
4 Diskussion

Die koordinierte Organisation embryonaler Zellen in der Entwicklung von Metazoen ist Voraussetzung für deren Vitalität. Nicht nur die Etablierung der Körperachsen, sondern auch die Morphologie und Position von Organen erfordert den geordneten Ablauf präziser Steuerungsmechanismen. Der Nicht-kanonische Wnt-Signalweg ist ein wichtiger Bestandteil des Systems, das morphogenetische Zellbewegungen während der Embryogenese kontrolliert (Veeman et al., 2003a; Wang and Nathans, 2007). Die Folgen von Fehlfunktionen in diesem System sind gravierend.

Zur Erlangung eines besseren Verständnisses vom Zusammenwirken einzelner Komponenten der Nicht-kanonischen Wnt-Signalkaskade dienten in dieser Arbeit als Modell-Organismen die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Zebrafisch *Danio rerio*. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Beeinträchtigungen dieses Signalweges auch in höheren Organismen, wie Maus und Mensch zu embryonalen Fehlbildungen führt und Dysfunktionen von Organen wie Herz und Nieren verursachen (Wallingford, 2005; Henderson et al., 2006; Karner et al., 2006b). Die Entschlüsselung genetischer und molekularbiologischer Mechanismen, die Zellwanderungsprozesse während der Embryogenese regulieren, können Ansätze zum Verständnis pathologischer Anomalien bieten.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse rücken das Ankyrin-Repeat-Protein Diversin in den Kreis möglicher Gene, deren Fehlfunktionen in Säugetieren Embryonal- und/oder Organdefekte verursachen, die auf gestörte Zellmigration zurückzuführen sind.

Homologe der Primär-PCP-Gene von *Drosophila* kontrollieren Zellwanderungsprozesse im Zebrafischembryo

In dieser Arbeit habe ich die Funktion des Ankyrin-Repeat-Proteins Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg in der Entwicklung des Zebrafisches untersucht. Um potentielle Gewebs- oder Organ-spezifische Funktionen zuordnen zu können, habe ich zunächst die Expression von Diversin während der frühen Entwicklungsphasen bestimmt. Die Expressionsanalyse ergab kein spezielles Expressionsmuster für Diversin. Diversin ist in allen untersuchten Phasen der Entwicklung, d. h. während der Gastrulations- und der Segmentierungsperiode, ubiquitär exprimiert. Während dieser Entwicklungsphasen finden umfangreiche Positionsänderungen nahezu aller Zellen

des Embryos statt (Kimmel et al., 1995; Wallingford et al., 2002; Schier and Talbot, 2005). Da *Diversin* für die Kontrolle dieser Prozesse essentiell ist, würde man von diesem Gen ein ubiquitäres Expressionsmuster erwarten. Abweichungen sind möglich, falls homologe Gene mit redundanten Funktionen im Genom vorliegen. Bislang wurde jedoch kein zu *Diversin* homologes Gen im Zebrafisch-Genom eindeutig identifiziert. Der Vergleich der *Diversin*-Expression mit der Expression von Genen, die ebenfalls Konvergenz und Extension regulieren, kann Aufschluss über mögliche Wechselwirkungen dieser Gene mit *Diversin* geben. Es wurde gezeigt, dass die Wnt-Liganden *Wnt4*, *Wnt5a* und *Wnt11* Konvergenz und Extension im Zebrafisch kontrollieren. Der Funktionsverlust eines dieser Gene führt nur zu schwachen Defekten, wohingegen Doppel- oder Triple-Defizienzen dieser Wnt-Liganden zu schweren Gastrulationsdefekten führen, was eine Redundanz der Funktionen dieser Gene impliziert (Kilian et al., 2003; Matsui et al., 2005). Diese Wnt-Liganden sind im Gegensatz zu *Diversin* nicht ubiquitär exprimiert, sondern weisen spezielle Expressionsmuster auf, die teilweise überlappen (Blader et al., 1996; Makita et al., 1998; Matsui et al., 2005). Weitere Gene, die Konvergenz und Extension im Zebrafisch kontrollieren zeigen dagegen ubiquitäre Expression. So hat man im Zebrafischgenom drei homologe Gene identifiziert, die für das Adapter-Protein *Dishevelled* kodieren (NCBI Proteindatenbank: *Dvl1*, CAK04197; *Dvl2*, AAH44381 und *Dvl3*, AAH98888). *Dishevelled-2* und *-3* sind während der Zebrafischembryogenese ubiquitär exprimiert und besitzen redundante Funktionen (Angers et al., 2006). Auch *Frizzled-2*, *Strabismus*, *Prickle* und *Flamingo* sind in frühen Embryonalphasen im Zebrafisch nahezu ubiquitär exprimiert (Sumanas et al., 2001; Park and Moon, 2002; Carreira-Barbosa et al., 2003; Formstone and Mason, 2005). Die Expression weiterer Gene, wie *Glypican-4/6/knypek*, *Rac1* und *RhoA*, deren epigenetische Relationen zu *Diversin* in dieser Arbeit untersucht wurden, ist ebenfalls in frühen Phasen der Zebrafischembryogenese ubiquitär (Machingo et al., 2006; Zhu et al., 2006). Die überlappenden Expressionsmuster der Gene, die im Zebrafisch Konvergenz und Extension kontrollieren und auch genetische Interaktionen dieser Gene implizieren, dass der Signalweg, der in der Fliege Planare Zellpolarität kontrolliert, im Zebrafisch konserviert ist.

