

4 ERGEBNISSE

4.1 Identifikation von PDZ-abhängigen Proteininteraktionen

4.1.1 Durchführung von Hefe Zwei-Hybrid Versuchen

PDZ-Proteine spielen eine wichtige Rolle als Regulatoren von Protein-Proteininteraktionen. Mit dem Ziel, bisher nicht beschriebene PDZ-abhängige Proteininteraktionspartner zu identifizieren, wurden mit geeigneten C-Termini von Proteinen Hefe Zwei-Hybrid Versuche durchgeführt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Heferversuche, so wie für die nachfolgenden direkten Interaktionstests, wurden Konstrukte hergestellt, die für die C-terminal endständigen 8 bzw. 10 Aminosäuren möglicher PDZ-Liganden kodieren (**Tabelle 4.1**).

Tabelle 4.1: Verwendete Protein C-Termini in Hefe Zwei-Hybrid Versuchen

EphrinB1-3CT*	---PANIYYKV
ErbB2CT	---YLGLDVPV
ErbB4CT	---YRHRNTVV
Kv4.2	-GGNIVRVVSAL
Kv4.3	-GGNVVKVSAL

*die aufgelisteten C-terminal endständigen acht Aminosäuren sind für die B-Ephrine 1 bis 3 identisch

Die Protein C-Termini wurden in Hefen mit der verwendeten cDNA-Bibliothek koexprimiert. Für die C-Termini von ErbB4, Kv4.2 und Kv4.3 konnten keine Interaktionspartner identifiziert werden. Mit den C-Termini von ErbB2 und EphrinB1-3 wurden bis dahin unbekannte Proteininteraktionspartner gefunden. Diese Heferversuche werden nachfolgend erläutert.

Heferversuche mit dem Protein C-Terminus von EphrinB1-3

In Hefe Zwei-Hybrid Versuchen mit dem C-Terminus von EphrinB1-3 und einer T-Zell-Bibliothek wurden 110 positive Klone nach Durchführung von beta-Galaktosidasetests identifiziert. Von diesen positiven Klonen wurden jeweils die Plasmide mit der identifizierten cDNA isoliert. Diese Plasmide weisen flankierend zur cDNA des identifizierten interagierenden Proteins bzw. Proteinfragments BglII Schnittstellen auf. Nach einem BglII Restriktionsverdau ist somit die Insertgröße der cDNA leicht feststellbar. Nach dem Verdau mit BglII zeigten sich vor

allem DNA-Fragmente mit einer Größe von 1 kb. Die Sequenzierung ergab, daß die cDNA für die Aminosäuren 88-377 des Proteins Jab1 (jun activating domain binding protein) kodiert. Jab1 weist eine MPN-Domäne auf, kodiert aber für keine PDZ-Domäne. Daher besteht die Möglichkeit, daß die Jab1/MPN-Domäne an Liganden für PDZ-Domänen bindet (Kapitel 4.1.3).

Heferversuche mit dem Protein C-Terminus von ErbB2

In Hefe Zwei-Hybrid Versuchen mit dem C-Terminus von ErbB2 und einer B-Zell-Bibliothek wurden 90 positive Klone nach Durchführung von beta-Galaktosidasetests identifiziert. Von diesen positiven Klonen wurden jeweils die pcDNA-Plasmide isoliert. Nach einem BglII Restriktionsverdau wurden Insertgrößen zwischen 0,3 und 3 kb festgestellt. Mehrere Klone zeigten eine Insertgröße von ca. 2,5 kb. Dieser partiellen cDNA-Sequenz konnte ein Proteinfragment von 366 Aminosäuren Länge zugeordnet werden, das mit seinen C-terminal endständigen 90 Aminosäuren für eine PDZ-Domäne kodiert. Das vollständige Protein wurde wenige Monate später, von Borg J. P. erstmals als Erbin (ErbB2-interacting protein) beschrieben (*Borg J. P., 2000*). Erbin weist im N-terminalen Bereich 16 leuzinreiche "Repeats" auf (LRR) und C-terminal eine PDZ-Domäne. Aufgrund dieser Domänen wird Erbin auch der LAP (LRR and PDZ)-Proteinfamilie zugeteilt. Erbin reguliert wie andere LAP-Proteine die Polarität von epithelialen Zellen und beeinflusst als negativer Regulator den MAPK-Signaltransduktionsweg.

4.1.2 PDZ-abhängige Interaktionspartner von Erbin und Scribble

Mit dem Ziel, weitere PDZ-abhängige Proteininteraktionen für das in dieser Arbeit als Interaktionspartner von ErbB2 gefundene, später als Erbin beschrieben, Protein zu identifizieren, wurden gezielt zahlreiche Rezeptoren, zytoplasmatische Proteine und virale Proteine als potentielle Liganden für die PDZ-Domäne von Erbin getestet. Diese Tests wurden ebenfalls mit den vier PDZ-Domänen vom humanen LAP-Protein Scribble durchgeführt, welche zur PDZ-Domäne von Erbin eine Homologie zwischen 35 bis 40% aufweisen. In der **Abbildung 4.1** ist ein Sequenzvergleich zwischen der PDZ-Domäne von Erbin und der PDZ-Domäne 2 von Scribble gezeigt.

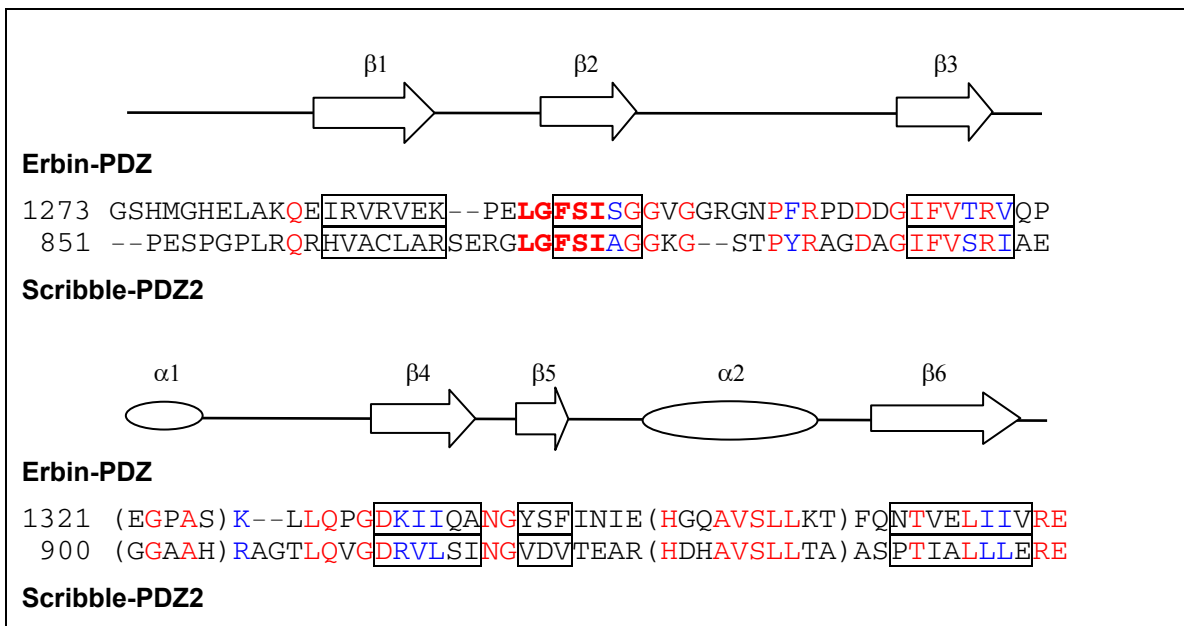


Abb. 4.1: Sequenzvergleich der PDZ-Domänen von Erbin und Scribble-PDZ2. Die beta-Faltblattstrukturen sind durch Pfeile gekennzeichnet, alpha-Helixe durch Ovale. Das fett gedruckte LGFSI-Motiv kodiert für den essentiellen Bereich des Bindungsloops. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen. Rot: entspricht identischen Aminosäuren, blau: entspricht ähnlichen Aminosäuren.

Zur Charakterisierung der Bindungsaffinität zwischen PDZ-Liganden und den entsprechenden PDZ-Domänen wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt (*Stricker N. L., 1997*). In der vorliegenden Arbeit wurden die Bindungseigenschaften zwischen verschiedenen Protein C-Termini und ähnlichen PDZ-Domänen verglichen (**Tabelle 4.2**). Die Auswahl der Proteine geschah aus unterschiedlichen Überlegungen heraus. Hauptgedanke war die Charakterisierung

der funktionell und strukturell verwandten PDZ-Proteine Erbin und Scribble in einem gemeinsamen Signalweg, als PDZ-abhängige Interaktionspartner eines gemeinsamen Rezeptors, mit verschiedenen im Zytoplasma lokalisierten PDZ-abhängigen Bindungspartnern.

