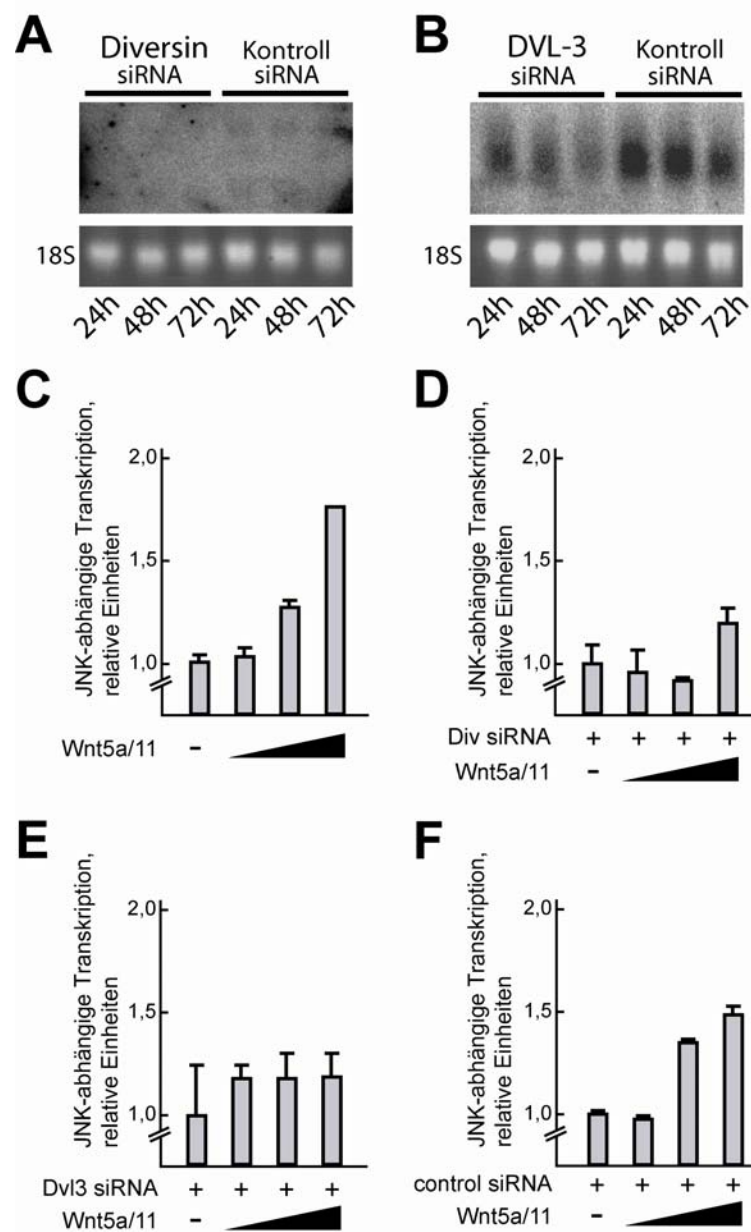


Abb. 20 Diversin ist essentiell für die Aktivierung des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges in SW480-Zellen. A, B) Diversin und Dishevelled-3 Expression in SW480 Zellen kann durch Transfektion spezifischer siRNAs reduziert werden. SW480-Zellen wurden entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (A, B) oder siRNA gegen Diversin (A) oder Dishevelled-3 (B) transfiziert. Die Menge von Diversin- und Dishevelled-3-mRNA wurde 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion durch Northern-Blot-Analyse bestimmt. Ethidiumbromid-Färbung von 18S-rRNA diente als Ladekontrolle. C-F) Transfektion von Wnt5a und Wnt11 führt zur Aktivierung von JNK-abhängiger Transkription in SW480-Zellen (C). Ko-Transfektion von siRNA gegen Diversin (D) oder Dishevelled-3 (E), aber nicht von unspezifischer Kontroll-siRNA (F), blockiert die Aktivierung von JNK.