Ankyrin-Repeat-Domänen als Vermittler wichtiger Signalprozesse

Die Proteinsequenz von Diversin enthält acht N-terminale Ankyrin-Repeats, deren Bedeutung für die Funktion des Proteins bislang noch nicht geklärt wurde (Schwarz-Romond et al., 2002). Ankyrin-Repeats sind ein häufig vorkommendes Strukturmotiv in Proteinen, die an Signaltransduktions-Prozessen beteiligt sind. So enthalten Proteine wie der Transmembran-Rezeptor Notch oder die Tumorsuppressoren 53BP2 und INK4 Ankyrin-Repeats als wichtige Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Mosavi et al., 2004). Ein weiteres Ankyrin-Repeat-enthaltendes Protein ist Inversin. Inversin ist an der Vermittlung von Signalprozessen beteiligt, die Rechts-Links Asymmetrien in der Maus etablieren (Morgan et al., 1998). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp, der durch Fehlfunktionen des Proteins in Maus-Mutanten verursacht wird, durch Expression der Inversin-Ankyrin-Repeat-Domäne aufgehoben werden kann (Watanabe et al., 2003). Dies demonstriert, wie bedeutend die Ankyrin-Repeats für die Funktion eines Proteins sein können.

Meine Ergebnisse haben gezeigt, dass die Ankyrin-Repeat-Domäne von Diversin essentiell ist für die Vermittlung von Signalen, die Konvergenz und Extension im Zebrafisch-Embryo kontrollieren. Injektionen von Antisense-Morpholinos, die gegen Diversin gerichtet waren, induzierten starke Defekte der Konvergenz und Extension in Zebrafisch-Embryonen. Die Defekte konnten aufgehoben werden durch Koinjektionen von mRNAs, die für Vollängen-Diversin oder nur für die Ankyrin-Repeat-Domäne kodierten. Dagegen war dieser Effekt nicht zu beobachten mit einem Diversin-Konstrukt, dessen Ankyrin-Repeats deletiert waren (Div Δ ANK). Diese Ergebnisse zeigen, dass die duale Funktion Diversins als Repressor des Kanonischen und Aktivator des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges durch spezifische Domänen vermittelt wird. Während die Kasein-Kinase1 ϵ - und die Conductin-Bindedomänen unabhängig von den Ankyrin-Repeats den Abbau von β -Catenin regulieren, ist die Ankyrin-Repeat-Domäne für die Weiterleitung des Nicht-Kanonischen Wnt-Signals essentiell (Schwarz-Romond et al., 2002; Moeller et al., 2006). Bei Koinjektion von Div Δ ANK-mRNA mit Diversin-Antisense-Morpholinos in Zebrafisch-Embryonen zeigte sich eher eine Verstärkung des Konvergenz- und Extensions-Phänotyps. Ich konnte zeigen, dass die Div Δ ANK-Mutante einen dominant-negativen Effekt auf Signale hat, die Konvergenz und Extension im Zebrafisch vermitteln. Die Überexpression von PCP-Genen in Drosophila oder homologer Gene im Zebrafisch führt ebenfalls zum Verlust Planarer Zellpolarität bzw. zu Störungen der Konvergenz und Extension durch

ektopische Aktivierung des Signalweges (Strutt et al., 1997; Schwarz-Romond et al., 2002; Veeman et al., 2003b; Jenny et al., 2005). Injektion von hohen Dosen Ankyrin-Repeat-mRNA oder mRNA von Div Δ ANK in Zebrafischembryonen zeigten Defekte in Konvergenz und Extension. Um auszuschließen, dass diese Effekte auf Störungen des Kanonischen Wnt-Signalweges beruhten, wurde die Expression von Zielgenen überprüft, die durch β -Catenin-abhängige Signaltransduktion beeinflusst wird (Schier, 2001). Keiner der verwendeten Marker zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich von injizierten mit nichtinjizierten Embryonen. Die Effekte der Ankyrin-Repeat-Domäne gehen also nicht auf eine Wechselwirkung mit dem Kanonischen Wnt-Signalweg zurück. Stattdessen aktivieren die Ankyrin-Repeats in der Tat den Nicht-Kanonischen Wnt-Signalweg, während Div Δ ANK eine dominant-negative Wirkung auf den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg hat.