Tabelle 4.2: PDZ-Interaktionstests in Hefen

pGBT-Konstrukte	pGAD-ErbinCT	pGAD-Scribble-PDZ
Rezeptoren/ membranständige Liganden		
ErbB2 _{YLGLDVPV}	(+) Screen	(-)
Kv4.3 _{GGNVVKVSAL}	(-)	(-)
Kv4.2 _{GGNIVRVSAI}	(-)	(-)
Ephrin B1,2,3 _{QSPANIYYKV}	(-)	(-)
EphB2 _{QARNMQSVEV}	(-)	(-)
Ryk _{EFHAALGAYV}	(+)	(-)
Let23 _{EEVSQKETCL}	(-)	(-)
zytoplasmatische Proteine		
BCR _{SILFSTEV}	(+)	(-)
APC _{HSGSYLVTSV}	(+)	(-)
c-Rel _{DSFPYEFFQV}	(+)	(+)
Bax _{VVYNAFSLRV}	(-)	(-)
Pmel _{NSPLLSGQQV}	(-)	(-)
BAI-1 _{QDIIDLQTEV}	(-)	(-)
MAGE-1 _{AALREEEEGV}	(-)	(-)
virale Proteine		
HTLV1-Tax _{SEKHFRETEV}	(+)	(+)
HPV16-E6 _{SSRTRRETQL}	nicht getestet	(+) nach Literaturangabe*
HPV18-E6 _{RLQRRRETQV}	(-)	(-)
HPV68,70-E6 _{RRRIRQETQV}	(-)	(-)

Proteine sind jeweils mit ihrem C-Terminus dargestellt; (+) positiv bzw. (-) negativ im Interaktionstest,

*(Nakagawa S., 2000)

Die getesteten Protein C-Termini wurden nach Sequenzhomologietests (Interaktionspartner von Erbin PDZ-ähnlichen PDZ-Domänen bzw. dem ErbB2 C-Terminus ähnliche Protein C-Termini) und einem möglichen PDZ-abhängigen biologischen Effekt ausgewählt.

Für Erbin und Scribble wurden der Transkriptionsfaktor c-Rel und das virale Protein HTLV1-Tax als gemeinsame PDZ-abhängige Proteininteraktionspartner identifiziert. Weiterhin konnten die Protein C-Termini des Tumorsuppressors APC (adenomatosis polyposis coli), dem Multidomänen-Protein Bcr und der Rezeptortyrosinkinase Ryk (related to receptor tyrosine kinase) als Interaktionspartner von ErbinCT identifiziert werden (**Tabelle 4.2**). Diese in den Hefen nachgewiesenen Interaktionen sind nachfolgend genauer erklärt hinsichtlich der Proteinauswahl.

4.1.2.1 HTLV1-Tax und APC: Interaktionspartner von ErbinCT

HTLV1-Tax (human T cell leukemia virus type 1 tax) wurde als Ligand der PDZ-Domäne von TIP1 (tax interacting protein) identifiziert (*Rousset R., 1998*). TIP1-PDZ und Erbin-PDZ weisen Sequenzhomologien auf, aufgrund derer der C-Terminus von HTLV1-Tax als Interaktionspartner von ErbinCT getestet wurde (**Abb. 4.2**). Die Interaktion zwischen HTLV1-Tax und der PDZ-Domäne von Erbin konnte im Hefesystem eindeutig nachgewiesen werden (**Tabelle 4.2**).

Erbin-PDZ 1215	SNGQM GGPL RPQAHYS QTH HP Q ASVARHPSREQLIDYLMKVAHQPPYTHPHCS PRQ
TIP-1-PDZ 1	MSYIP GGPV TAVV Q RV EH KL RQ -----
Erbin-PDZ 1274	HELAKQEIRVRVE KDPE LGFSI SGGVGG-- RG N PF RPD-- DDGI F V TRV Q PEG P ASKLA
TIP-1-PDZ 17	----- ENL I LGFSI GGGIDQDPS Q N PF SE D K T D KGI V TRV SEGG P AEIAG
Erbin-PDZ 1328	LQ PGDK I I QANGYS F IN I EHG Q AVS- LL KTFH N AVD L I I VRE V SS
TIP-1-PDZ 71	LQ IGDK I M QVNG W DM T M V THD Q ARK R L T KRSE V V R LL V TR Q SL Q

Abb. 4.2: Sequenzvergleich von Erbin-PDZ und TIP1-PDZ. Das fett gedruckte LGFSI-Motiv kodiert für den essentiellen Bereich des Bindungsloops. Rot: identische Aminosäuren, blau: ähnliche Aminosäuren. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

Virale Proteine können aktiv in zelluläre Prozesse eingreifen. HTLV1-Tax ist ein globaler Regulator der Transkription und des Zellzyklusses. HTLV1-Tax ist nicht nur ein Ligand für die PDZ-Domäne von TIP1, sondern auch für das PDZ-Protein hDlg (human disc large; *Suzuki T., 1999*), deren PDZ-Domänen ebenfalls Sequenzhomologien zur PDZ-Domäne von Erbin aufweisen.

HDlg interagiert mittels seiner PDZ-Domäne ebenfalls mit dem C-Terminus von APC (*Matsumine A., 1996*). HDlg und APC sind Tumorsuppressoren, die in einem gemeinsamen Komplex den Zellzyklus während des Übergangs von der G₀- oder G₁-Phase zur S-Phase hemmen können (*Ishidate I., 2000*). HTLV1-Tax hebt diesen Effekt durch die Interaktion mit hDlg wieder auf, in dem es APC von der PDZ-Domäne von hDlg verdrängt (*Suzuki T., 1999*). Die PDZ-Domänen von hDlg und Erbin weisen Sequenzhomologien auf, aufgrund dieser der C-Terminus von APC als Interaktionspartner von ErbinCT getestet wurde (**Abb. 4.3**). APC konnte im Hefesystem als Ligand von Erbin nachgewiesen werden (**Tabelle 4.2**).

Erbin-PDZ 1278	KQEIRVRVEKDP ELGFSI SGGVGGGRGNPFRRPDDG IFVTRV QPEGPASK-LL QPGDKII
hDlg-PDZ 315	KNHEIKLIKGP KLGFSI AGGVG---NQHIPGDNS IYVTKI IEGGA AHKDGLQIGDKLL
Erbin-PDZ 1341	QANGYSFIN IEHGQ AVSLL KTFHNAVDLI IIVREVSS
hDlg-PDZ 379	AVNSVCLEEV THEEAVTAL KNTSDFVYL KAAKPTSM

Abb. 4.3: Sequenzvergleich Erbin-PDZ und hDlg-PDZ2. Das fett gedruckte LGFSI-Motiv kodiert für den essentiellen Bereich des Bindungsloops. Rot: identische Aminosäuren, blau: ähnliche Aminosäuren. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

Patienten mit familiärer Adenomatosis Polyposis (FAP) weisen zu über 90% Mutationen in APC auf, die zu einem veränderten C-Terminus führen (*Powell S. M., 1992*). Bei einem Patienten mit FAP konnte eine extrem C-terminale Punktmutation identifiziert werden (*Pedemonte S., 1998*):

APC WT: ...SGTQSPKRHSGSYLVTSV
 APC8489del.A: ...SGTQ**VLSAILGLT**

Die veränderte C-terminale Sequenz von APC8489del.A weist keine bisher beschriebene Zielsequenz für PDZ-Domänen auf. Es ist anzunehmen, daß eine C-terminal abhängige Bindung mit PDZ-Domänen nicht mehr stattfindet bzw. die Affinität der Proteinbindung verändert ist. Mit APC ist ein Protein beschrieben, dessen C-Terminus als Zielsequenz für PDZ-Domänen im Krankheitsbild FAP verändert vorliegt und somit PDZ-vermittelte Proteininteraktionen diese Erkrankung beeinflussen könnten.

APC wurde ebenfalls als Interaktionspartner von PSD-95 (postsynaptic density protein 95) identifiziert (Yanai H., 2000). Die PDZ-Domäne 2 von PSD-95 weist Sequenzhomologien zu Erbin-PDZ auf (Abb. 4.4).

Erbin-PDZ	1246	REQLIDYLMMLKVAHQPPYTHPHCSPRQGHELAKQEIRVVRVEKDPE LGFSI SGGVGG
PSD-95-PDZ	168	VREVTHSAAVEALKEAGSIVRLYVMRRKPPAEKVMEIKLIKGP GLGFSI AGGVG-
Erbin-PDZ	1305	RGNPFR PDDGIFVTRV QPEGPASK--LL QPGDKI I Q ANGYSFIN IEHGQ AVSL LK
PSD-95-PDZ	224	-- NQHI PGDNSI YVTKI I EGGA AHKD GR L QIGDKI LAVNSV GLE DM HED AV AALK
Erbin-PDZ	1367	TF HNVDLI IVREVSS
PSD-95-PDZ	283	NT YDVY L KVAK PSNA

Abb. 4.4: Sequenzvergleich Erbin-PDZ und PSD-95-PDZ2. Das fett gedruckte LGFSI-Motiv kodiert für den essentiellen Bereich des Bindungsloops. Rot: identische Aminosäuren, blau: ähnliche Aminosäuren. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

Erbin konnte als Interaktionspartner von PSD-95, lokalisiert an der postsynaptischen Membran, nachgewiesen werden (Huang Y. Z., 2001). PSD-95 wird vielfach in seiner Funktion der Komplexierung von Rezeptoren wie NMDA (N-methyl-D-aspartate) beschrieben (O'Brien R. J., 1998).

4.1.2.2 ErbinCT: Interaktionspartner von c-Rel, Bcr und Ryk

Die Proteine Bcr und c-Rel wurden aufgrund eines zu erwartenden PDZ-abhängigen Effekts als Interaktionspartner für die PDZ-Proteine Erbin und Scribble ausgewählt. Für c-Rel wird die Deletion seines C-Terminus als mögliche Ursache von Tumorerkrankungen beschrieben. Bcr spielt als negativer Regulator der pathogenen Effekte des onkogenen Fusionsproteins Bcr-Abl eine wichtige Rolle. Zellen, die das Fusionsprotein Bcr-Abl exprimieren, zeigen für Bcr um ein Vielfaches schwächere Expression. Die Rezeptortyrosinkinase Ryk (related to receptor tyrosine kinase) wurde in Anlehnung an die Rezeptortyrosinkinase ErbB2 ausgewählt.

