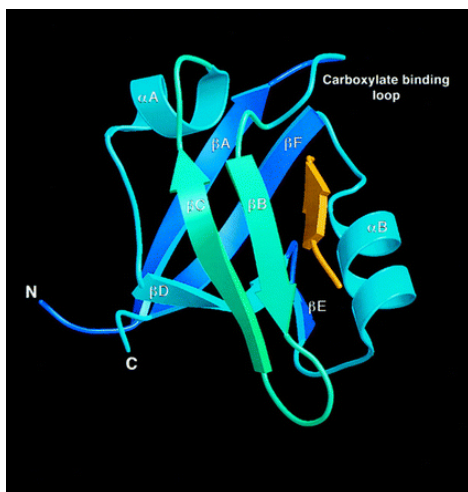


# 1 EINLEITUNG

## 1.1 PDZ-Proteine und Signaltransduktion

Die Regulation von Vorgängen in der Zelle sowie zwischen Zellen und Zellverbänden umfaßt koordinierte, komplex gesteuerte Signaltransduktionskaskaden. Protein-Proteininteraktionen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Diese können durch Proteindomänen vermittelt werden. Zahlreiche Domänen mit spezifischen Liganden konnten bereits identifiziert werden. Eine dieser Domänen ist die ca. 90 Aminosäuren umfassende PDZ-Domäne, die mit Protein C-Termini interagieren kann. Der Name PDZ wurde von den drei Proteinen PSD-95/SAP90, Dlg und ZO-1 abgeleitet (Cho *et al.*, 1992; Woods und Bryant, 1991; Itoh *et al.*, 1993). Erstmals wurde diese Domäne, als DHR (Dlg Homology Region)-Domäne, für die Dlg-R (disc-large-R) Protein-Familie beschrieben (Koonin *et al.*, 1992). 1995 publizierten C. P. Ponting und C. Phillips zahlreiche PDZ-ähnliche Sequenzen und beschrieben diese als häufige Domäne von Proteinen (Ponting und Phillips, 1995). Im Genom von *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* wurden bis 2003 92, 131 bzw. mehr als 400 Proteine mit einer PDZ/DHR-Domäne detektiert (Nourry *et al.*, 2003). PDZ-Domänen gliedern sich in zwei alpha-Helixe ( $\alpha$ A,  $\alpha$ B), sechs beta-Faltblätter ( $\beta$ A- $\beta$ F) und einen Bindungsloop. Die Abfolge der strukturellen Einheiten ist für alle typischen PDZ-Domänen übereinstimmend:  $\beta$ A, Bindungsloop,  $\beta$ B,  $\beta$ C,  $\alpha$ A,  $\beta$ D,  $\beta$ E,  $\alpha$ B,  $\beta$ F (Abb. 1.1). Der Bindungsloop weist eine Konsensussequenz mit der Aminosäureabfolge -GLGF- auf. Veränderungen im Bereich dieser Konsensussequenz führen häufig zu einer Aufhebung der PDZ-abhängigen Proteininteraktion. Erstmals konnten für bakterielle Proteasen, im Einzelfall später auch für Säugetierproteasen, PDZ-ähnliche Domänen beschrieben



**Abb. 1.1: Darstellung einer PDZ-Domäne von PSD-95.** Dreidimensionale Darstellung der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 (blau-grün), mit gebundenem Peptid (gelb). (Doyle *et al.*, 1996)

werden, die von der typischen Strukturabfolge abweichen (*Li et al., 2002*). Sie zeigen, z.T. verschoben, kurze Sequenzhomologien zu typischen PDZ-Domänen (*Wenyu et al., 2002*). Für (eine) PDZ-Domäne(n) kodierende Proteine wurden in drei Klassen unterteilt (**Tabelle 1.1**).

---

**Tabelle 1.1: Klassifizierung von PDZ-Proteinen**

---

Klasse I	PDZ-Proteine ohne intrinsische Enzymaktivität
Klasse I-1	PDZ-Proteine ohne weitere definierte funktionelle Domäne (Bsp.: Syntenin)
Klasse I-2	PDZ-Proteine mit weiteren funktionellen Domänen (Bsp.: Scribble, Erbin, PSD-95)
Klasse II	PDZ-Proteine mit intrinsischer Enzymaktivität (Bsp.: nNOS)
Klasse III	Proteine mit PDZ-ähnlichen Domänen (Bsp.: membranständige Protease mit PDZ-ähnlicher Domäne: EcfE; mitochondriale Proteasen mit PDZ-ähnlichen Domänen: HtrA2)

---

(*Nourry C. et al., 2003*)

Andererseits wurden auch die C-Termini der Proteine, die mit PDZ-Domänen interagieren können, in drei Klassen eingeteilt:

Typ I: - S/T - X - V/I/L,

Typ II: - Ψ - X - Ψ,

Typ III: - D - X - V,

wobei X für eine beliebige und Ψ für eine hydrophobe Aminosäure steht (*Songyang et al., 1997*). In selten beschriebenen Fällen interagiert nicht der C-Terminus eines Proteins mit der PDZ-Domäne, sondern eine interne Proteinsequenz, die einen beta-Finger (beta-hairpin Struktur) ausbildet. Eine Dimerisierung von zwei PDZ-Proteinen, vermittelt durch einen beta-Finger, wurde ausführlich für die Interaktion zwischen nNOS (neuronal nitric oxide synthase) und PSD-95 beschrieben (*Tochio et al., 2000*). PDZ-Proteine können vielfältige Funktionen erfüllen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Komplexierung und Verankerung transmembranaler Proteine (*Kim et al., 1995*). PSD-95 interagiert mit membranständigen Proteinen, wie dem Ionenkanalprotein Kv1.4 (*Imamura et al., 2002*) oder dem neuronalen Rezeptor NMDA (*Shiraishi et al., 2003*) und bildet mit ihnen große Proteinkomplexe. Sobald das C-terminale PDZ-Bindemotiv verändert wird, werden diese Proteinkomplexe nicht mehr gebildet (*Rao et al., 1997*).

PDZ-Proteine beeinflussen die Ausbildung zellulärer Strukturen, z.B. sind ZO-1 und AF-6 an der Bildung von "tight junction" beteiligt (*Yamamoto et al., 1997*).

PDZ-Proteine wie z.B. Scribble und Erbin regulieren die epitheliale Polarität (*Bilder et al., 2003*; *Warner et al., 2003*). Scribble wurde als essentielles Protein für die Zellpolarität in Säugerzellen identifiziert (*Montcouquiol et al., 2003*).