Diversin und Dishevelled im Kontext der Nicht-kanonischen Wnt-Signalkaskade

In Epistasis-Experimenten konnte ich Diversin als Vermittler Wnt5a- und Wnt11-induzierter Signaltransduktion identifizieren, die zur Aktivierung der kleinen GTPasen Rac und Rho führt. Auch konnte ich die Einordnung Dishevelleds als Signalvermittler unterhalb der Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 und als Aktivator der kleinen GTPasen Rac1 und RhoA im Zebrafisch-Modell bestätigen (Habas et al., 2003; Moeller et al., 2006). Die Bestimmung der Hierarchie von Diversin und Dishevelled zeigte, dass Funktionsverluste des jeweiligen Gens nicht durch das andere kompensiert werden konnten. Dies lässt vermuten, dass beide Proteine epistatisch auf gleicher Ebene agieren. In der Tat konnte ich in dieser Arbeit Dishevelled als neuen Diversin-Interaktionspartner identifizieren. Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass Diversin und Dishevelled an der Bildung eines Signalkomplexes beteiligt sind, der nur funktionsfähig ist, wenn beide Proteine über ihre funktionalen Domänen miteinander interagieren. Diversin bindet mit den Ankyrin-Repeats an die DEP-Domäne von Dishevelled. Diese Interaktion ist für die Aktivierung des Nicht-Kanonischen Wnt-Signalweges essentiell. Interessanterweise führt eine Punktmutation in der Dishevelled-DEP-Domäne (K446M) zu einer Schwächung der Diversin-Dishevelled-Interaktion und zum Verlust der Signalweiterleitung. Der spezielle Lysin-Rest ist in allen bekannten Dishevelled-Proteinen konserviert (Wharton, Jr., 2003). In *Drosophila* führt eine analoge Mutation in der Dishevelled¹-Mutante (*dsh*¹) zu Defekten der Planaren

Zellpolarität (Boutros et al., 1998). Der Funktionsverlust von Dishevelled-1 und -2 führt in der Maus zu Neuralrohrdefekten des Typs Craniorachischisis (Hamblet et al., 2002). Defekte dieser Art können durch Expression von transgenem Dishevelled-2 kompensiert werden. Die Expression von Dishevelled-2, dessen DEP-Domäne deletiert oder dessen Lysin446 mutiert ist, kann den Funktionsverlust von Dishevelled in solchen Experimenten jedoch nicht aufheben (Wang et al., 2006a). Es ist unklar, weshalb diese Mutation zum Funktionsverlust des Proteins im Nicht-Kanonischen Wnt-Signalweg führt. Die Strukturanalyse der DEP-Domäne zeigt, dass der positiv geladene Lysin-Rest einen Dipol mit zwei in räumlicher Nähe befindlichen, ebenfalls konservierten Aspartat-Resten bildet (Wong et al., 2000). Diese Aminosäure-Reste flankieren eine Bindungstasche, die vermutlich Proteininteraktionen erlaubt. Dishevelled wird bei Aktivierung des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges an die Zellmembran rekrutiert. Diese Membrantranslokation ist essentiell für die Vermittlung Nicht-kanonischer Wnt-Signale durch Dishevelled (Park et al., 2005). Während der Verlust der DEP-Domäne eine Membrantranslokation des Proteins verhindert, hat die KM-Punktmutation keinen Einfluss darauf (Axelrod et al., 1998; Wang et al., 2006a). Meine Befunde zeigen, dass die funktionale Interaktion von Diversin mit Dishevelled vom Lysin-Rest446 abhängig ist und bieten deshalb eine mögliche Erklärung, weshalb die Mutation K446M in Dishevelled zum Funktionsverlust des Proteins im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg führt.

Der Nicht-kanonische Wnt-Signalweg ist für die Herzentwicklung von Vertebraten essentiell

Die Rolle des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges in der Herzentwicklung von Vertebraten wurde zuerst in *Xenopus*-Embryonen erkannt. Injektionen von Wnt11-mRNA oder Antisense-Morpholinos, die gegen Wnt11 gerichtet waren, führten in *Xenopus*-Embryonen zu Herzdefekten. Im Frosch führt die Aktivierung des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges durch Wnt11 zur Aktivierung von PKC und JNK, wobei letzteres durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Expression Herzspezifischer Gene wie *Nkx2.5* reguliert (Pandur et al., 2002). In Zebrafisch-Embryonen wird die Herzentwicklung durch einen Signalweg kontrolliert, in dem die Nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt4, Wnt11 und Wnt11-R (related) und die Stromabwärtskomponenten Dishevelled und die kleine GTPase RhoA involviert sind.