Bcr: negativer Regulator der pathogenen Effekte von Bcr-Abl

Bcr wurde von mir in den Hefen, wie auch nachfolgend beschrieben, in Säugerzellen als Ligand von PDZ-Domänen getestet und konnte in Hefe Zwei-Hybrid Versuchen als PDZ-abhängiger Interaktionspartner von Erbin identifiziert werden.

Erstmals wurde Bcr 1966 (Nowell und Hungerford, 1966) als N-terminaler Teil des Fusionsproteins Bcr-Abl identifiziert. Bcr wird als negativer Regulator der pathogenen Effekte von Bcr-Abl beschrieben. Mit dem Ziel eines besseren Verständnisses der Bcr-abhängigen Effekte im Bcr-Abl induzierten Krankheitsbild, suchte ich nach bisher unbekanntem Proteininteraktionspartnern von Bcr, um diese im biologischen Kontext im Vergleich von Bcr und Bcr-Abl zu

charakterisieren.

Protoonkogen c-Rel

C-Rel (human homologous to reticuloendotheliosis viral oncogene) konnte im Hefe Zwei-Hybrid System als PDZ-abhängiger Interaktionspartner von Erbin identifiziert werden. Rel bildet eine Klasse von Transkriptionsfaktoren (c-Rel, RelA, RelB), die im Komplex mit NF- κ B1/2 (nuclear factor kappa B1/2) Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflussen. In Anlehnung an virales Rel und sein hohes Potential zur Tumorprogression wurden viele Untersuchungen mit c-Rel durchgeführt, um eine eventuelle Beteiligung an der Tumorprogression abzuklären. Man stellte fest, daß überexprimiertes c-Rel unter der Kontrolle eines retroviralen Vektors ein hohes transformierendes Potential besitzt und daß die Deletion des C-Terminus diesen Effekt verstärkt (*Hrdlickova R., 1994*). Somit könnten PDZ-Proteine als C-terminale Interaktionspartner von c-Rel zu einem besseren Verständnis der Abläufe während der Tumorprogression beitragen.

Ryk (inaktive Rezeptortyrosinkinase)

Ryk konnte als PDZ-abhängiger Interaktionspartner von Erbin identifiziert werden. Ryk wurde 1998 von Michael Buchert in seiner Doktorarbeit "The Production and Interaction Domain with Novel Binding Specificities through a Scaffold Based Evolutionary Screen" am Institut für Medizinische Virologie der Universität Zürich als Interaktionspartner von AF-6 beschrieben. Da Bcr und Ryk PDZ-abhängig mit AF-6 interagieren, war es naheliegend, den Bcr PDZ-Interaktionspartner Erbin als Interaktionspartner von Ryk zu testen. Überexprimiertes oder konstitutiv aktives ErbB2 wurde in vielen Tumoren als eine Ursache der Tumorprogression erkannt. Überexprimiertes Ryk konnte ebenfalls in Tumoren nachgewiesen werden (*Wang X. C., 1996*). Ryk weist alle Strukturmerkmale einer Rezeptortyrosinkinase auf. Aufgrund einer Punktmutation in der katalytischen Domäne ist sie jedoch enzymatisch inaktiv. Ein ähnliches Beispiel für eine kinasedefekte Rezeptortyrosinkinase ist ErbB3. ErbB3 kann nur nach Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie durch Transphosphorylierung "aktiviert" werden. Die Phosphorylierung des ErbB3-Rezeptors an spezifischen Tyrosinresten erzeugt Bindungsstellen für Signalproteine, wodurch ein enzymatisch inaktives ErbB3 Signalketten stimulieren kann. Ein vergleichbarer Vorgang könnte am Ryk stattfinden. Die Bindung von Ryk an PDZ-Proteine könnte bei der Heterodimerisierung von Ryk mit anderen RTK eine wichtige Rolle spielen.

4.1.2.3 Binden Proteine mit einer Jab1/MPN-Domäne an PDZ Zielsequenzen?

Wie im Kapitel 4.1.1 beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit Jab1 als Interaktionspartner der C-Termini von EphrinB1-3 in Hefen identifiziert werden. Weiterhin wurden in unserem Labor Hefe Zwei-Hybrid Versuche mit den C-terminal endständigen 104 Aminosäuren des GABA (gamma-aminobutyric acid)-Rezeptors durchgeführt (Dr. Gerald Radziwill, nicht veröffentlichte Daten). Als Interaktionspartner konnte die vollständige cDNA für c6.1A identifiziert werden. Jab1 und c6.1A verfügen über keine PDZ-Domäne, binden aber in Hefen an Zielsequenzen für PDZ-Proteine bzw. Protein C-Termini. Beide Proteine besitzen eine Jab1/MPN (MPN: Mpr1, Pad1 N-terminal)-Domäne (**Abb. 4.5, 4.6**).

```

1  MAASGSGMAQKTWELANNMQEAQSIDEIYKYDKKQQQEILAAKPWTKDHHYFKYCKISALALLKMVM
68  HARSGGNLEVMGLMLGKVDGETMIIMDSFALPVEGTETRVNAQAAAYEYMAAYIENAKQVGRLENAI
135  GWYHSHPGYGCWLSGIDVSTQMLNQQFQEPFVAVVIDPRTTISAGKVNLGAFRTYPKGYKPPDEGPS
202  EYQTIPLNKIEDFGVHCKQYYALEVSYFKSSLDRKLELLWNKYWVNTLSSSSLLTNADYTTGQVFD
269  LSEKLEQSEAQLGRGSFMLGLETHDRKSEDKLAKATRDSCKTTIEAIGHGLMSQVIKDKLFNQINIS
    
```

Abb. 4.5: Proteinsequenz von Jab1 mit markierter Jab1/MPN-Domäne (rot). Die Sequenz zwischen den beiden Balken entspricht dem im Hefesystem als Interaktionspartner von EphrinB1-3 identifizieren Proteinfragment (88-377 AS). Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

```

1  MAVQVVQAVQAVHLESDAFLVCLNHALSTEKEEVMGLCIGELNDDTRSDSKFAYTGTEMRTVAEKVD
68  AVRIVHIHSVILRRSDKRKDRVEISPEQLSAASTEAEERLAELTGRPMRVVGGWYHSHPHITVWPSHV
135  DVRTQAMYQMMDQGFVGLIFSCFIEDKNTKTGRVLYTCFQSIQAQKSSESLHGPRDFWSSSQHISIE
202  GQKEEERYERIEIPIHIVPHVTIGKVCLESAVELPKILCQEEQDAYRRIHSLTHLDSVTKIHNGSVF
269  TKNLCSQMSAVSGPLLQWLEDRLEQNQQHLQELQQEKEELMQELSSLE
    
```

Abb. 4.6: Proteinsequenz von c6.1A mit markierter Jab1/MPN-Domäne (rot). Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

Die C-Termini der B-Ephrine 1-3 kodieren eine typische Zielsequenz für PDZ-Proteine und sind als Liganden für PDZ-Proteine bereits beschrieben wie z.B. GRIP (glutamate receptor-interacting protein; *Brückner K., 1999*). Der C-Terminus des GABA1a/b-Rezeptors entspricht mit dem C-Terminus -LSCDGSRVHLLYK keiner typischen Zielsequenz von PDZ-Domänen. Das interne -SRV-Motiv wird aber als Teil eines beta-Fingers diskutiert, der eine Zielsequenz für PDZ-

Proteine darstellen kann (*Bettler B., 1998*).

Jab1/MPN-Domänen sind für Proteine von Prokaryonten und Eukaryonten beschrieben worden. Wenn Jab1/MPN-Domänen ähnlich wie PDZ-Domänen für die Komplexierung von Proteinen in der Zelle verantwortlich sind, eröffnet dies ein neues Verständnis der Proteinvernetzung in der Zelle. Proteine mit einer Jab1/MPN-Domäne können Einfluß nehmen auf diverse Signalwege wie den proteolytischen Abbau von Proteinen, auf die Apoptose und die Proliferation von Zellen (Cope G. A., 2002; Wenyu L., 2002; Claret F. X., 1996; Tomoda K., 1999).

Ich führte mit Jab1 und c6.1A Sequenzvergleiche gegen diverse PDZ-Domänen durch, um eventuelle Sequenzhomologien zu identifizieren, die auf eine PDZ-ähnliche Proteindomäne hinweisen. Ich konnte eine kurze Sequenzhomologie zwischen dem Bindungsloop und dem nachfolgenden beta-Faltblatt der PDZ-Domänen von ZO-1, SAP-97 und Lin2 feststellen (Abb. 4.7). Diese Region ist essentiell für eine PDZ-Interaktion. Die sekundäre Struktur zwischen den PDZ-Domänen von ZO-1, SAP-97 und Lin2 und der Jab1/MPN-Domäne von Jab1 und c6.1A ist in diesem Bereich ähnlich (Tran H. J. T., 2003).

partielle PDZ-Domänen von:		Bindungsloop	beta-Faltblatt
ZO-1	418	.GD-SVG	LRLA..
SAP97	473	.ST-GLG	FNIV..
Lin2	498	.DE-PMG	ITLK..
partielle Jab1/MPN-Domäne von:		Loop	beta-Faltblatt
JAB1	113	.LE	VMG-LMLG..
c6.1A	39	.EE	VMG-LCIG..