Die DEP-Domäne von Dishevelled vermittelt dessen funktionelle Interaktion mit Diversin

Diverse Deletionskonstrukte und Punktmutationen wurden verwendet, um die essentielle Domäne von Dishevelled-2 zu bestimmen, die für die Bindung von Diversin und für die funktionelle Kooperation mit Diversin im Nicht-kanonischen Wnt Signalweg und die Aktivierung von JNK notwendig ist (Abb. 21A). Es stellte sich heraus, dass die DEP-Domäne von Dishevelled essentiell für die Bindung von Vollängen-Diversin, respektive der Ankyrin-Repeats ist (Abb. 21B). Alle Varianten, die die DEP Domäne

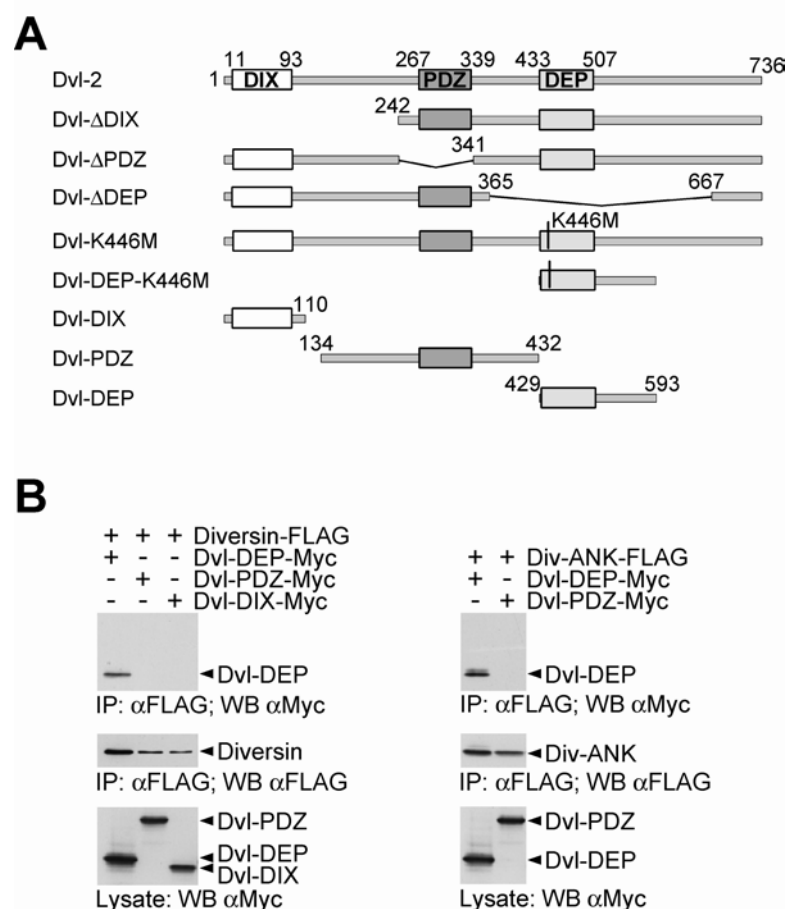


Abb. 21 Diversin bindet an die DEP-Domäne von Dishevelled. A) Übersicht der Domänen-Struktur von murinen Dishevelled-2, Deletionskonstrukten und Mutanten, die verwendet wurden sind gezeigt. B) Die DEP-Domäne von Dishevelled bindet an Diversin. Dargestellt sind Western-Blot-Analysen von immunpräzipitierten Diversin- und Dishevelled-Mutanten. Gleiche Expression der transfizierten cDNAs (3 bis 12 µg) in HEK293-Zellen wurde durch Immunoblotten unter Verwendung der angezeigten Antikörper überprüft.

von Dishevelled enthielten, kopräzipitierten mit Diversin, wohingegen die Anwesenheit oder die Deletion der DIX- oder PDZ-Domäne die Kopräzipitation nicht beeinträchtigte. Im Einklang damit kopräzipitierte eine Dishevelled-Deletionsmutante ohne DEP-Domäne nicht mit Diversins Ankyrin-Repeats, jedoch mit Casein-Kinase ϵ (CKI ϵ), die