Dieser Signalweg beeinflusst nicht die Expression von Genen, die mesodermale Zellen als Herzmuskelzellen spezifizieren, sondern er kontrolliert Migration und Fusion der Herzvorläuferzellen (Matsui et al., 2005). Injiziert man Zebrafisch-Embryonen dominant-negatives Dishevelled, um die Übertragung des Nicht-kanonischen Wnt-Signals zu blockieren, so führt das zur Entwicklung zweier separater Herzen (Matsui et al., 2005). Dieser Phänotyp wird als Cardia Bifida bezeichnet. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass Cardia Bifida nicht nur durch Injektionen von dominant-negativem Dishevelled, sondern auch von dominant-negativem Diversin in Zebrafisch-Embryonen induziert werden kann (Moeller et al., 2006). Des Weiteren wurde klar, dass auch Diversin die Fusion von Herzvorläuferzellen RhoA-spezifisch reguliert. Das verwendete dominant-negative Dishevelled-Konstrukt weist eine Deletion der DEP-Domäne auf. In Diversin führt die Deletion der Ankyrin-Repeats zu einem dominant-negativen Effekt des Proteins auf den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Einzel-Injektionen der dominant-negativen Konstrukte waren ähnlich effizient in der Induktion von Cardia Bifida wie Kombinationen beider Konstrukte, in denen jeweils die halbe Konzentration an mRNA injiziert wurde. Diese Befunde deuten daraufhin, dass dominant-negative Formen von Dishevelled und Diversin den gleichen Signalkomplex inhibieren, der die Fusion von Herzvorläuferzellen in Zebrafischembryonen kontrolliert. Interessanterweise scheint die Fusion myokardialer Vorläuferzellen unabhängig von der Konvergenz und Extension mesodermaler Zellen zu sein. Zebrafisch-Embryonen denen geringe Mengen an dominant-negativem Diversin oder Dishevelled injiziert wurden, zeigten kaum Defekte der Konvergenz und Extension, jedoch entwickelten sie Cardia Bifida (Matsui et al., 2005, und nicht gezeigte Daten). Derzeit sind acht Zebrafisch-Mutanten bekannt, deren Mutationen zur Entwicklung von Cardia-Bifida führen (Stainier, 2001). In zwei dieser Mutanten, Natter und Miles apart, scheint nur die Migration und Fusion der Herzvorläuferzellen, nicht aber deren Differenzierung gestört zu sein. In Miles apart-Mutanten ist ein Gen mutiert, das zur Familie der Lysosphingolipid G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Als Ligand dieses Rezeptors konnte Sphingosin-1-Phosphat identifiziert werden (Kupferman et al., 2000). Bislang wurde Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor(S1P-R)-vermittelte Signaltransduktion nicht mit dem Wnt-Signalweg in Verbindung gebracht. In humanen Tumorzellen aktiviert dieser Signalweg die kleinen GTPasen Rac1 und RhoA und kontrolliert Zellwanderungsprozesse (Lepley et al., 2005). Es ist jedoch nicht bekannt, ob auch der S1P-R-Signalweg im Zebrafisch, in ähnlicher Weise wie der Nicht-kanonische Wnt-Signalweg, die Fusion der Herzvorläuferzellen RhoA-spezifisch kontrolliert. Es besteht

die Möglichkeit, dass beide Signalwege auf der Ebene von RhoA konvergieren und gemeinsam die Migration der Herzvorläuferzellen kontrollieren.

In Natter-Mutanten führt eine Mutation im Fibronectin-Lokus zum Verlust des Proteins (Trinh and Stainier, 2004). Fibronectin ist ein Zelladhäsionsmolekül der Extrazellulären Matrix, das Zellwanderungsprozesse und Organisation des Zytoskeletts reguliert (Dallas et al., 2006). In Zebrafisch-Embryonen bilden Herzvorläuferzellen ein polarisiertes Epithel. Fibronectin ist für die Erhaltung der epithelialen Integrität der Herzvorläuferzellen essentiell. In Abwesenheit von Fibronectin ist die Bildung von Zelladhäsionskomplexen zwischen den einzelnen Herzvorläuferzellen gestört. Dies führt zum Verlust des polarisierten, epithelialen Charakters und defekter Fusion der Herzvorläuferpopulationen (Trinh and Stainier, 2004). In *Xenopus*-Embryonen regulieren Komponenten des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges, wie Frizzled, Prickle und Strabismus die Bildung einer polarisierten Fibronectin-Matrix, die für Zellpolarität und Interkalations-Prozesse erforderlich ist (Daggett et al., 2004). In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass Aktivierung von RhoA und Rho-assoziiierter Kinase (Rock) die Bildung von Fibronectin-Matrizes verstärkt (Yoneda et al., 2007). Des Weiteren vermittelt Fibronectin den Kontakt zwischen Zellen und der Extrazellulären Matrix durch Interaktion mit Integrinen. Diese Interaktion wird in mesodermalen Zellen in Zebrafisch-Embryonen durch Wnt11 reguliert (Puech et al., 2005). Es ist demnach wahrscheinlich, dass der Nicht-kanonische Wnt-Signalweg auf die Organisation der Extrazellulären Matrix entscheidenden Einfluss hat. Dominant-negatives Dishevelled oder Diversin könnten daher die Modulation der Extrazellulären Matrix über RhoA und Fibronectin blockieren und dadurch die Fusion myokardialer Vorläuferpopulationen verhindern. Die Analyse auf zellulärer Ebene könnte Aufschluss darüber geben, ob der Funktionsverlust von Dishevelled und Diversin zu Störungen epithelialer Integrität von Herzvorläuferpopulationen und deshalb zur Bildung von *Cardia Bifida* führt.