Abb. 4.7: Sequenzvergleich der Jab1/MPN-Domäne von Jab1 und c6.1A mit verschiedenen PDZ-Domänen. Als primäres Template wurde die Sequenz von Jab1 benutzt. Rot: identische Aminosäuren, blau: ähnliche Aminosäuren. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

4.1.3 Proteininteraktionspartner der C-terminalen PDZ-Domäne von Erbin

Mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems wurden für die PDZ-Domäne von Erbin verschiedene Liganden identifiziert. Für diese Tests wurde das ErbinCT-Proteinkonstrukt (1005-1371 AS) verwendet. Die Interaktion zwischen ErbinCT und den Proteinen ErbB2, APC, Bcr wurde in HEK293-Zellen getestet und nachgewiesen (Abb. 4.8, 4.9, 4.10).

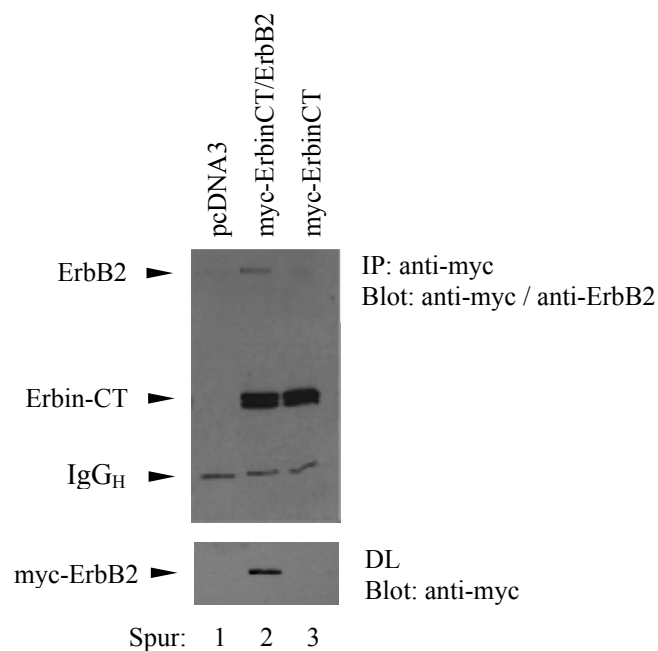


Abb. 4.8: Westernblot zum Nachweis der Proteininteraktion zwischen ErbB2 und ErbinCT. In HEK293-Zellen wurden myc-ErbinCT (1005-1371 AS) (Spur 2, 3) und ErbB2 (Spur 2) transient überexprimiert. Zur Kontrolle wurde das Leerplasmid pcDNA3 transfiziert (Spur 1). Die Lysate wurden mit anti-myc (9E10) Antikörpern inkubiert. Diese Immunkomplexe sind im Immunblot auf Kopräzipitation von ErbB2 und ErbinCT getestet worden. Die Proteininteraktion zwischen ErbB2 und ErbinCT konnte mit den verwendeten Proteinkonstrukten bestätigt werden (Spur 2). Die Expression von myc-ErbB2 wurde im Zelllysate nachgewiesen.

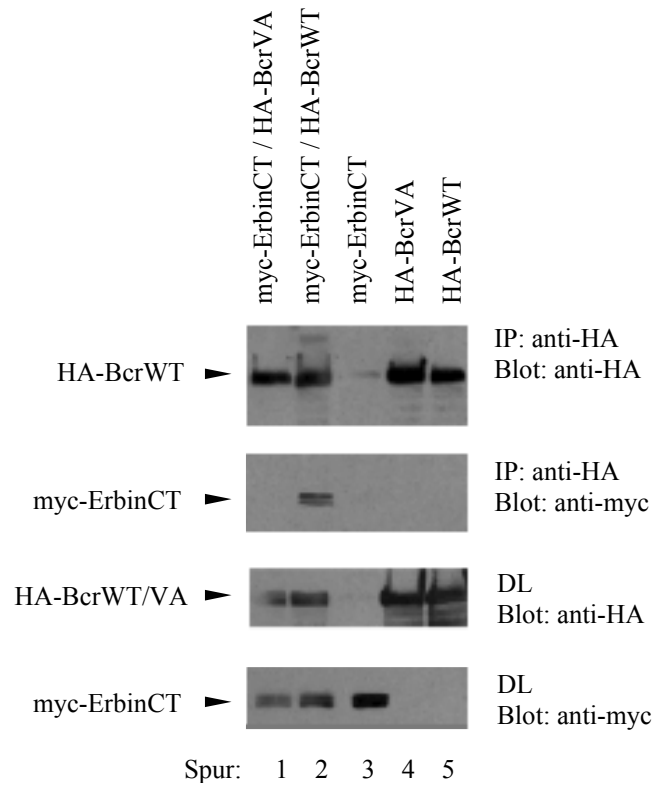


Abb. 4.9: Westernblot zum Nachweis der Proteininteraktion zwischen Bcr und ErbinCT. In HEK293-Zellen wurde wie angegeben myc-ErbinCT (1005-1371 AS), HA-BcrWT, und HA-BcrVA exprimiert und die Lysate mit anti-HA Antikörpern inkubiert. Die Immunkomplexe sind im Immunblot auf Kopräzipitation von HA-Bcr und myc-ErbinCT getestet worden. Die Proteinexpression von BcrWT, BcrVA und ErbinCT wurde im Zellysate nachgewiesen.

In **Abbildung 4.9** konnte die Proteininteraktion zwischen Bcr und ErbinCT gezeigt werden (Spur 2). Zwecks Abklärung einer eventuellen PDZ-abhängigen Interaktion wurde die BcrV1271A-Mutante (BcrVA) als Interaktionspartner von ErbinCT getestet, die C-terminal endständig für die Aminosäure Alanin statt Valin kodiert. Protein C-Termini, die Liganden für PDZ-Domänen darstellen, sind, nach V→A Mutation nicht mehr in der Lage, die PDZ-Domäne zu binden. Für die BcrV1271A-Mutante ist eine Bindung an die PDZ-Domäne nicht mehr möglich (Spur 1). Somit kann diese Proteininteraktion als PDZ-abhängig beschrieben werden.

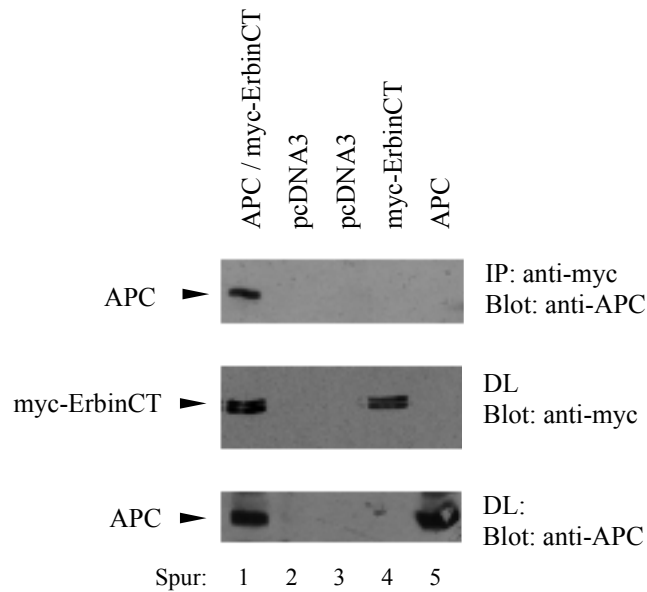


Abb. 4.10: Westernblot zum Nachweis der Proteininteraktion zwischen APC und ErbinCT. HEK293-Zellen wurden wie angegeben ErbinCT (1005-1371 AS), APC exprimiert und zur Kontrolle mit pcDNA3 transfiziert (2 und 3 Spur). Die Lysate wurden mit anti-myc Antikörpern inkubiert. Die anti-myc Immunkomplexe sind im Immunblot auf Kopräzipitation von APC getestet worden. Die Expression von APC und ErbinCT wurde im Zelllysat nachgewiesen.

In **Abbildung 4.10** konnte die Proteininteraktion zwischen APC und ErbinCT gezeigt werden (Spur 1). Proteininteraktionstests wurden ebenfalls mit ErbinCT (1005-1371 AS) und den vollständigen Proteinen von c-Rel und HTLV1-Tax durchgeführt. Nach den ersten Resultaten (hier nicht gezeigt) gibt es deutliche Hinweise einer Proteininteraktion zwischen c-Rel und ErbinCT und HTLV1-Tax und ErbinCT.

4.1.4 Rai-Erbin Fusionsprotein

Nach Identifikation eines PDZ-haltigen Proteinfragments (die vollständige Sequenz wurde später als Erbin beschrieben; hier: ErbinCT, 1005-1371 AS) als Interaktionspartner von ErbB2 in den Hefen, führte ich PCR-Reaktionen mit dem Template einer humanen „brain“ cDNA-Bibliothek (Marathon-Ready cDNA, Clontech) durch, um die vollständige cDNA zu identifizieren. Es wurden die vom Kit vorgegebenen "Adaptor" Primer und "Nested Adaptor" Primer verwendet. Für die genspezifischen Primer wurde die damalige Sequenz von KIAA1225 herangezogen (Klon vom Kazusa cDNA-Sequenzierungsprojekt: Kazusa DNA Research Institute), eine N-terminal verlängerte Variante des PDZ-Proteins ErbinCT (1005-1371 AS). Heute entspricht die veröffentlichte Sequenz von KIAA1225 der "full length" cDNA von Erbin. Das Protein KIAA1225 wurde 2000 aus einer humanen "brain" cDNA-Bibliothek isoliert als nicht vollständige cDNA eines PDZ-Proteins.

Die Sequenzierung der PCR-Fragmente ergab partiell das von Borg J. P. identifizierte Erbin (*Borg J. P., 2000*). Weiterhin konnte partiell die cDNA eines bisher unbekanntes Rai-Erbin Fusionsproteins isoliert werden (**Tabelle 4.3**). Rai ist ein Shc (src homologous and collagen)-verwandtes Protein, dessen Expression auf das fötale Gehirn beschränkt ist (*Pellicci G., 1996*).