---

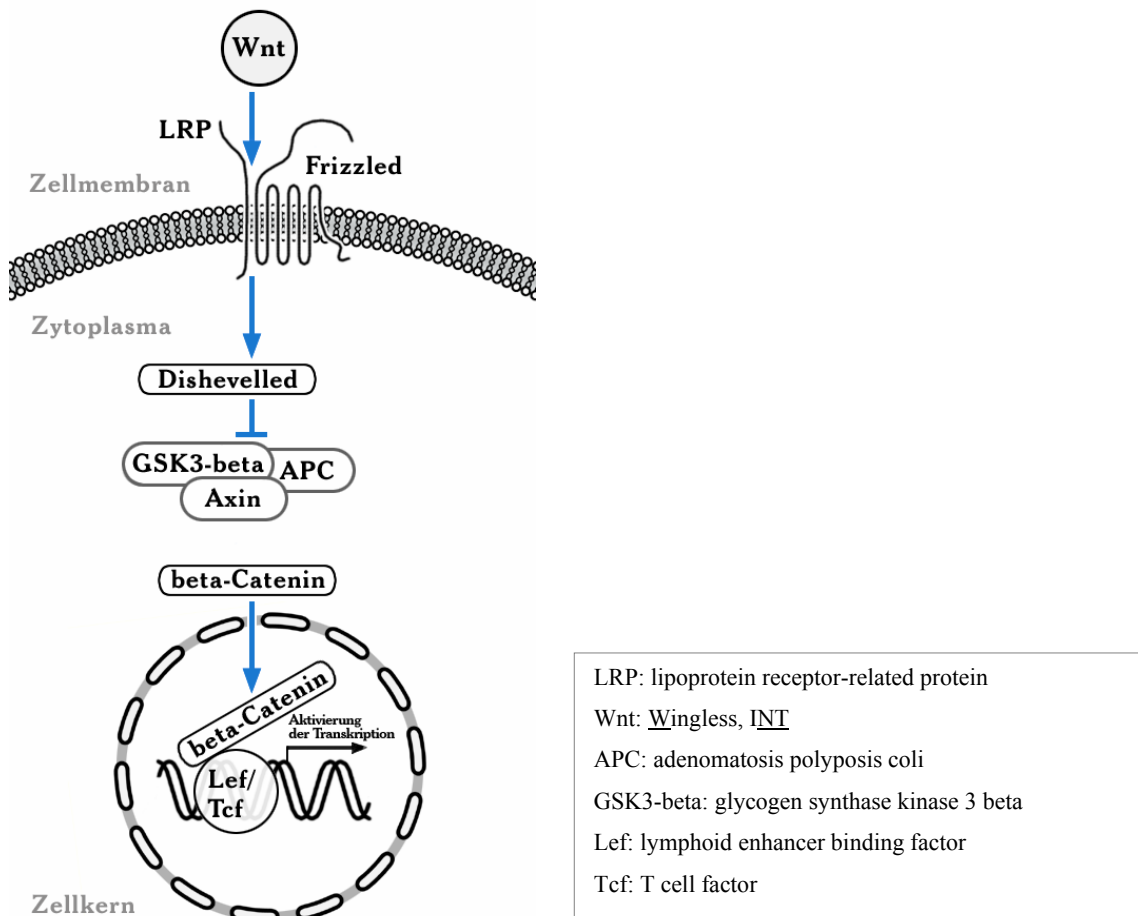
Wie bereits erwähnt, können Proteasen PDZ-ähnliche Domänen aufweisen, wobei die Proteaseaktivität durch Bindung eines spezifischen Liganden reguliert wird. Die PDZ-ähnliche Domäne der mitochondrialen Protease HtrA2 (High temperature requirement protein 2)/Omi moduliert durch Bindung an Protein C-Termini ihre eigene Proteaseaktivität, die Einfluß auf die Apoptose nimmt (*Li et al., 2002*). Mxi2 (Max-interacting protein 2), Spleißvariante der Proteinkinase p38, führt als PDZ-abhängiger Interaktionspartner von HtrA2/Omi zu einer Aktivierung dessen Proteaseaktivität (*Faccio et al., 2000*).

## 1.2 Der Wnt-Signaltransduktionsweg

### 1.2.1 Proteine des Wnt-Signaltransduktionsweges

Der Wnt (Wingless, INT)-Signaltransduktionsweg reguliert zahlreiche Zielgene, deren Transkription während der Embryogenese von Bedeutung ist. In der adulten Phase führt eine verstärkte Aktivierung vieler Zielgene in die Tumorprogression.

Der Wnt-Signaltransduktionsweg wird durch eine Abfolge von Protein-Proteininteraktionen und Phosphorylierungsereignissen bestimmt, die die Transkription der Zielgene des Wnt-Signalweges regulieren (**Abb. 1.2**). Die dargestellten Proteine sind im nachfolgenden Text erklärt und mit erstmaliger Erwähnung fett gedruckt.



**Abb. 1.2:** Der Wnt-Signaltransduktionsweg. Darstellung der klassischen Abfolge von Protein-Proteininteraktionen im Wnt-Signaltransduktionsweg unter Wnt-induzierten Bedingungen.

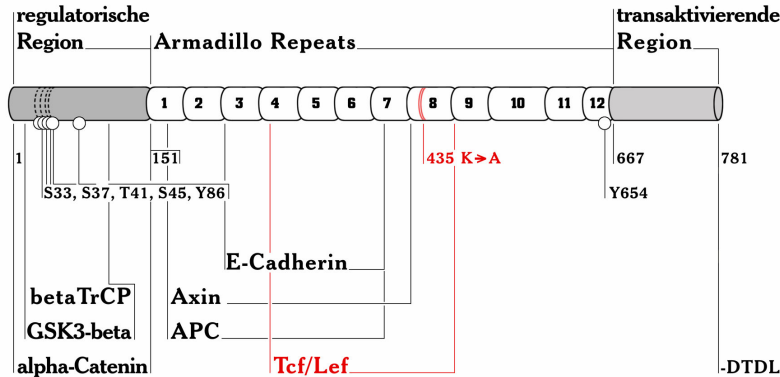
Die **Wnt-Proteine** sind Stimulatoren des Wnt-Signaltransduktionsweges und gehören zur Familie der sezernierten cysteinreichen Glykoproteine. Die sezernierten Formen gehen aus längeren Vorläuferproteinen durch Abspaltung N-terminaler hydrophober Signalpeptide hervor. Bisher sind 19 humane Wnt-Proteine beschrieben. Der Name wurde abgeleitet von dem *Drosophila*-Protein Wingless (Wg), einem wichtigen Protein der Embryonalentwicklung, und dem Protoonkoprotein INT-1 (Wnt-1) der Maus (*Sharma und Chopra, 1976*). Aus der humanen Wnt-Familie wurde Wnt-1 (Wingless-type MMTV integration site family, member 1) umfangreich untersucht. Es ist ein Protoonkoprotein und nimmt Einfluß auf die Entwicklung des Nervensystems. Wnt-1 konnte als bevorzugtes Integrationsziel des Retrovirus MMTV (mouse mammary tumour virus) in Brustadenokarzinomen identifiziert werden (*Nusse et al., 1991; Nusse et al., 1990; Sokol et al., 1991; Jue et al., 1992*). WNT-2, WNT-5A, WNT-7B werden in humanen Brustkarzinomen stark exprimiert (*Dale et al., 1996; Huguet et al., 1994; Iozzo et al., 1995; Lejeune et al., 1995*). Wnt-Proteine regulieren die Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges im Komplex mit **Frizzled** und dem Korezeptor **LRP** (lipoprotein receptor-related protein) (*Wehrli et al., 2000*). Frizzled ist ein Sieben-Transmembranrezeptor mit extrazellulären cysteinreichen Regionen und einem variablen zytoplasmatischen Teil, der mittels des C-Terminus mit dem PDZ-Protein Dishevelled interagiert.