Vergleich der Funktion von Diversin mit seinem Drosophila-Homolog Diego

Das Kern-PCP-Gen Diego ist ein zytoplasmatisches Ankyrin-Repeat-Protein, das sechs N-terminale Ankyrin-Repeats besitzt. Der übrige Teil des Proteins zeigt keine Homologien zu bekannten Strukturmotiven (Feiguin et al., 2001). Diego ist nahester Verwandter des in dieser Arbeit charakterisierten Ankyrin-Repeat-Proteins Diversin. Um eine mögliche Konservierung der Protein-Funktionen zu bestimmen, haben wir die Funktionen von Diversin und Diego im Fliegenauge verglichen.

Der Funktionsverlust von Diego in Drosophila führt zu Defekten der Planaren Zellpolarität im Flügel und im Komplexauge (Feiguin et al., 2001). Während der Entwicklung des Komplexauges ist Diego essentiell für die Spezifizierung von R3-Vorläuferzellen. So konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von Diego in R3-Vorläuferzellen zu PCP-Defekten im Auge führt, während der Verlust von Diego in anderen Photorezeptorzellen kaum einen Effekt zeigte (Jenny et al., 2005). Überexpression von Diego in R4-Vorläuferzellen induzierte R3-Spezifikation in diesen Zellen. Dieser Effekt kann auch bei Überexpression von Frizzled in R4-Vorläuferzellen beobachtet werden, was den Schluss zulässt, dass Diego ein Aktivator des Fz-PCP-Signalweges ist. Weitere Studien belegten, dass Diego sowohl mit Frizzled als auch mit Dishevelled genetisch kooperiert, um R3-Spezifikation zu induzieren. Frizzled-induzierte Diego-Aktivierung ist also notwendig, um R3-Vorläuferzellen als R3-Photorezeptorzellen zu determinieren. Diese Aktivität muss jedoch in R4-Vorläuferzellen blockiert werden, da ansonsten aus R4-Vorläufern R3-Photorezeptorzellen entstünden. Prickle und Strabismus interagieren ebenfalls genetisch mit Diego, jedoch als Antagonisten. So induziert Überexpression von Prickle oder Strabismus in R3-Vorläuferzellen R4-Spezifikation. Es zeigte sich auch, dass Überexpression von Prickle den aktivierenden Effekt von Diego reduziert, während der Funktionsverlust von Prickle verstärkend auf Diego-induzierte PCP-Aktivierung wirkt (Jenny et al., 2005). Diese Ergebnisse belegen, dass Prickle und Diego als Antagonisten im PCP-Signalweg fungieren. Bindungsstudien in Hefe und Pulldown-Assays mit rekombinanten Proteinen zeigten, dass sowohl Diego als auch Prickle mit der PDZ-Domäne von Dishevelled interagieren. Mehr noch, Diego und Prickle konkurrieren um Dishevelled-Bindung. In R3-Photorezeptorzellen wird der PCP-Signalweg durch Aktivierung von Frizzled induziert. Diego und Dishevelled koloalisieren mit aktiviertem Frizzled und wirken als positive Effektoren auf Fz-induzierte PCP-Signaltransduktion. Durch Bindung von Diego an Dishevelled wird eine Interaktion

von Dishevelled mit dem negativen Regulator Prickle verhindert. In R4-Zellen verhindert Prickle die Interaktion von Diego mit Dishevelled und reprimiert so die Frizzled-induzierte Signalkaskade, die die Zelle ansonsten als R3 spezifizieren würde.

Unsere Experimente zeigten, dass Überexpression von Diversin oder Diego vergleichbare PCP-Defekte im Fliegenauge induziert. Diversin kann also mit Komponenten interferieren, die in der Fliege Planare Zellpolarität kontrollieren. Dennoch war es nicht möglich, PCP-Defekte in Diego-Mutanten durch Expression von Diversin zu kompensieren. Der Verlust der Diego-Funktion im Fliegenauge kann also nicht durch Diversin ersetzt werden. In Zebrafisch-Embryonen und humanen Zellen ist die Diversin-Ankyrin-Repeat-Domäne notwendig und hinreichend für die Vermittlung des Nicht-kanonischen Wnt-Signals. Dagegen konnte der Funktionsverlust von Diego in Fliegenmutanten nicht durch Expression der Diego-Ankyrin-Repeat-Domäne aufgehoben werden. Die Überexpression einer Diego-Deletionsmutante ohne Ankyrin-Repeats konnte ebenfalls den PCP-Phänotyp von Diego-Mutanten nicht aufheben. In Wildtyp-Fliegen induzierte die Expression dieser Domäne jedoch leichte PCP-Defekte, was auf einen dominant-negativen Effekt dieses Konstrukts hindeutet. Zusammengefasst implizieren diese Experimente, dass die Protein-Funktionen von Diversin und Diego nur partiell konserviert sind.