Tabelle 4.3: Sequenz vom pCR2.1-Klon 9

VEKTOR pCR2.1	INSERT
	Rai (17-32 AS) ⇒
	L L I R L T I G L E R
TGG AAT TCG GCT TCC	ATC CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAC CGG
	Erbin (34-123 AS) ⇒
	P P G Q V L E Q V P K E I F T ...
CCG CCC GGG CAG GTC	TTA GAA CAA GTT CCG AAA GAG ATT TTT TAC ...

Rai-Erbin Fusionsprotein; in der vorliegenden Arbeit identifiziert

Im Rai-Erbin Fusionsprotein sind die 33 N-terminalen Aminosäuren von Erbin durch die N-terminale Region von Rai ersetzt. Die Rai-spezifische Sequenz kodiert für keine definierte Domäne. Rai wie Erbin (LRR) kodieren in diesem Bereich häufig für Leuzine. Leuzinreiche

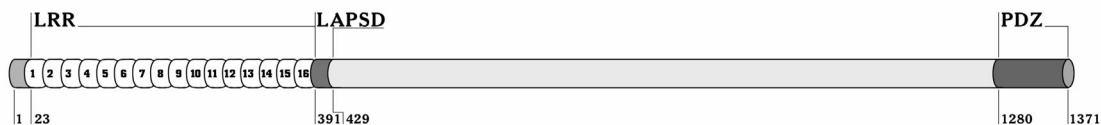
Regionen sind für Proteininteraktionen verantwortlich. Das Rai-Erbin Fusionsprotein könnte im Vergleich zu Erbin ein verändertes LRR-abhängiges Bindeverhalten zu Proteinen aufweisen. Die Inhibition des Ras-Raf-Erk-Signalweges durch Erbin könnte aufgehoben oder verstärkt werden (*Huang Y. Z., 2003*).

4.2 PDZ-Protein Erbin, Interaktionspartner von beta-Catenin und Modulator des Wnt-Signaltransduktionsweges

In dieser Arbeit wurde zunächst im Hefesystem und anschließend durch Koimmunpräzipitationsexperimente in Säugerzellen gezeigt, daß APC und ErbB2 in der Lage sind, mittels ihres C-Terminus an die PDZ-Domäne von Erbin zu binden. Eine schematische Darstellung von Erbin ist in **Abbildung 4.11** dargestellt.

APC und ErbB2 interagieren mit beta-Catenin (*Rubinfield B., 1993; Ochiai A., 1994*). Beta-Catenin verfügt ebenfalls über einen C-Terminus der an PDZ Domänen binden kann und bildet somit Heteroduplexe mit Proteinen, die mittels ihres C-Terminus mit PDZ-Proteinen interagieren können. Ausgehend von diesen Überlegungen wurde beta-Catenin als Interaktionspartner für Erbin getestet.

Erbin (ErbB2-interacting protein)



LRR: leucin-rich repeats
 PDZ: PSD95/Dlg/ZO-1
 LAPSD: LAP-specific domain

Abb. 4.11: Domänenstruktur vom LAP-Protein Erbin. N-terminal kodiert Erbin für 16 LRR-Bereiche mit einer anschließenden LRR-ähnlichen Domäne (LAPSD). C-terminal kodiert Erbin für eine PDZ-Domäne. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

Epitheliale Zellen sind streng polarisiert in apikale und basolaterale Bereiche. Erbin ist basolateral lokalisiert und kolokalisiert dort mit ErbB2. Wenn die PDZ-abhängige Interaktion zwischen

ErbB2 und Erbin gestört ist, ist die Lokalisation von ErbB2 nicht mehr nur auf den basolateralen Bereich beschränkt (*Borg J. P., 2000*).

Aufgrund der vorangestellten Überlegungen wurde Erbin als PDZ-abhängiger Interaktionspartner von beta-Catenin getestet, mit dem Ziel, Erbin in seinem Einfluß auf die beta-Catenin/Tcf-abhängigen Genexpression zu testen.

4.2.1 Endogene Interaktion zwischen beta-Catenin und Erbin, zwischen Bcr und Erbin in MKN-7-Zellen

In der humanen Magenkarzinom-Zelllinie MKN-7 wurde die endogene Interaktion zwischen beta-Catenin und Erbin und zwischen Bcr und Erbin getestet und nachgewiesen. Dieses Experiment (**Abb. 4.12**) wurde durchgeführt von Ulrike Margelisch und Dr. Gerald Radziwill. Dieser Versuch wird von mir für die Interaktion zwischen Erbin und beta-Catenin nochmals wiederholt, mit dem Nachweis der Expression aller beteiligten Proteine.

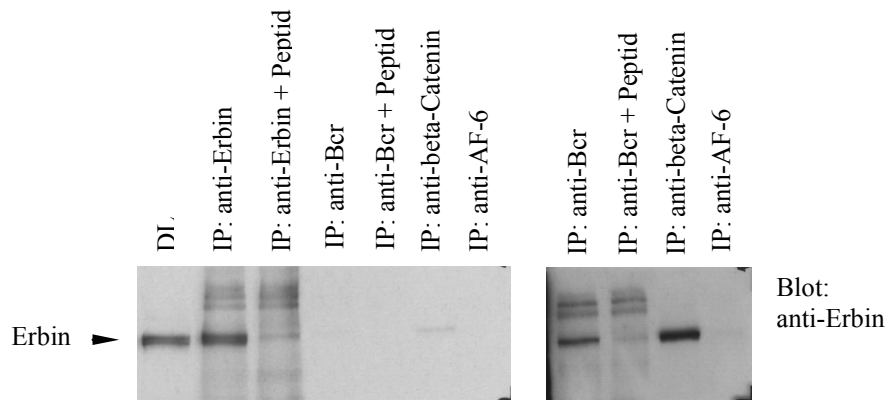


Abb. 4.12: Westernblot zum Nachweis der endogenen Proteininteraktion zwischen Erbin und beta-Catenin und zwischen Erbin und Bcr. Ca. 10^7 MKN-7-Zellen wurden lysiert und mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Die Immunkomplexe wurden im Immunblot auf Kopräzipitation von Erbin getestet. Die Spezifität der Antikörperreaktion wurde für Erbin und Bcr durch Zugabe des jeweiligen Peptidantigens im Überschuß nachgewiesen (+ Peptid). PDZ-Protein AF-6 wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Der rechte Bildteil entspricht einer 5x längeren Expositionszeit.

4.2.2 Einfluß des PDZ-Proteins Erbin auf die Tcf-abhängige Genexpression

Beta-Catenin reguliert im Komplex mit den Tcf-Transkriptionsfaktoren die Genexpression der Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges. Interaktionspartner von beta-Catenin können die Tcf-abhängige Transkription beeinflussen. Mittels eines kommerziell erhältlichen TOPflash/FOPflash-Luziferaseassays (Promega) ist es möglich, die TRE (Tcf-responsive element)-abhängige Stimulation eines Reportergens zu untersuchen. Das TOPflash-Plasmid kodiert für ein „firefly“-Luziferase-Gen, welches reguliert wird über einen Thymidin-Kinase-Promotor, vor dem mehrfach die minimale DNA-Sequenz für die Bindung der Tcf-Transkriptionsfaktoren integriert worden ist. Das FOPflash-Plasmid weist, zu dem ansonsten identischen Plasmid, eine mutierte Tcf-DNA-Bindungsdomäne auf und wird im Experiment als Kontrolle verwendet. Durch Überexpression von beta-Catenin und dem Vergleich von TOPflash und FOPflash können Inhibitoren der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Genexpression identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde Erbin als PDZ-abhängiger Interaktionspartner von beta-Catenin identifiziert (Kapitel 4.2.1). Hier wurde nun der Einfluß von Erbin auf die Tcf-abhängige Transkription getestet. Erbin konnte unter beta-Catenin induzierten Bedingungen als Inhibitor charakterisiert werden (**Abb. 4.13**).

Im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay wurde auch ErbinCT (1005-1371 AS) getestet. Dieses Konstrukt kodiert für die 366 C-terminal endständigen Aminosäuren von Erbin (**Abb. 4.14**). Für dieses Proteinkonstrukt konnte eine expressionsabhängige Aktivierung der Tcf-abhängigen Genexpression nachgewiesen werden.