**Dishevelled** nimmt Einfluß auf die beta-Catenin/Tcf-abhängige wie auch auf die Jun-abhängige Transkription (*Li et al., 1999*). Dishevelled reguliert die Aktivität der Serin/Threonin-Kinase **GSK3-beta**. Durch einen bisher nicht bekannten Mechanismus führt die Interaktion zwischen Wnt und Frizzled zu einer Hyperphosphorylierung von Dishevelled, wodurch die Kinaseaktivität von GSK3-beta inhibiert wird (*Yanagawa et al., 1995*). Unter nicht Wnt-induzierten Bedingungen ist GSK3-beta aktiv und bildet mit beta-Catenin und Axin einen zytoplasmatischen Protein-komplex. GSK3-beta phosphoryliert beta-Catenin im Bereich des N-Terminus, was zum proteolytischen Abbau von beta-Catenin führt (*Behrens et al., 1998; Noort et al., 2002*).

**Beta-Catenin** gliedert sich in drei Proteinregionen: regulatorische Region, Armadillo "repeats" und transaktivierende Region (**Abb. 1.3**). Beta-Catenin wurde als Komponente von "adherens junction" identifiziert, wo es als Interaktionspartner von E-Cadherin und alpha-Catenin E-Cadherin mit dem Zytoskelett verankert ist (*Nagafuchi et al., 1989; Gumbiner et al., 1993*). Src, erstmals identifiziert als Tyrosinkinase vom Rous-Sarkom-Virus, kann durch Phosphorylierung von beta-Catenin diesen Komplex dissoziieren, was zur Aufhebung der epithelialen Zelladhäsion führen kann (*Hu P., 2001*). Im Komplex mit den T-Zell-Faktoren (Tcf) ermöglicht beta-Catenin mit seiner transaktivierenden Domäne eine aktive Transkription der Zielgene vom Wnt-Signaltransduktionsweg. Die Stabilität von beta-Catenin wird durch Phosphorylierungen reguliert. Beta-Catenin weist am N-Terminus vier Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen in den Positionen 33, 37, 41, 45 auf. Die Casein-Kinase I $\alpha$  (CKI $\alpha$ ) oder CKI $\epsilon$  phosphoryliert beta-Catenin am Ser-45. Dies erlaubt Phosphorylierungen in den Positionen Ser-33, Ser-37 und Thr-41 durch die Serin/Threonin-Kinase GSK3-beta. Die Phosphorylierungen in den Positionen Ser-33

und Ser-37 sind die Voraussetzung der Bindung des F-Box Proteins betaTrCP (beta-transducin repeat-containing protein), das beta-Catenin zum proteolytischen Abbau führt (Hülsken und Behrens, 2002; Morin et al., 1999; Polakis et al., 2001).

**beta-Catenin**



**Abb. 1.3: Proteindomänenstruktur von beta-Catenin.** Oberhalb der schematischen Darstellung sind die Domänen von beta-Catenin, unterhalb sind ausgesuchte Proteininteraktionspartner mit den entsprechenden Binde-domänen beschrieben. Im N-terminalen Bereich sind die Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen markiert, die für den Abbau von beta-Catenin benötigt werden. Weiterhin sind die beiden Tyrosinphosphorylierungsstellen Y86 und Y654 gekennzeichnet, die durch Src phosphoryliert werden können. Rot markiert ist die Binderegion der Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren. Die beta-Catenin(K435A)-Mutante ist stark eingeschränkt in ihrer Bindungsfähigkeit mit den Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren. Die C-terminale Sequenz (-DTDL) ist Zielsequenz für PDZ-Domänen. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

Die Menge an nukleärem beta-Catenin reguliert die Tcf-abhängige Transkription entscheidend. Die Stimulierung des Wnt-Signaltransduktionsweges inhibiert den Abbau von beta-Catenin und kann zur Translokation von beta-Catenin in den Zellkern führen. Nukleäres beta-Catenin in Tumoren als Folge eines induzierten Wnt-Signaltransduktionsweges wird als Onkoprotein beschrieben (He et al., 1998; Tetsu et al., 1999).

**APC** (adenomatosis polyposis coli) fungiert als negativer Regulator des Wnt-Signaltransduktionsweges und beeinflusst als Interaktionspartner von beta-Catenin dessen proteolytischen Abbau (Fodde et al., 2002). APC spielt eine wichtige Rolle während der Zelladhäsion, der Zellzyklusregulation und beeinflusst die Chromosomenstabilität (Peifer et al., 2000).

**Axin** ist ein weiterer negativer Regulator des Wnt-Signaltransduktionsweges. Er steigert die Phosphorylierung von beta-Catenin durch GSK3-beta (Kikuchi et al., 1999). Axin reguliert somit ebenfalls den Abbau von beta-Catenin. Die Expression von Axin führt in Zellen, die einen konsti-

tativ aktiven beta-Catenin/Tcf-Signalweg (SW480-Zellen, Kolonkarzinomzellen) oder einen normal regulierten Wnt-Signaltransduktionsweg aufweisen (cos-Zellen, Affennierenzellen), zur Degradation von beta-Catenin (*Kishida et al., 1998; Kishida et al., 1999*).

Die **Transkriptionsfaktoren** Tcf1, Tcf3, Tcf4 und Lef1 können im Komplex mit beta-Catenin die Transkription der Zielgene vom Wnt-Signaltransduktionsweg regulieren. Sie verfügen über eine DNA-bindende Region, aber über keine transaktivierende Domäne. Diese wird von beta-Catenin bereitgestellt. Tcf4 wurde in vielen Tumoren als nukleärer Komplex mit beta-Catenin und Aktivator des Wnt-Signaltransduktionsweges charakterisiert. Tcf1 wurde als "Feedback"-Repressor von Tcf4 beschrieben (*Roose et al., 1999*). Viele Spleißvarianten von Tcf1 verfügen nicht mehr über die beta-Catenin Bindungsdomäne und könnten nach DNA-Bindung im Zellkern die Transkription blockieren. Tcf3 ist als wichtiger transkriptioneller Regulator der Induktion der Axisformation für die Maus beschrieben (*Merrill et al., 2004*). Ein weiterer Transkriptionsfaktor des Wnt-Signaltransduktionsweges ist Lef1, welcher ebenfalls nicht allein transkriptionell aktiv sein kann. Lef1 unterscheidet sich von den Tcf-Transkriptionsfaktoren durch eine kontextabhängige transkriptionsaktivierende Domäne, welche die Präsenz vom Protein ALY benötigt (*Carlsson et al., 1993; Bruhn et al., 1997*). ALY ist ein ubiquitär exprimiertes Kernprotein, das an die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von Lef1 binden kann und die Assoziation von Lef1 mit der DNA steigert.

## 1.2.2 Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges

Für den Wnt-Signaltransduktionsweg wurden zahlreiche beta-Catenin/Tcf-abhängig regulierte Zielgene nachgewiesen. Den entsprechenden Proteinen konnte häufig ein onkogenes Potential nachgewiesen werden (**Tabelle 1.2**).