Konvergenz und Extensions-Prozesse, die in Zebrafisch-Embryonen die Etablierung der antero-posterioren Achse etablieren oder in Mausembryonen die Schließung des Neuralrohres kontrollieren sind hoch dynamische Prozesse (Schier, 2001). Es ist fraglich, ob diese Prozesse direkt mit der Etablierung Planarer Zellpolarität, die in der Fliege die Ausrichtung der Körperhaare oder die Rotation der Ommatidien kontrollieren, verglichen werden kann (Myers et al., 2002). Obwohl die gleichen homologen Gene, die in der Fliege Planare Zellpolarität kontrollieren, in Vertebraten an der Regulation Nicht-kanonischer Wnt-Signale beteiligt sind, scheint es Modifikationen des Mechanismus gegeben zu haben (Seifert and Mlodzik, 2007). Dies spiegelt sich auch in der geringen Sequenz-Homologie von Diversin und Diego wieder (Schwarz-Romond et al., 2002). Beide Proteine interagieren zwar mit Dishevelled, jedoch durch unterschiedliche Domänen. Während in Diversin die Ankyrin-Repeats die funktionale Interaktion mit der DEP-Domäne von Dishevelled vermitteln, interagiert Diego mit einer Domäne außerhalb der Ankyrin-Repeats mit der PDZ-Domäne von Dishevelled (Jenny et al., 2005; Moeller et al., 2006). In der Fliege scheint Prickle als negativer Regulator Frizzled-induzierter PCP-Signale zu wirken. Ob Prickle auch in Zebrafisch-Embryonen Signale hemmt, die Konvergenz und Extension vermitteln, muss noch geklärt werden.

Es wurde jedoch gezeigt, dass Expression von Prickle in Säugerzellen zur Aktivierung des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges führt (Veeman et al., 2003b). Es ist also relativ unklar, wie Prickle Konvergenz und Extension im Zebrafisch reguliert. Die Analyse möglicher genetischer Interaktionen von Prickle und Diversin könnte Aufschluss darüber geben, ob auch in Zebrafisch-Embryonen diese Proteine Konvergenz und Extension durch Modulation von Dishevelled-Aktivität kontrollieren. Bislang konnte in mesodermalen Zellen gastrulierender Zebrafischembryonen die asymmetrische Verteilung von homologen Proteinen, die in *Drosophila* Planare Zellpolarität kontrollieren, nicht beobachtet werden. Auch die Tatsache, dass Konvergenz und Extension in Zebrafisch-Embryonen durch Nicht-kanonische Wnt-Liganden, wie Wnt5a und Wnt11 reguliert wird, aber Planare Zellpolarität in der Fliege unabhängig von Wnt-Liganden etabliert wird, deutet an, dass es evolutionäre Modifikationen des molekularen Mechanismus gegeben hat.

Der Mechanismus Diversin-vermittelter Nicht-kanonischer Wnt-Signale

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse geben Einblick in die Funktion des Ankyrin-Repeat-Proteins Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. In Zebrafischembryonen kontrollieren die Nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt4, Wnt5a, Wnt11 und der Wnt-Korezeptor Glypican-4/6 Zellwanderungsprozesse und Zellinterkalationen während der Gastrulation, die die Ausbildung der antero-posterioren Achse etablieren (Heisenberg et al., 2000; Topczewski et al., 2001; Kilian et al., 2003; Matsui et al., 2005). Meine Ergebnisse in Zebrafisch-Embryonen und in Säugetierzellen zeigten, dass Diversin für die Vermittlung Nicht-kanonischer Wnt-Signale unterhalb der Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 und des Wnt-Korezeptors Glypican-4/6/knypek essentiell ist (Abb. 24). Damit konnte ich Diversin eindeutig in die Nicht-kanonische Wnt-Signalkaskade einordnen. Zur Vermittlung dieser Signale ist Diversins Ankyrin-Repeat-Domäne essentiell. In einem Hefe-2-Hybrid-Screen konnte ich Dishevelled als neuen Interaktionspartner von Diversin identifizieren. Dishevelled gilt als erste intrazelluläre Schaltstation im Wnt-Signalweg und kanalisiert Kanonische und Nicht-kanonische Wnt-Signale (Wharton, Jr., 2003; Wallingford and Habas, 2005).