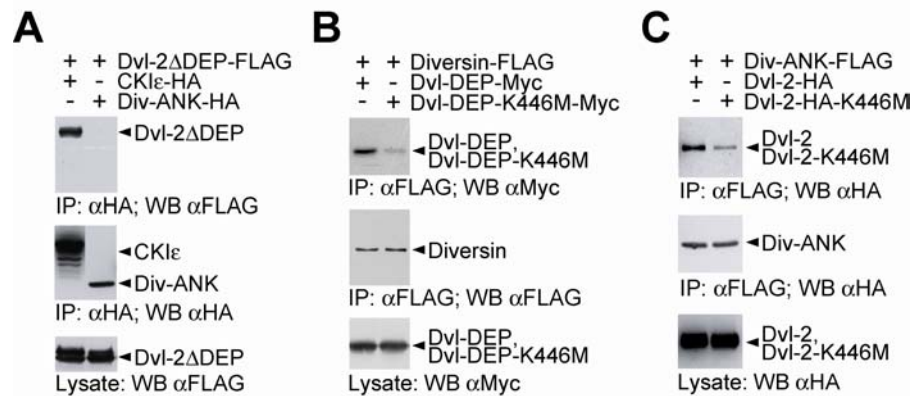


Abb. 22 Die Interaktion von Diversin mit Dishevelled ist durch die Punktmutation K446M reduziert. Dargestellt sind Western-Blots von Immunpräzipitaten der angezeigten Konstrukte. A) Die Deletion der DEP-Domäne in Dishevelled führt zum Verlust der Interaktion mit Diversin, aber nicht mit CKI ϵ , das an die Dishevelled-PDZ Domäne bindet und als Positivkontrolle diente. Die Dishevelled-Mutation K446M schwächt die Interaktion der Dishevelled-DEP Domäne mit Vollängen-Diversin (B) und mit den Diversin-Ankyrin-Repeats (C) stark ab, im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle.

an die Dishevelled-PDZ-Domäne bindet und hier als Positivkontrolle diente (Abb. 22A, (Peters et al., 1999). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass eine Punktmutation innerhalb der DEP-Domäne von Dishevelled-2, K446M, die Affinität zu Diversin oder dessen Ankyrin-Repeat-Domäne deutlich schwächte und weniger effizient mit Diversin kopräzipitierte (Abb. 22B, C). Eine analoge Mutation in *Drosophila*-Dishevelled, *dsh*¹, wurde zuvor als defizient für die PCP-Signaltransduktion beschrieben (Klingensmith et al., 1996; Boutros et al., 1998; Wong et al., 2000). Es wurde ebenfalls berichtet, dass die DEP-Domäne von Dishevelled ausreichend für JNK-Aktivierung ist (Li et al., 1999; Moriguchi et al., 1999). Wir konnten beobachten, dass Dishevelled-2-Varianten mit der Wildtyp-DEP-Domäne mit Diversin kooperierten, um JNK zu aktivieren, wohingegen die Mutante K446M nahezu inaktiv war (Abb. 21A, Abb. 23). Im Gegensatz dazu waren Dishevelled Varianten ohne DIX- oder PDZ-Domäne ausreichend, um mit Diversin in

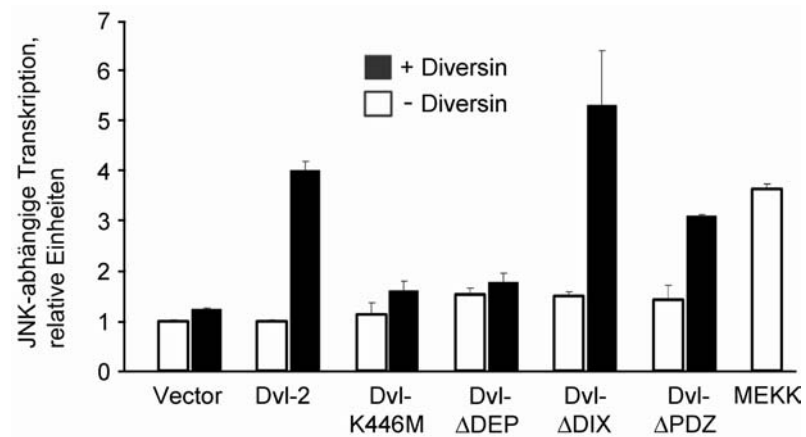


Abb. 23 Die DEP-Domäne von Dishevelled ist essentiell für Diversin-abhängige Aktivierung von JNK. Die Experimente wurden durchgeführt wie beschrieben für Abb. 11C. Indizierte cDNAs (0,25 µg) wurden mit Leervektor (weiße Balken) oder Diversin (0,25 µg, schwarze Balken) kotransfiziert.

der Aktivierung von JNK zu kooperieren. Alles in allem zeigen diese Resultate, dass die Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin die DEP-Domäne von Dishevelled bindet und dass diese beiden Domänen notwendig und ausreichend für die Aktivierung von JNK in Zellkulturexperimenten sind.