**Tabelle 1.2: Beeinflussung der Expressionsmenge von Onkogenen durch den Wnt-Signaltransduktionsweg**

Protein	Funktion	Literatur
Myc	Proliferation	(He et al., 1998)
CD44	Metastasierung	(Wielenga et al., 1999)
Claudin-1	Zelladhäsion	(Miwa et al., 2001)
ENC1	Dedifferenzierung	(Fujita et al., 2001)
CyclinD	Proliferation	(Tetsu et al., 1999; Shutman et al., 1999)
PPAR $\delta$	Proliferation	(He et al., 1999)
MRD1	Überleben der Zellen	(Yamada et al., 2000)
Matrilysin	Proteolyse	(Crawford et al., 1999)
MMP7	Zelladhäsion	(Brabletz et al., 1999)
Laminin-5 $\gamma$ 2Kette	Abwanderung der Zelle	(Hirohashi et al., 1998)
bFGF	Angiogenese	A. Jung nicht publiziert
VEGF	Angiogenese	(Zhang et al., 2001)
Jun	Proliferation	(Mann et al., 1999)
Id2	Inhibitor der Differenzierung	(Rockmann et al., 2001)

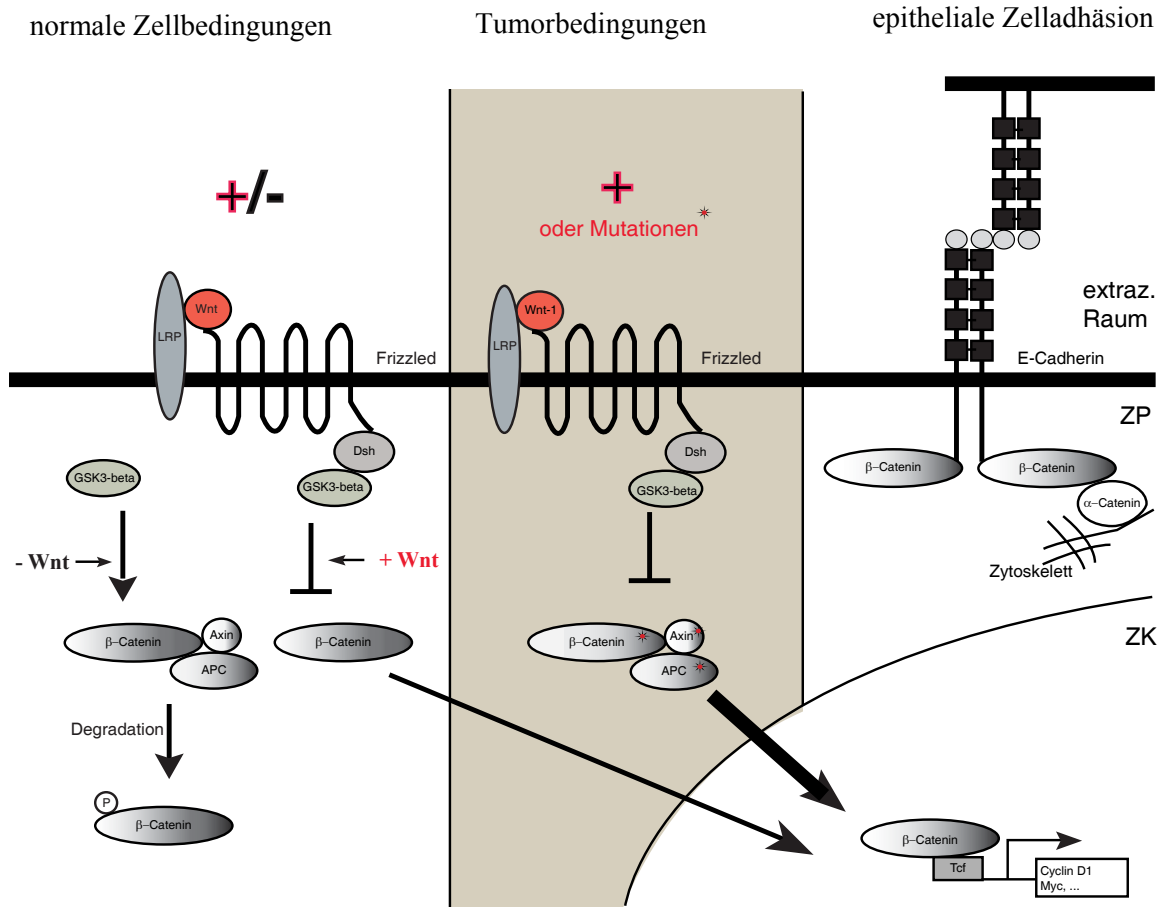
(Giles et al., 2003; Brabletz et al., 2002). Eine umfangreiche Auflistung von Zielgenen des Wnt-Signaltransduktionsweges ist auf der "Homepage" von Nusse R. zu finden ([www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html](http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html)).

Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges greifen ebenfalls in embryonale Prozesse ein. Sie können die Regeneration von intestinalen Stammzellen beeinflussen. Tcf4 beeinflusst die epitheliale Stammzellentwicklung (Korinek et al., 1998). Studien mit hämatopoetischen Stammzellen haben gezeigt, daß eine Aktivierung des Wnt-Signalweges zu einer Expansion des Pools an hämatopoetischen Stammzellen, eine Hemmung zur Reduktion des Wachstums von hämatopoetischen Stammzellen führt (Reya et al., 2003).



### 1.2.3 Embryogenese und Tumorprogression

Der Wnt-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle während der Embryo- und Tumorge-  
nese. Als Interaktionspartner von E-Cadherin reguliert beta-Catenin mit seiner Stabilität die  
epitheliale Zelladhäsion und -polarität (**Abb. 1.4**).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Wnt-Signaltransduktionsweges.** Die zentrale Rolle von beta-Catenin während normaler Zellbedingungen, unter Tumorbedingungen und in der Vermittlung der epithelialen Zelladhäsion. Abkürzungen: extraz. Raum: extrazellulärer Raum, ZP: Zytoplasma, ZK: Zellkern

Die Störung der E-Cadherin/beta-Catenin/alpha-Catenin-Komplexbildung führt zur Aufhebung des epithelialen Phänotyps. Während der Embryogenese steuert die Expression von E-Cadherin den epithelial-mesenchymalen Übergang bzw. den mesenchymal-epithelialen Übergang (*Thiery*

*et al., 2002*). Diese Vorgänge sind entscheidend für die Ausbildung des dritten Keimblatts, dem Mesoderm, und die Organisation von Geweben während der Embryogenese. Der epithelial-mesenchymale Übergang ist eine notwendige Voraussetzung für die Invasion eines Tumors. Der mesenchymal-epitheliale Übergang tritt während der Makrometastasenbildung auf (*Brabletz et al., 2001; Brabletz et al., 2002*).