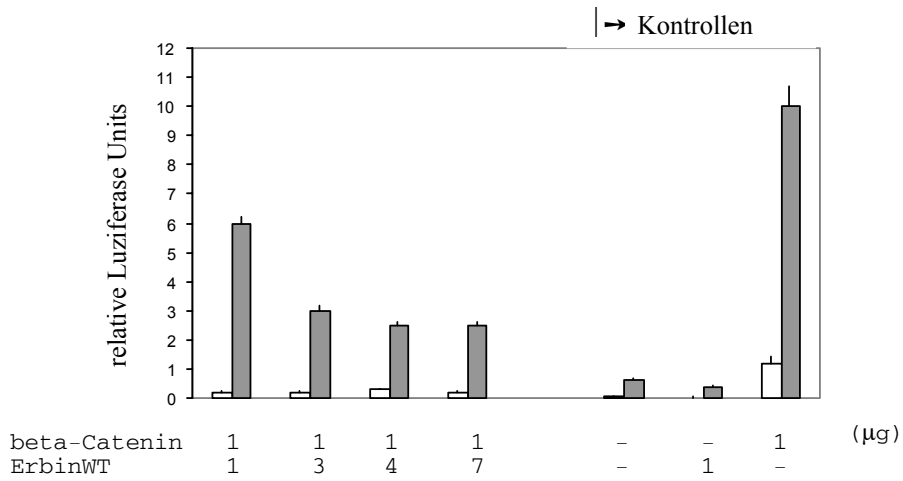


Abb. 4.13: Erbin Wildtyp inhibiert die Tcf-abhängige Genexpression im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid TOPflash (grau; Wildtyp-Sequenz der Tcf-DNA-bindenden Region) oder FOPflash (weiß; Kontrolle, Mutante der Tcf-bindenden Region) transfiziert. Die Tcf-abhängige Transkription wurde durch die Transfektion von je 1 µg pDNA kodierend für beta-Catenin aktiviert. Unter beta-Catenin-induzierten Bedingungen wurden bei steigender Menge (1, 3, 4 und 7 µg) ein Plasmid kodierend für Erbin Wildtyp transfiziert. Alle Transfektionsansätze wurden, wenn notwendig, mit pcDNA3 auf 8 µg pDNA-Gesamtmenge (kodierend für Erbin und/oder beta-Catenin) ergänzt. Das Maximum der durch beta-Catenin induzierten Tcf-abhängigen Transkriptionsaktivierung liegt in diesem Assay bei 10 Luziferase Units (+/- 0,8; siehe Kontrollfeld).

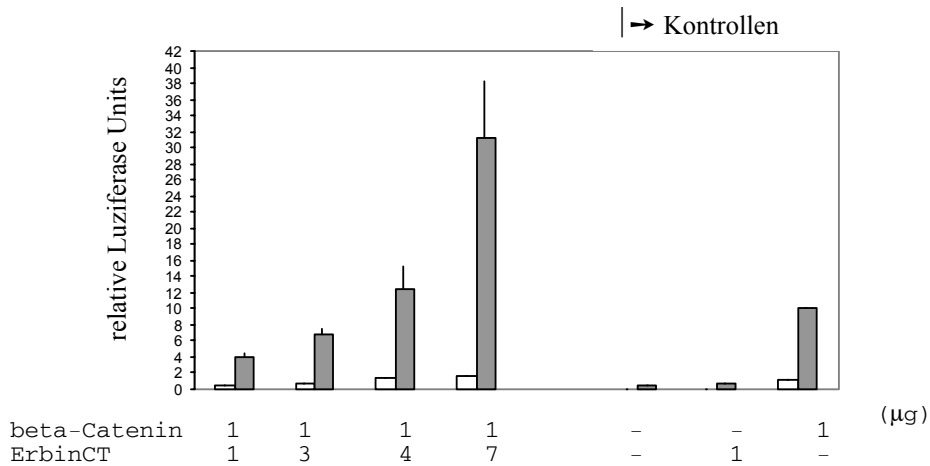


Abb. 4.14: ErbinCT aktiviert expressionsabhängig die Tcf-abhängige Genexpression im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay. HEK293-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid TOPflash (grau; Wildtyp-Sequenz der Tcf-DNA-bindenden Region) oder FOPflash (weiß; Kontrolle, Mutante der Tcf-bindenden Region) transfiziert. Die Tcf-abhängige Transkription wurde durch die Transfektion von je 1 µg pDNA kodierend für beta-Catenin aktiviert. Unter beta-Catenin-induzierten Bedingungen wurden bei steigender Menge (1, 3, 4 und 7 µg) ein Plasmid kodierend für den C-Terminus von Erbin (ErbinCT; 1005-1371 AS) transfiziert. Dieser Versuch wurde ansonsten wie unter Abbildung 4.13 beschrieben durchgeführt.

4.2.3 Lokalisation von Erbin und ErbinCT(PDZ) in HEK293-Zellen

Aufgrund der unterschiedlichen Effekte von Erbin und dem ErbinCT-Proteinkonstrukt (1005-1371 AS) im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay (Abb. 4.13, 4.14) wurde deren zelluläre Lokalisation abgeklärt. Dazu wurden Erbin und ErbinCT in HEK293-Zellen überexprimiert. Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, daß Erbin im Zytoplasma, ErbinCT aber vor allem im Zellkern lokalisiert ist (Abb. 4.15).

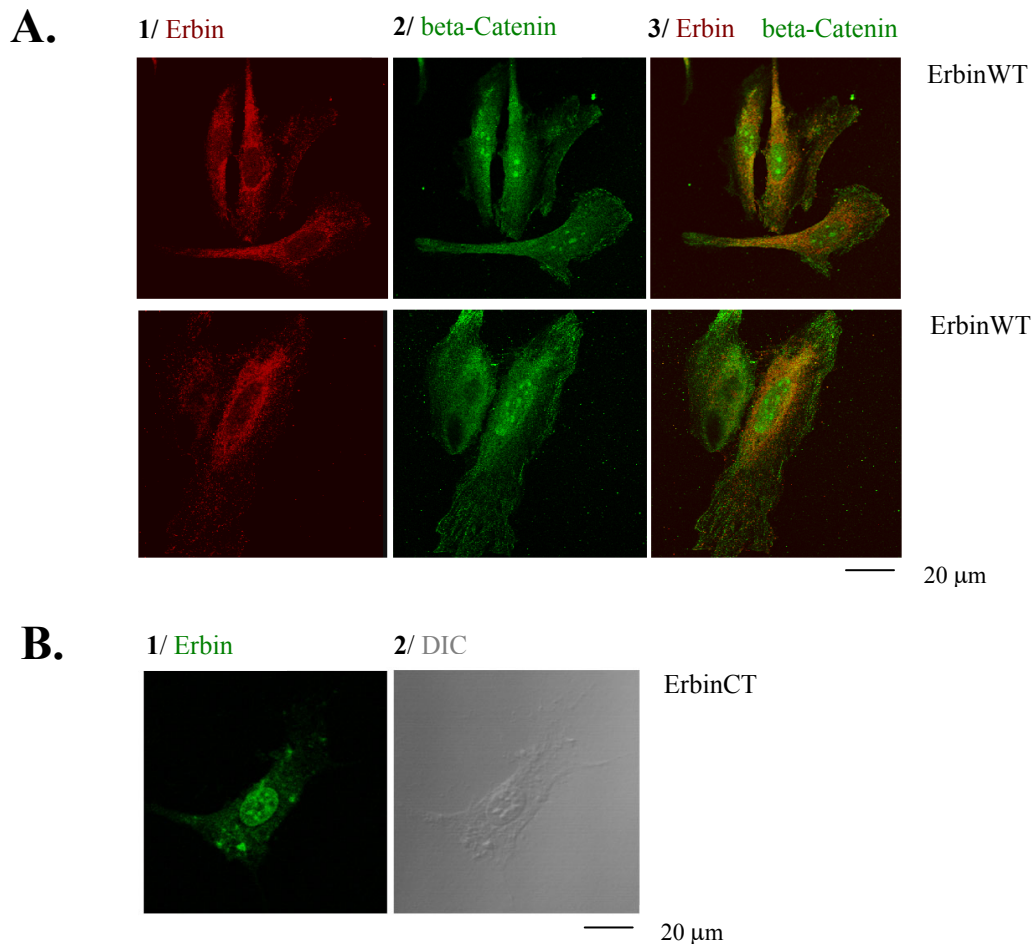


Abb. 4.15: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Lokalisation von Erbin, ErbinCT und beta-Catenin in HEK293-Zellen. (A.) Zwei Beispiele der *in vivo* Lokalisation/Kolokalisation von Erbin und beta-Catenin. (A.1) Detektion von Erbin mit primären Erbin-PDZ Antikörpern und TRITC-konjugierten sekundären Antikörpern im Zytoplasma. (A.2) Detektion von beta-Catenin mit primären anti-beta-Catenin Antikörpern und FITC-konjugierten sekundären Antikörpern im Zytoplasma und Zellkern. (A.3) Mit der Überlagerung der Aufnahmen A.1 und A.2 zeigen sich gelbe Areale, die einen Hinweis auf Kolokalisation von Erbin und beta-Catenin geben. (B.) Lokalisation vom ErbinCT. (B.1) Nachweis der Lokalisation von ErbinCT durch Detektion mit primären anti-Erbin-PDZ Antikörpern und FITC-konjugierten sekundären Antikörpern im Zellkern (B.2). Darstellung der Zellkonturen mittels des DIC (different interference contrast)-Verfahrens.

Kürzlich wurden N-terminal deletierte Erbin Proteine beschrieben, deren Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden konnte (Legouis R., 2003). Auf der Suche nach eventuellen Spleißvarianten von Erbin, die noch über ihre PDZ-Domäne verfügen und somit die beta-Catenin-abhängige Transkription beeinflussen könnten, wurden in einem Vortest Lysate verschiedener Tumorzelllinien getestet. Mittels eines Erbin(PDZ)-spezifischen Antikörpers (anti-Erbin-PDZ) konnten Proteinbanden identifiziert werden, die ein geringeres Molekulargewicht als Erbin Wildtyp aufweisen und somit N-terminal verkürzten Erbin-Proteinen entsprechen könnten die über ihre PDZ-Domäne verfügen (Abb. 4.16).