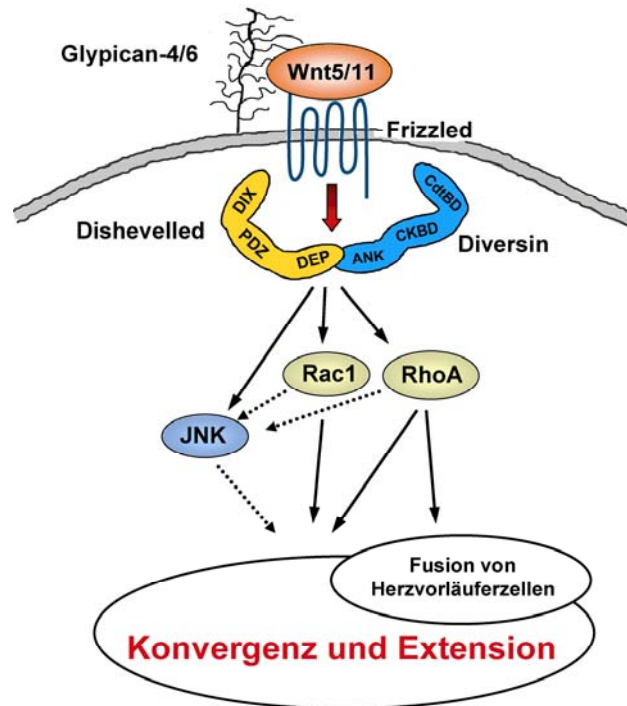


Abb. 24 Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Funktion von Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Bindung der Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 an Frizzled (Fz) und den Wnt/Fz-Korezeptor Glypican-4/6 initiiert die Bildung eines Diversin-Dishevelled-Komplexes. Die funktionale Interaktion der Diversin-Ankyrin-Repeat-Domäne mit der Dishevelled-DEP-Domäne führt zur Aktivierung der Stromabwärts-Effektoren Rac1, RhoA und c-Jun N-terminale Kinase (JNK). Im Zebrafisch-Modell kontrolliert dieser Diversin-abhängige Signalweg die Fusion von Herzvorläuferzellen über RhoA. Für die Kontrolle von Konvergenz und Extension mesodermaler Zellen sind sowohl RhoA als auch Rac1 notwendig. Der Einfluss von JNK auf die Kontrolle von Konvergenz und Extension und die Aktivierung von JNK durch Rac1 und RhoA wurde in der Literatur beschrieben (gestrichelte Linien, siehe Text).

Meine Bindungsstudien haben gezeigt, dass Diversin mit seinen Ankyrin-Repeats an die DEP-Domäne von Dishevelled bindet. Diese Interaktion wird durch Ko-Expression von Wnt11 signifikant verstärkt und initiiert die Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinase (JNK). In Zellkulturexperimenten und in diversen Tiermodellen, wie *Drosophila*, *Xenopus* und Zebrafisch konnte JNK eine Rolle im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg zugeordnet werden (Riesgo-Escovar et al., 1996; Boutros et al., 1998; Li et al., 1999; Moriguchi et al., 1999; Yamanaka et al., 2002). Epistatisch agieren Diversin und Dishevelled auf einer Ebene oberhalb der kleinen GTPasen Rac1 und RhoA. Beide Gene wurden als Stromabwärts-Effektoren Nicht-kanonischer Wnt-Signale und Aktivatoren von JNK beschrieben (Strutt et al., 1997; Habas et al., 2003; Rosso et al., 2005; Zhu et al., 2006). Deletionen der im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg aktiven Domänen, in Diversin die Ankyrin-Repeats und in Dishevelled die DEP-Domäne,

führen zum Verlust der funktionalen Interaktion. Beide Deletionsmutanten haben einen dominant-negativen Effekt auf den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. In meinen Experimenten konnte ich zeigen, dass sie in Zebrafisch-Embryonen Defekte der Konvergenz und Extension induzieren, die durch Rac1 und RhoA kompensiert werden können. Des Weiteren konnte ich demonstrieren, dass nicht nur dominant-negatives Dishevelled, sondern auch dominant-negatives Diversin RhoA-vermittelte Fusion von Herzvorläuferzellen blockiert, was zur Induktion von Cardia Bifida führt (Matsui et al., 2005; Moeller et al., 2006). Die von mir vorgelegten Daten zeigen, dass Diversin und Dishevelled eine funktionale Einheit bilden, die Nicht-kanonische Wnt-Signale verstärkt. Da beide Proteine Adapter-Moleküle sind, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, sind sie vermutlich Bestandteil eines Signalkomplexes (Schwarz-Romond et al., 2002; Wallingford and Habas, 2005). Bislang ist unklar, wie der Diversin-Dishevelled-Signalkomplex durch Wnt-Liganden initiiert wird. In meinen Experimenten konnte ich beobachten, dass die Diversin-Dishevelled-Bindung durch Wnt11 verstärkt wird. Diversin kooperiert in Zebrafisch-Embryonen und in Säugerzellen mit Wnt5a und Wnt11, was zur Potenzierung des Wnt-Signals führt. Demnach könnte es sein, dass die Aktivierung von Frizzled-Rezeptoren durch Nicht-kanonische Wnt-Liganden einen Mechanismus in Gang setzt, der die Interaktion zwischen Diversin und Dishevelled initiiert. Die Aktivierung des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges induziert die Membrantranslokation von Dishevelled, die essentiell ist zur Vermittlung des Wnt-Signals (Pan et al., 2004; Park et al., 2005; Witzel et al., 2006). Weitere Studien belegen, dass Nicht-kanonische Wnt-Liganden wie Wnt5a und Wnt11 die Phosphorylierung von Dishevelled durch Kasein-Kinase1 ϵ induzieren, ohne dass dies zur Stabilisierung von β -Catenin führt (Gonzalez-Sancho et al., 2004; Bryja et al., 2007). In diesen Studien konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Dishevelled-Phosphorylierung auch durch Kanonische Wnt-Liganden, wie Wnt1 und Wnt3a induziert wird und in diesem Fall zur Stabilisierung von β -Catenin führt. Damit wurde gezeigt, dass die Signalspezifität von CK1 ϵ durch spezielle Wnt-Liganden bestimmt wird. CK1 ϵ kann sowohl an Dishevelled als auch an Diversin binden (Peters et al., 1999; Schwarz-Romond et al., 2002). Demnach könnte es die Diversin-Dishevelled-Interaktion stabilisieren. Zusätzlich bietet dieses Modell einen Erklärungsansatz für den dominant-negativen Effekt der Deletionsmutanten Diversin- Δ ANK und Dishevelled- Δ DEP. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Rac1 direkt an die DEP-Domäne und RhoA über das Adapter-Molekül Daam1 an Dishevelled bindet (Habas et al., 2001; Habas et al., 2003). Die Aktivierung von Rac und Rho wird durch