Beta-Catenin reguliert als Interaktionspartner der Tcf/Lef-Proteine die Transkription der Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges. Es ist nachgewiesen worden, daß eine verstärkte beta-Catenin/Tcf4-abhängige Transkription zur Tumorprogression führen kann. Ursache sind häufig Mutationen in einem der in den Wnt-Signaltransduktionsweg involvierten Proteine wie beta-Catenin, APC, GSK3-beta und Axin. In mehr als 90% der Fälle kolorektaler Tumore sind Mutationen in APC und beta-Catenin detektiert worden, die häufig zu einer erhöhten Stabilität von beta-Catenin und somit zu einer höheren Menge an beta-Catenin/Tcf4 im Zellkern führen. Eine ausführlich beschriebene Tumorerkrankung, die durch nukleäres beta-Catenin induziert wird, ist die familiäre adenomatöse Polyposis (familial adenomatous polyposis, FAP), benannt nach dem in diesem Krankheitsbild am häufigsten mutierten Protein APC. Mutationen in APC führen zu einer Hemmung des Abbaus von beta-Catenin. Wie dies exakt funktioniert, konnte bisher nicht geklärt werden. Häufig werden in solchen Tumoren auch Deletionen im Bereich des N-Terminus (Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen) von beta-Catenin detektiert, die zu einem stabileren beta-Catenin führen.

Eine Aktivierung der beta-Catenin/Tcf4-abhängigen Transkription kann ebenfalls durch die verstärkte Expression des Protoonkoproteins Wnt-1 hervorgerufen werden. Wnt-1 stimuliert den Wnt-Signaltransduktionsweg. Dies führt zur Hemmung der GSK3-beta-Kinase, was eine reduzierte Serin/Threonin-Phosphorylierung von beta-Catenin zur Folge hat. Die Stabilisierung und Akkumulation von beta-Catenin im Zellkern führt zur Aktivierung der Tcf4-abhängigen Transkription.

BCL9 (B-cell lymphoma 9 protein) ist ein Beispiel eines Aktivators, der als Bindungspartner von beta-Catenin die Transkription reguliert. Es ist involviert in die Entstehung von "Non-Hodgkin Lymphoma" (*Sarris et al., 1999*) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) (*Willis et al., 1998*). Für die maligne B-Zell-Linie CEMO-1 wurde eine Chromosomentranslokation von BCL9 nachgewiesen, die zu einer verstärkten Expression desselben führt.

Wie bereits erwähnt, verfügen viele Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges über ein onkogenes Potential (**Tabelle 1.2**). Einige dieser Zielgene unterstützen durch Beeinflussung des Wnt-Signaltransduktionsweges die Tumorprogression (*Ougolkov et al., 2002; Crawford et al., 1999*). Metalloproteinasen, wie Matrilysin und Stromelysin-1, deren Transkription beta-Catenin/Tcf4-abhängig reguliert wird, sind in der Lage die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin abzuspalten (*Noe et al., 2001*). Dies führt zur Aufhebung der epithelialen Zelladhäsion der betroffenen Zellen. Das abgespaltene, lösliche 80 kDa E-Cadherin-Fragment führt zu einer allgemeinen Hemmung der epithelialen Zelladhäsion.

Mutationen in Proteinen wie beta-Catenin und/oder APC werden häufig als primärer Stimulus für die Tumorprogression beschrieben. Dies ist eindeutig belegt für den Fall einer hohen beta-Catenin Menge im Zellkern. Brabletz T. et al. untersuchten differenzierte und dedifferenzierte primäre Tumorzellen und Metastasen von kolorektalen Adenokarzinomen, die mutiertes APC exprimieren, hinsichtlich der Lokalisation von beta-Catenin und E-Cadherin (*Brabletz et al., 2002*). In dedifferenzierten Tumorarealen wirkt beta-Catenin durch seine Lokalisation im Zellkern maßgeblich als Onkoprotein. Für gut differenzierte Tumorareale konnte häufig keine Kernlokalisation nachgewiesen werden, wohl aber membrangebundenes beta-Catenin, was zur Aufrechterhaltung des in diesem Tumorstadium beschriebenen epithelialen Phänotyps beiträgt. Da differenzierte wie dedifferenzierte Tumorzellen das mutierte APC-Protein exprimieren, muß es einen bisher unbekanntem Stimulus geben, der zur Kernlokalisation von beta-Catenin führt. Diese Beobachtungen machen deutlich, daß die Tumorprogression nicht nur eine Anhäufung genetischer Veränderungen autonomer Tumorzellen ist, sondern ein komplex regulierter Vorgang. Dieser kann durch morphogenetische Veränderungen beeinflusst werden, die durch das Differenzierungsstadium des Tumors bestimmt werden.

#### 1.2.4 Regulatoren der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Transkription

Das Verständnis der Tumorprogression konnte dank der Charakterisierung von Modulatoren des Wnt-Signaltransduktionsweges verbessert werden. Häufig führen Veränderungen von in den Wnt-Signaltransduktionsweg involvierten Proteinen zu einer gesteigerten Tcf-abhängigen Genexpression. Dies geschieht vor allem durch [1.] Mutationen in Proteinen, die z.B. den proteolytischen Abbau von beta-Catenin regulieren (z.B. APC, GSK3-beta, Axin) oder die im Transkriptionskomplex durch Bindung weiterer Proteine in ihrer Fähigkeit der Modulation der Tcf-abhängigen Transkription beeinflusst werden (z.B. Expression von Tcf4-Mutanten, die unfähig sind, CtBP noch zu binden) und [2.] verstärkte Expression von Aktivatoren des Wnt-Signaltransduktionsweges (Wnt-1, BCL9) nach Chromosomentranslokation.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Interaktionspartner von beta-Catenin und der Tcf-Proteine beschrieben, die die beta-Catenin/Tcf-abhängige Transkription modulieren. Brg1 (brahma-related gene 1), CBP (CREB-binding protein), HBP1 (HMG-Box repressor), BCL9 (involving in B-cell non-Hodgkin's lymphomas), Pygo (pygopus), TLE (transducin-like enhancer), CtBP (C-terminal binding protein) modulieren als Interaktionspartner von beta-Catenin oder der Tcf-Proteine die beta-Catenin/Tcf-abhängige Transkription. **Brg1**, ein Interaktionspartner von beta-Catenin, wird durch beta-Catenin in die Region des Tcf-abhängigen Promotors rekrutiert und fördert die Transkriptionsaktivierung durch Auflockerung des Chromatins (*Barker et al., 2001*). Die Azetyltransferase **CBP**, ebenfalls ein Bindungspartner von beta-Catenin, azetyliert beta-Catenin am Lysin 49. Dies führt zu einer verstärkten c-Myc Expression (*Wolf D., 2002*). Die

Beeinflussung der Transkription anderer Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges durch CBP konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Beta-Catenin rekrutiert als Interaktionspartner von **BCL9** **PYGO** in den Tcf-Transkriptionskomplex. BCL9 und PYGO sind Aktivatoren der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Transkription.