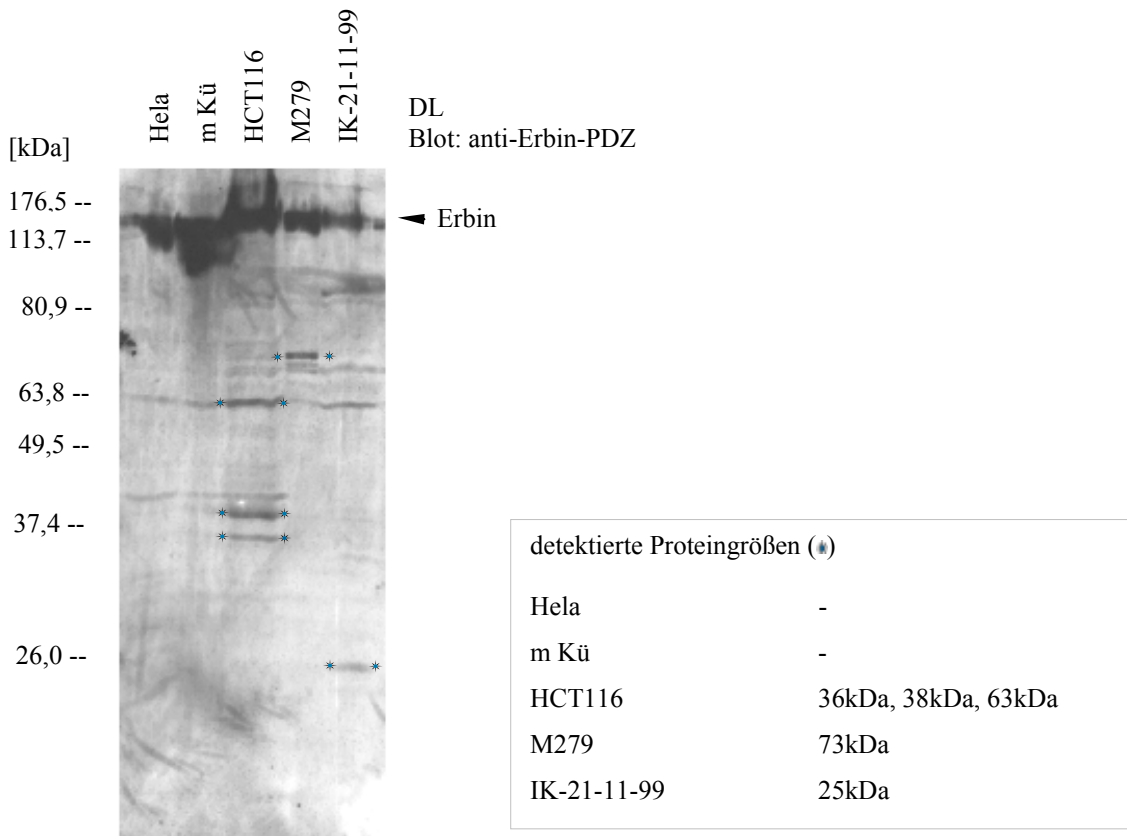


Abb. 4.16: Westernblot zum Nachweis von verkürzten Erbin-Proteinen. Detektion von verkürzten Erbin-Proteinen mit einem für die PDZ-Domäne von Erbin spezifischen Antikörper. Lysate verschiedener Zelllinien wurden im Immunblot auf Expression von Erbin und verkürzten Erbin-PDZ Proteinen getestet. Es sind jeweils ca. 10^7 Zellen in 400 μ l Lysepuffer (Eisenmann) lysiert worden, von denen 20 μ l auf das Gel aufgetragen worden sind. Mit einem spezifischen Antikörper gegen die PDZ-Domäne von Erbin wurde die Expression von Erbin und Erbin-PDZ Proteinen im Blot getestet. Die Kolonkarzinomzelllinie HCT116 weist einen aktivierten Wnt-Signaltransduktionsweg auf. M279, m Kü, IK-21-11-99 sind etablierte Melanoma-Zelllinien, die hinsichtlich des Wnt-Signaltransduktionsweges noch nicht charakterisiert worden sind. Die Hela-Zelllinie, ist eine Zervix Adenokarzinom-Zelllinie für die kein induzierter Wnt-Signaltransduktionsweg beschrieben worden ist.

Getestet wurden Tumorzelllinien mit einem konstitutiv aktiven Wnt-Signaltransduktionsweg (HCT116) und Zelllinien, für die bisher keine Charakterisierung des Wnt-Signaltransduktionsweges vorliegt (M279, m Kü, IK-21-11-99). Das Ziel der Suche von Erbin-Spleißvarianten ist es, eine bzw. mehrere Spleißvarianten von Erbin zu identifizieren, die noch für ihre PDZ-Domäne kodieren und somit unter den Bedingungen der Kernlokalisierung von beta-Catenin PDZ-abhängig die beta-Catenin/Tcf-regulierte Transkription im Zellkern aktivieren könnten.

4.2.4 Proliferative Rolle möglicher Erbin(PDZ)-Spleißvarianten

In der vorliegenden Arbeit wie auch in der Literatur sind erste Hinweise für Spleißvarianten von Erbin-PDZ gezeigt worden (**Abb. 4.16**). Spleißvarianten von Erbin die für die PDZ-Domäne kodieren, könnten als Bindepartner von beta-Catenin (**Abb. 4.12**) die Tcf-abhängige Genexpression im Zellkern regulieren.

Der in der vorliegenden Arbeit erbrachte Nachweis der expressionsabhängigen Tcf-vermittelten Aktivierung der Transkription durch das ErbinCT(PDZ)-Proteinkonstrukt (1005-1371 AS) im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay (im Gegensatz zu Erbin Wildtyp) (**Abb. 4.13, 4.14**) und die Lokalisation vom ErbinCT(PDZ)-Konstrukt im Zellkern (wohingegen Erbin Wildtyp nur im Zytoplasma detektiert wird) (**Abb. 4.15**), gab den Anstoß für die Durchführung von Proliferationstests, um einen proliferativen Einfluß von ErbinCT abzuklären. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß alle Zellen, die ErbinCT(PDZ) exprimieren, sich in der Proliferationsphase befinden (**Abb. 4.17**).

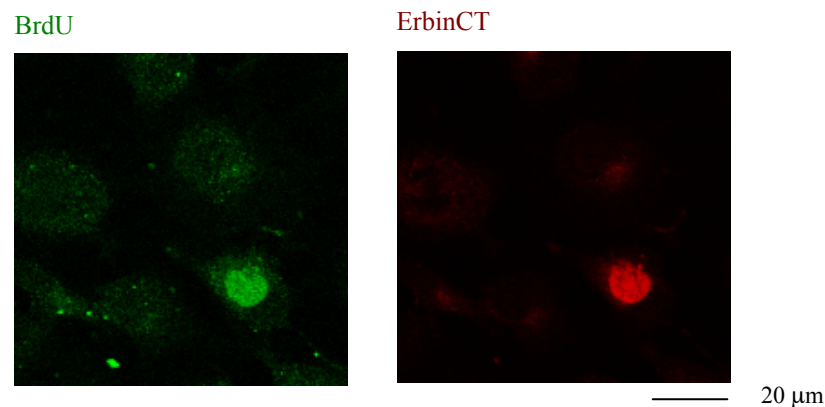


Abb. 4.17: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Kernlokalisierung von ErbinCT(PDZ) in HEK293-Zellen in Abhängigkeit zur Proliferation. Detektion von integriertem BrdU mit primären anti-BrdU Antikörpern und sekundären FITC-konjugierten Antikörpern (linke Abbildung). Detektion von Erbin mit primären Antikörpern (anti-Erbin-PDZ) und sekundären TRITC-konjugierten Antikörpern (rechte Abbildung). Der dargestellte Balken entspricht 20 µm.

Dies weist darauf hin, daß allein der C-Terminus (PDZ-Domäne) von Erbin die Proliferation nicht hemmt. Für das zytoplasmatisch lokalisierte Erbin, das in dieser Arbeit als Inhibitor der Tcf-abhängigen Genexpression charakterisiert wurde, kann im Gegensatz zu Spleißvarianten, die für keine LRR-Region mehr kodieren aber für die PDZ-Domäne, ein aktivierender Einfluß auf die Proliferation ausgeschlossen werden.

4.3 Bcr reguliert mittels seines N-Terminus die Genexpression von Zielgenen des Wnt-Signaltransduktionsweges

Beta-Catenin konnte in dieser Arbeit als Interaktionspartner für Bcr nachgewiesen werden. Beta-Catenin reguliert im Komplex mit den Tcf-Proteinen die Transkription der Zielgene vom Wnt-Signaltransduktionsweg. Bcr wurde als Interaktionspartner von beta-Catenin, als Regulator der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Genexpression, untersucht.

4.3.1 Endogene Interaktion zwischen Bcr und beta-Catenin in HEK293-Zellen

Die endogene Interaktion zwischen Bcr und beta-Catenin wurde in den epithelialen HEK293-Zellen getestet. In der **Abbildung 4.18** ist die endogene Interaktion zwischen Bcr und beta-Catenin gezeigt.