Guaninnucleotidaustauschfaktoren (GEF) vermittelt (Rossman et al., 2005). In Zebrafisch-Embryonen reguliert der Rho-GEF Quattro Konvergenz und Extension (Daggett et al., 2004). Allerdings ist noch unklar, ob der Nicht-kanonische Wnt-Signalweg involviert ist.

Zusammengenommen weisen diese Daten daraufhin, dass Diversin und Dishevelled einen Signalkomplex bilden, der durch Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen die Aktivierung der kleinen GTPasen Rac und Rho durch GEFs ermöglicht. Auf diese Weise wird das extrazelluläre Nicht-kanonische Wnt-Signal in eine intrazelluläre Antwort übersetzt. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weitere Experimente erforderlich. So könnte in Hefe-2-Hybrid-Screens mit Diversin oder Dishevelled als Bait (Köder) gezielt nach Interaktionspartnern gesucht werden, die die Aktivität von kleinen GTPasen regulieren. Ein etwas umfassenderer Ansatz könnten Expressionsanalysen von gastrulierenden Zebrafischembryonen mittels Gen-Chips bieten. In *Drosophila* reguliert CKI ϵ die Rotation der Ommatidien während der Entwicklung des Komplexauges und die Ausrichtung der Flügelhärchen durch den Planare Zellpolaritätsweg (Strutt et al., 2006; Klein et al., 2006). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass CKI ϵ auch in Zebrafischembryonen in der Regulation des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges involviert ist. Durch den Einsatz von Antisense-Morpholinos, die gegen CKI ϵ und/oder dessen Homolog CKI δ gerichtet sind, könnten die Auswirkungen des Funktionsverlustes dieser Kinasen auf die Entwicklung des Zebrafisches studiert werden. Zudem erlaubt dieser experimentelle Ansatz die Überprüfung genetischer Implikationen von Diversin und Dishevelled mit CKI ϵ/δ . Um ein besseres Verständnis für die Initiation eines Diversin-Dishevelled-Signalkomplexes zu erhalten, könnte die Membran-Rekrutierung von GFP-fusionierten Dishevelled- und Diversin-Konstrukten in Zebrafischmutanten wie Silberblick, Pipetail, Knypek oder Morpholino-induzierten Embryonen während der Gastrulation verfolgt werden. Zur Aufklärung der Funktion von Diversin im Säugetiermodell ist es notwendig, Diversin-defiziente Mäuse zu generieren, zu analysieren und genetische Interaktionen durch Kreuzungen mit Maus-Mutanten, wie Dishevelled-1 oder -2-Knock-out-Mäusen, Looptail (VanGogh-like-2)- und/oder Crash/Spin Cycle (Flamingo)-Mutanten zu identifizieren. Der Funktionsverlust von Diversin in Mäusen könnte zu Neuralrohrdefekten, Defekten des sensorischen Epithels im Innenohr, Herzdefekten und Defekten des Zentralen Nervensystems führen (van Amerongen and Berns, 2006; Henderson et al., 2006; Jenny and Mlodzik, 2006; Karner et al., 2006b). Diese experimentellen Möglichkeiten bieten weitere Ansätze, um ein tieferes Verständnis für die Funktion des Ankyrin-Repeat-Proteins Diversin im Wnt-

Signalweg zu erlangen. Diversin agiert im Wnt/ β -Catenin-Signalweg als negativer Regulator (Schwarz-Romond et al., 2002). Deshalb könnte Diversin an der frühen Induktion der dorso-ventralen Körperachse in Mäusen beteiligt sein oder möglicherweise als Tumorsuppressor in adulten Mäusen fungieren. Diversin-defiziente Mäuse könnten deshalb eine höhere Suszeptibilität für Tumoren entwickeln, vergleichbar mit APC-Maus-Mutanten und als Tumormodell dienen (Moser et al., 1995; Clarke, 2006). Die Analyse dieser Mäuse wird zeigen, ob Diversin im Kanonischen und/oder Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg im Säugetier-Modell eine wichtige Rolle spielt.