HBP1, TLE, CtBP modulieren als Interaktionspartner der Tcf-Proteine die beta-Catenin/Tcf-abhängige Transkription. **HBP1** wurde identifiziert als HMG (high mobility group)-Box-Repressor, der den Zellzyklus inhibieren kann (*Sampson et al., 2001*). **TLE** interagiert mit den Tcf/Lef1-Transkriptionsfaktoren. TLE gehört zur Familie der transkriptionellen Repressoren Groucho, die durch Rekrutierung der Histon Azetylase eine Hemmung der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Transkription unterstützen. Die Histon Azetylase unterstützt die lokale Kondensation von Chromatin (*Chen et al., 2000*). Humanes Tcf4 weist am C-Terminus zwei Bindemotive für den Repressor **CtBP** auf (*Roose und Clevers, 1999; Chinnadurai et al., 2002*). Tcf4 fungiert im Komplex mit CtBP als transkriptioneller Repressor der Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges. In Tumoren konnte eine Tcf4-Isoform detektiert werden, die einen verkürzten C-Terminus aufweist und somit keine Bindung mehr mit dem Repressor CtBP eingehen kann, was eine verstärkte Tcf4-abhängige Genexpression zur Folge hat (*Duval et al., 1999; Saeki et al., 2001*).

### 1.2.5 Tcf1: Repressor der beta-Catenin/Tcf4-abhängigen Transkription

Tcf1 gehört zur Klasse der Tcf-Transkriptionsfaktoren, die aus vier Mitgliedern bestehen: Tcf1, Tcf3, Tcf4 und Lef1. Tcf4 und Tcf1 sind bisher am ausführlichsten charakterisiert worden. Tcf1 wird in T-Zellen exprimiert und wurde bisher vor allem im Zusammenhang mit der T-Zell Entwicklung untersucht (*Castrop et al., 1995; Wetering et al., 1996*). Alle Tcf-Transkriptionsfaktoren können bei fehlendem Wnt-Stimulus auch als transkriptionelle Repressoren fungieren. Dieser Vorgang wird u.a. durch die Bindung mit Korepressoren, wie CtBP erklärt (*Brannon et al., 1999*).

Für Tcf1 wurden fünf Gruppen von Isoformen identifiziert: A, B, C, D und E. Für diese Isoformen sind jeweils mehrere Spleißvarianten bekannt, die alle über keine beta-Catenin Bindungsdomäne mehr verfügen. Jurkat T-Zellen z.B. exprimieren Tcf1B und drei Tcf1B-Spleißvarianten. Alle Spleißvarianten werden ähnlich stark im Vergleich zu Tcf1B Wildtyp exprimiert. Das Fehlen der beta-Catenin Bindungsdomäne, die vorhandene DNA-Bindungsdomäne der Spleißvarianten, kann die für Tcf1 beschriebene transkriptionelle Repressorfunktion z.T. erklären. Bisher gibt es jedoch noch keine überzeugende Erklärung wie bzw. ob Tcf1 Wildtyp eine solche Rolle erfüllt. Tcf1 kodiert über alle Domänen um als aktiver Transkriptionsfaktor die beta-Catenin abhängige Transkription zu aktivieren. Es sind für Tcf1 wie für Tcf4 häufig identische Bindepartner beschrieben, die die beta-Catenin/Tcf-abhängige Transkription beeinflussen. Bisher konnte

jedoch kein Bindepartner überzeugend nur für Tcf1 beschrieben werden, der die beta-Catenin/Tcf1-abhängige Transkription inhibieren kann.

Die Expression von Tcf1 wird durch den beta-Catenin/Tcf4-Komplex reguliert. Roose J. et al. zeigten diesen Zusammenhang zwischen beta-Catenin/Tcf4 regulierter Transkription und Tcf1-Expression (Roose et al., 1999). Ein durch die Expression induzierter Abbau von beta-Catenin, führt zu einem geringeren Tcf1 Expressionslevel.

Tcf1-defiziente Mäuse entwickeln eine Blockade in der frühen Thymozytenentwicklung und sterben früh (Verbeek et al., 1995). Nach Autopsie dieser Mäuse stellte man neoplastische Veränderungen im Bereich der Brustdrüsen und des Darms fest. Es wurde gezeigt, daß der beta-Catenin/Tcf4-Komplex die Expression von Tcf1 reguliert. Mit Zunahme der beta-Catenin/Tcf4-Menge, nimmt die Expression von Tcf1 zu. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß Tcf1 als "Feedback"-Repressor der beta-Catenin/Tcf4-abhängigen Transkription fungieren kann.

### 1.2.6 Modellorganismen für den Wnt-Signaltransduktionsweg

Umfangreiche Studien zum Wnt-Signaltransduktionsweg sind für *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* und in Säugerzellen durchgeführt worden (Cadigan und Nusse, 1997). Der Wnt-Signaltransduktionsweg weist in diesen verschiedenen Organismen zahlreiche Homologien auf (Hecht et al., 2000). In den letzten Jahren wurden Untersuchungen zur Regulation der Segmentpolarität von *Drosophila*-Embryonen, des Phänotyps von *Xenopus*-Embryonen und von Zielgenen in Säugerzellen als wichtige Modellsysteme etabliert, um Proteine des Wnt-Signaltransduktionsweges zu charakterisieren.

Die lineare Kaskade des Wnt-Signaltransduktionsweges wurde erstmals während genetischer Studien zur Wnt-kontrollierten Segmentpolarität in *Drosophila melanogaster* beschrieben (Orsulic und Peifer, 1996). Für *Drosophila melanogaster* sind seit dieser Zeit für viele Proteine des Wnt-Signaltransduktionsweges "loss-of-function" bzw. "gene-of-function" Mutanten hergestellt und deren Einfluß auf die Segmentpolarität untersucht worden (Pai et al., 1997).

Bereits 1991 konnte der Einfluß von Wnt-Stimulatoren auf die Formation der Körperachse von *Xenopus*-Embryonen gezeigt werden (Smith et al., 1991; Sokol et al., 1991). *Xenopus*-Oozyten wurde im 8 bis 16 Zell-Blastomerstadium die mRNA von Wnt-1 oder Xwnt-8 injiziert. Die Folge davon war eine komplette Verdopplung der Körperachse. Diese Embryonen sind nach ihrem Phänotyp auch Doppelkopfmutanten genannt worden. Spätere Experimente mit mRNA von beta-Catenin zeigten das gleiche Resultat.

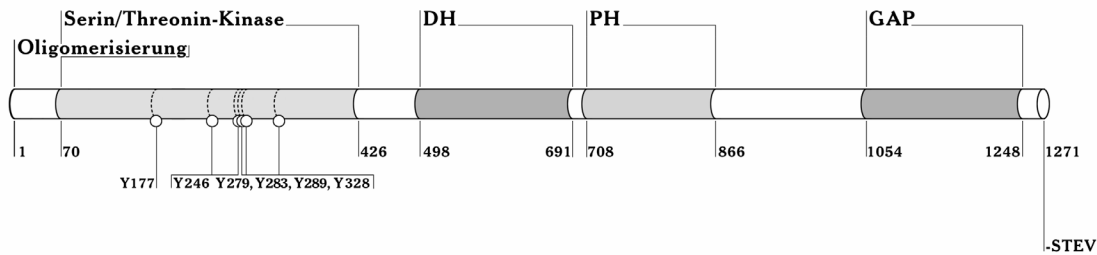
In Säugerzellen konnten zahlreiche Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges identifiziert werden, von denen viele ein onkogenes Potential aufweisen (Brabletz et al., 2002; Giles et al., 2003). Mittels etablierter Tumorzelllinien, die einen induzierten Wnt-Signaltransduktionsweg aufweisen, können Inhibitoren einfach charakterisiert werden.

## 1.3 Bcr: negativer Regulator der pathogenen Effekte von Bcr-Abl

### 1.3.1 Bcr

Bcr ist ein multifunktionelles Protein und weist eine N-terminale Oligomerisierungsdomäne, eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne, eine DH (dbl homology domain)-Domäne, eine PH (pleckstrin homology region)-Domäne und eine GAP (GTPase activation protein function)-Domäne auf (Abb. 1.5).

#### Bcr (breakpoint cluster region)



DH: dbl-homology  
 PH: pleckstrin-homology  
 GAP: guanosine triphosphatase activating protein

**Abb. 1.5: Proteindomänenstruktur von Bcr.** Oberhalb der schematischen Darstellung sind die verschiedenen Proteindomänen von Bcr beschrieben. Phosphorylierungen der N-terminal markierten Tyrosine (Y246 bis Y328) nehmen Einfluß auf die Serin/Threonin-Kinaseaktivität von Bcr. Die Phosphorylierung von Y177 ist die Voraussetzung für die Bindung mit Grb2, welches auf Ras-Effektoren Einfluß nimmt. Die C-terminale Sequenz (-STEV) ist Zielsequenz für PDZ-Domänen. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

Die **Oligomerisierungsdomäne** wurde u.a. im Zusammenhang mit dem Fusionsprotein Bcr-Abl untersucht. Bcr und Bcr-Abl können aufgrund dieser Domäne Dimere, Trimere und Tetramere bilden (McWhirter *et al.*, 1993). Die **Serin/Threonin-Kinase** ist nur in ruhenden Zellen konstitutiv aktiv. Phosphorylierungen des Ras-bindenden Proteins AF-6 durch Bcr führen zur negativen Regulation des Ras/Raf-Signalweges (Radziwill *et al.*, 2003). Die **DH-Domäne** fungiert als GTP/GDP-Nukleotid austauschfaktor für Rac, Rho, CDC 42. Eine Aktivität konnte allerdings nur

für die isolierte DH-Domäne nachgewiesen werden. Die **GAP-Domäne** erhöht die GTPase Aktivität von Rac und CDC 42, und inhibiert dadurch die Stimulation von Effektorproteinen. Die **PH-Domäne** interagiert mit membranständigen Phosphoinositiden und kann mittels solcher Interaktionen Proteine zur Zellmembran rekrutieren (*Lemmon et al., 2003*). Der extreme C-Terminus von Bcr (-STEV) bildet eine Zielsequenz für PDZ-Domänen, z.B. für Erbin, wie in dieser Arbeit noch gezeigt werden wird.

Die Tyrosinreste Tyr-177 und Tyr-283, Tyr-328 und Tyr-360 im N-terminalen Bereich von Bcr können durch die aktivierte c-Abl Tyrosin-Kinase oder das Bcr-Abl-Fusionsprotein phosphoryliert werden (*Puil et al., 1994; Liu et al., 1996; Wu et al., 1998*). Werden Bcr und Bcr-Abl koexprimiert, sind auf Bcr identische Tyrosin-Phosphorylierungen nachzuweisen (*Sun et al., 2001; Liu et al., 1996; Wu et al., 1998*). Tyrosin-Phosphorylierungen in den Positionen 283, 328 und 360 reduzieren die Aktivität der Serin/Threonin-Kinase.

Die Tyrosin-Phosphorylierung der Aminosäure in der Position 177 ist eine Voraussetzung für die Bindung von Grb2. Grb2 steuert über den Nukleotidaustauschfaktor SOS die Regulation der GTPase Ras. Bcr-Abl Y177F-Mutanten binden kein Grb2 und führen zu keiner Aktivierung von Ras in Rat-1/myc-Zellen. Effektoren von aktivem Ras werden in diesen Zellen gehemmt (*Pendergast et al., 1993*). Die Transformation von Knochenmarkzellen durch Bcr-Abl geschieht unabhängig von einer Phosphorylierung des Tyrosinrestes 177 (*Goga et al., 1995*). Die Src-ähnliche Tyrosinkinase c-Fes phosphoryliert Bcr an Tyr-177, Tyr-246 und an den drei eng aneinanderliegenden Tyrosinresten Tyr-279, Tyr-283 und Tyr-289. Diese Tyrosin-Phosphorylierungen inhibieren die Serin/Threonin-Kinaseaktivität von Bcr und sind Voraussetzung für die Interaktion von Bcr mit Grb2 und 14-3-3 (*Li und Smithgall, 1996*).

Ser-345 von Bcr spielt eine wichtige Rolle für die Hemmung der Abl-Tyrosin-Kinase im Bcr-Abl-Fusionsprotein. Die Phosphorylierung von Ser-345 führt zu einer Veränderung der Sekundärstruktur von Bcr, die eine interne Bindung zur SH2-Domäne von Abl ermöglicht und die Tyrosin-Kinase von Abl hemmt (*Hawk et al., 2002*).

Bcr<sup>-/-</sup> Mäuse sind lebensfähig (*Voncken et al., 1995*). Es konnte gezeigt werden, daß Bcr über Rac2 Einfluß auf die Regulation des NADPH-Oxidasesystems in Neutrophilen nimmt. Durch fehlende negative Regulation dieses Systems und einer daraus resultierenden Überproduktion von Sauerstoffradikalen kommt es bei der ersten Immunantwort durch Neutrophile zu starken Verletzungen des umliegenden Gewebes.

Bisher wurde noch kein Nachweis durch "knock-out" erbracht, daß Bcr eine Tumorsupressorfunktion erfüllt.

Das Bcr<sup>160kDa</sup>-Protein (**Abb. 1.5**) wird ubiquitär exprimiert. In hämatopoetischen Zellen konnten weitere Bcr-Proteine nachgewiesen werden. In der hämatopoetischen Zelllinie SMS-SB (B-lymphoide Zelllinie) wurden die Bcr-Proteine 190 kDa, 160 kDa, 135 kDa, 125 kDa, 108 kDa, 83 kDa mit einem C-terminalen Antikörper detektiert (*Li et al., 1989*), jedoch ist die Bedeutung dieser Proteine noch unklar.

**Tabelle 1.3: Bcr - Gene, - RNA-Transkripte, - Proteine**

Gen	RNA-Transkript	Protein
<i>bcr 1</i> (komplett)	7,0 kb	185/190 kDa
<i>bcr</i> (funktionelle Form?)	4,5 kb	160 kDa
<i>bcr 2</i>	4,0 kb	125/135 kDa
<i>bcr 3</i>	1,0 kb	108 kDa
<i>bcr 4</i>	---	83 kDa

(Campbell et al., 1991)

Es konnten vier RNA-Transkripte identifiziert werden, die für vier Bcr-Proteine kodieren (**Tabelle 1.3**). Für das 83 kDa Bcr-Protein konnte bisher kein RNA-Transkript nachgewiesen werden. Alle Transkripte haben ihren Ursprung auf dem Chromosom 22.

### 1.3.2 Das Philadelphia-Chromosom

Das Philadelphia-Chromosom ist die Ursache für die Expression des Fusionsproteins Bcr-Abl. Über 90% aller Patienten, die an chronischer myeloischer Leukämie erkranken, exprimieren das Fusionsprotein Bcr-Abl. Das Bcr-Abl Fusionsprotein entsteht durch reziproke Translokation zwischen Chromosom 22 und Chromosom 9. Es entsteht ein verkürztes Chromosom 22 (22q-), das Philadelphia-Chromosom (Ph<sup>1</sup>), und ein verlängertes Chromosom 9 (9q+). Die Bruchpunkte dieser Translokation liegen auf dem Chromosom 22 im *bcr*-Gen und auf dem Chromosom 9 im *abl*-Gen. Die Lage der Bruchpunkte im *bcr*-Gen ist unterschiedlich. Für beide Gene *bcr-abl* (auf 22q-) und *abl-bcr* (auf 9q+) konnte die mRNA isoliert werden, die Proteinexpression konnte aber nur für das *bcr-abl*-Gen nachgewiesen werden (Kurzrock et al., 1987).

Die Expression von Bcr-Abl wird als Ursache für die klonale Expansion einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle angesehen. Die Expression unterschiedlicher Bcr-Abl-Fusionsproteine wurde für verschiedene Formen von Leukämien (chronische myeloische Leukämie, CML; akute lymphatische Leukämie, ALL) nachgewiesen, die alle einen charakteristischen Krankheitsverlauf aufweisen. Die exprimierten Bcr-Abl Fusionsproteine unterscheiden sich nur im Fusionsanteil von Bcr. Bei CML liegen die Bruchpunkte in Exon 10 bis 12 des *bcr*-Gens (Bcr-Abl<sup>230kDa</sup>, Bcr-Abl<sup>210kDa</sup>). Bei ALL sind Exon 1 und 2 betroffen (Bcr-Abl<sup>185/190kDa</sup>). Durch Fusion der Genfragmente entstehen Proteine mit einem Molekulargewicht von 185/190 kDa, 210 kDa und 230 kDa. Der Anteil vom *bcr*-Gen ist auf einen kurzen Bereich beschränkt. Dies hat zur Bezeichnung "breakpoint cluster region" (*bcr*) geführt. Patienten mit CML exprimieren meist das



Fusionsprotein Bcr-Abl<sup>210kDa</sup>. Das Fusionsprotein Bcr-Abl<sup>210kDa</sup> aktiviert verschiedene Signalwege, wie den Ras/MAPK-, den PI-3 Kinase-, den c-CBL- und CRKL-, JAK-STAT- und Src-Signalweg. Die wichtige Rolle von Ras, der Jun-Kinase und der PI-3 Kinase für die Transformation und Proliferation von Zellen konnte belegt werden (*Raitano et al., 1995*). Der Einfluß von Bcr-Abl<sup>210kDa</sup> auf CRKL und c-CBL, Proteinen, die die Organisation des Zytoskellets und der Zellmembran beeinflussen, führt zu Defekten, wie sie für CML-Zellen charakteristisch sind (*Salgia et al., 1997; Sattler und Salgia, 1998*).

In den Ph<sup>1</sup>-positiven leukämischen Zelllinien K562, BV173 wurde vor allem Bcr-Abl<sup>210kDa</sup> und Bcr<sup>130kDa</sup> detektiert. Die Expression von Bcr<sup>160kDa</sup> ist in diesen Zelllinien auf ca. 10% reduziert. Eine geringere Expression von Bcr<sup>160kDa</sup> ist naheliegend, aufgrund des Vorhandenseins von nur noch einem Wildtyp Bcr exprimierenden Chromosoms 22. Für die kleinere Bcr<sup>130kDa</sup>-Variante wurde auf RNA-"Ebene" eine Deletion im zentralen Bereich von Bcr nachgewiesen (*Lifshitz et al., 1988*). Der N-terminale Bereich wurde bisher nicht exakt charakterisiert. Nach Resultaten von Campbell M. L. fehlt allen kleineren Bcr<sup>160kDa</sup>-Proteinen der N-Terminus bzw. ist dieser modifiziert.

### 1.3.3 Einfluß von Bcr auf den Bcr-Abl-Phänotyp

Seit einigen Jahren wird der Einfluß von Bcr auf den Bcr-Abl-Phänotyp untersucht. Bcr konnte als negativer Regulator charakterisiert werden. Die konstitutiv aktive Tyrosin-Kinase von Abl im Bcr-Abl-Fusionsprotein, wird als primärer Stimulus für die Tumorprogression beschrieben. Die Tyrosin-Kinaseaktivität von Abl ist im Fusionsprotein Bcr-Abl, aufgrund des Verlustes der N-terminalen "Cap"-Region (1-45 AS) von c-Abl, aktiviert. Die interne Bindung des N-Terminus mit der SH2-Domäne inhibiert die c-Abl Tyrosin-Kinase (*Pluk et al., 2002*). Die Fusion des N-terminal verkürzten c-Abl Proteins mit dem N-Terminus von Bcr, führt zu einer aktiven Abl-Tyrosin-Kinase. Dem Fusionsprotein Bcr-Abl<sup>210kDa</sup> fehlen die GAP-Domäne und das PDZ-Bindemotiv des Bcr Proteins, zwei Regionen, die bisher als negative Regulatoren für Signalwege beschrieben sind. Dem Fusionsprotein Bcr-Abl<sup>185/190kDa</sup> fehlen außerdem die DH- und die PH-Domäne.

Die Expression von exogenem Bcr inhibiert die Fokusformation von Bcr-Abl transformierten Rat-1 Zellen in Softagar (*Wu et al., 1999*).

Durch die Überexpression von Bcr in K562-Zellen (Ph<sup>1</sup>-positive Zellen) wird die Zelldifferenzierung gehemmt.

Im Tierversuch wurde mit NOD/scid (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient) Mäusen das leukämische Potential von K562-Klonen getestet, die eine geringe Expressionsmenge an Bcr aufweisen (*Lin et al., 2001*). Nach der Injektion solcher Klone starben nach 35 Tagen alle Mäuse. In einem Parallelversuch überlebten nach Induktion der exogenen Bcr-Expression 80%

---

der Mäuse diese Zeitspanne. Viele Mäuse blieben gesund. In nachfolgenden Versuchen konnte eine dosisabhängige Reduktion der pathogenen Effekte nachgewiesen werden (*Arlinghaus et al., 2002*).

Die meisten Patienten, die an CML erkranken, verfügen nur noch über ein normales Chromosom 22, welches in der Lage ist Bcr<sup>160kDa</sup> zu exprimieren. Der daraus reduzierte Expressionslevel von Bcr schwankt von Patient zu Patient. Je geringer der Expressionslevel von Bcr ist, desto aggressiver ist der Krankheitsverlauf (*Wu et al., 1999; Lin et al., 2001*).