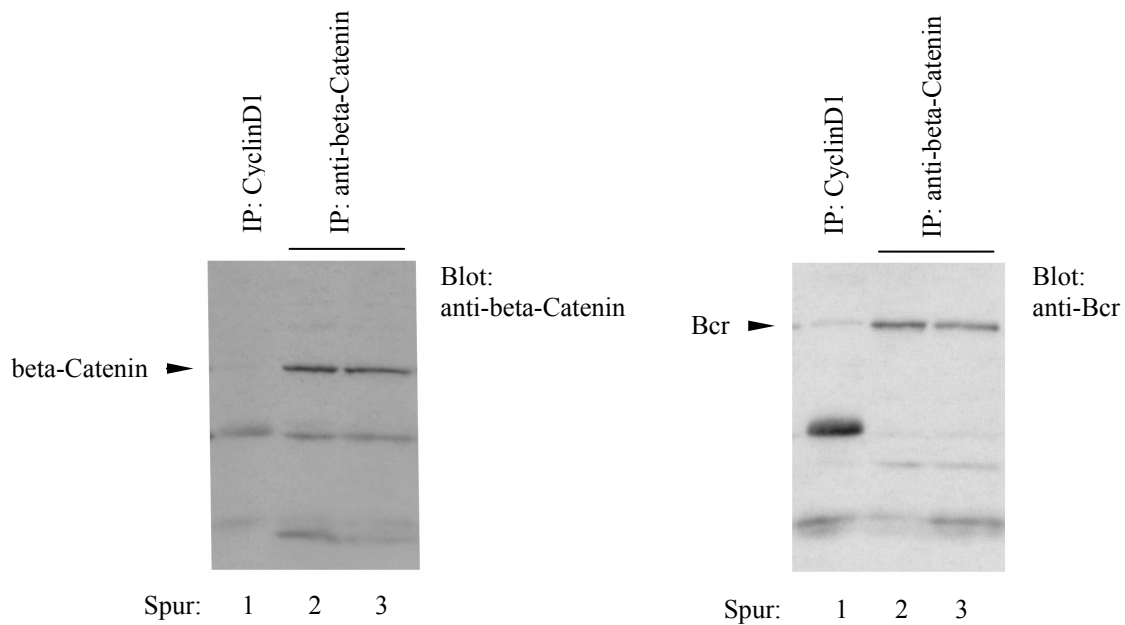


Abb. 4.18: Westernblot zum Nachweis der endogenen Proteininteraktion zwischen Bcr und beta-Catenin. HEK293-Zellen wurden lysiert und mit anti-beta-Catenin Antikörpern inkubiert. Von zwei getrennten Versuchen wurden die Lysate aufgetragen (Spur 2 und 3) und auf Präzipitation von beta-Catenin (linke Abbildung) und Kopräzipitation von Bcr (rechte Abbildung) getestet. Als Kontrolle wurde ein für beta-Catenin und Bcr unspezifischer Antikörper (anti-CyclinD1) eingesetzt, mit dem Bcr nicht oder nur sehr schwach im Immunkomplex detektiert wurde.

4.3.2 Identifikation der Binderegion von Bcr für den beta-Catenin/Bcr-Komplex

Um die Interaktionsdomäne von Bcr für beta-Catenin zu identifizieren, wurden verschiedene Bcr-Proteinkonstrukte auf eine Bindung mit endogenem beta-Catenin in HEK293-Zellen getestet. Das Wildtyp Bcr Protein und das N-terminale Bcr-Konstrukt, das die Aminosäuren 1 bis 203 umfaßt, konnte mit beta-Catenin kopräzipitiert werden. Bcr Δ NT (168-1371 AS) interagiert nicht mit beta-Catenin (**Abb. 4.19**).

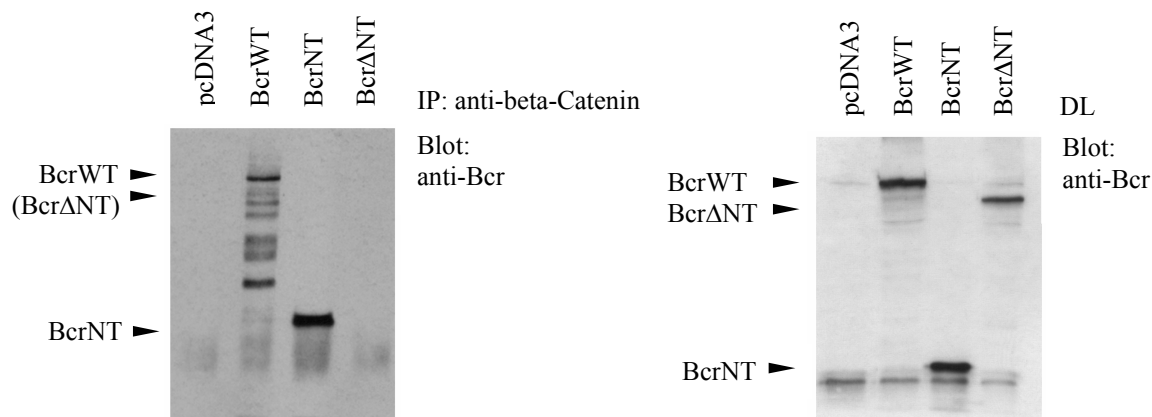


Abb. 4.19: Westernblot zum Nachweis der notwendigen Bcr-Binderegion für den Bcr/beta-Catenin-Komplex. In HEK293-Zellen wurden die Bcr-Proteinkonstrukte BcrWT (1-1271 AS), BcrNT (1-203 AS), Bcr Δ NT (168-1371 AS) transient überexprimiert und zur Kontrolle das Leerplasmid pcDNA3 transfiziert. Die Lysate wurden mit anti-beta-Catenin Antikörpern inkubiert. Die anti-beta-Catenin Immunkomplexe wurden im Immunblot auf Kopräzipitation der Bcr Proteine (Mix der Antikörper anti-Bcr N-20 und anti-Bcr C-20) (linke Abbildung) und beta-Catenin getestet. Für alle vier Spuren konnte eine konstante Menge an beta-Catenin im Direktlysat (DL) wie durch Immunpräzipitation (IP) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion zwischen BcrWT/NT und endogenem beta-Catenin ist im linken Blot nicht zu sehen, da der Expressionsunterschied zwischen den überexprimierten Bcr-Proteinen und dem endogenen Bcr recht groß ist, wie die Analyse der Direktlysat zeigt (rechte Abbildung). Die Anhäufung von markierten Proteinbanden mit einem geringeren Molekulargewicht als BcrWT (unter der BCR Wildtyp-Bande) in der linken Abbildung ist auf Abbauprodukte von Bcr zurückzuführen.

4.3.3 Charakterisierung von Bcr als Inhibitor der Tcf-abhängigen Genexpression

Zur Charakterisierung des Einflusses von Bcr auf den transkriptionell aktiven beta-Catenin/Tcf-Komplex wurden TOPflash/FOPflash-Luziferaseassays durchgeführt. Nach Aktivierung der Tcf-abhängigen Transkription durch Überexpression von beta-Catenin konnten die Proteine BcrWT und BcrNT als Inhibitor der Tcf-abhängigen Transkription charakterisiert werden. Die Expression von BcrΔNT führte zu keiner signifikanten Reduktion des Signals. Somit konnte der N-Terminus von Bcr, die Interaktionsdomäne von beta-Catenin, als funktionelle Domäne identifiziert werden, die verantwortlich ist für die Hemmung der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Genexpression (**Abb. 4.20**).

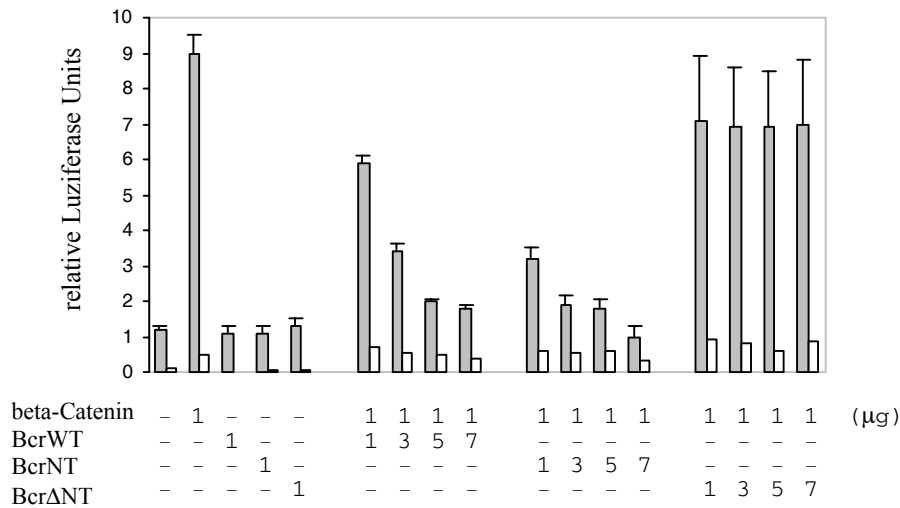


Abb. 4.20: Charakterisierung von Bcr als Inhibitor der Tcf-abhängigen Genexpression im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden TOPflash (grau; Wildtyp der Tcf-DNA-bindenden Region) oder FOPflash (weiß; Kontrolle, Mutante der Tcf-bindenden Region) transfiziert. Die Tcf-abhängige Transkription wurde durch die Transfektion von je 1 µg pDNA kodierend für beta-Catenin aktiviert. Unter beta-Catenin-induzierten Bedingungen wurden mit steigender Menge (1, 3, 5 und 7 µg) verschiedene Bcr-Plasmide kodierend für BcrWT, BcrNT und BcrΔNT transfiziert. Alle Transfektionsansätze wurden, wenn notwendig, mit pcDNA3 auf 8 µg pDNA-Gesamtmenge (kodierend für Bcr und/oder beta-Catenin) ergänzt. Zwischen den Kontrollwerten von BcrWT, BcrNT (kein beta-Catenin exprimiert) und den BcrWT-, BcrNT-Werten unter beta-Catenin induzierten Bedingungen gibt es keine signifikanten Unterschiede. Das Maximum der durch beta-Catenin induzierten Tcf-abhängigen Transkriptionsaktivierung betrug in diesem Assay 9 Luziferase Units (+/- 0,8; siehe Kontrollfeld).

Dieser Test wurde ebenfalls mit der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 durchgeführt und es konnte eine noch stärkere Reduktion der Tcf-abhängigen Genexpression durch BcrWT und BcrNT nachgewiesen werden (**Abb. 4.21**).

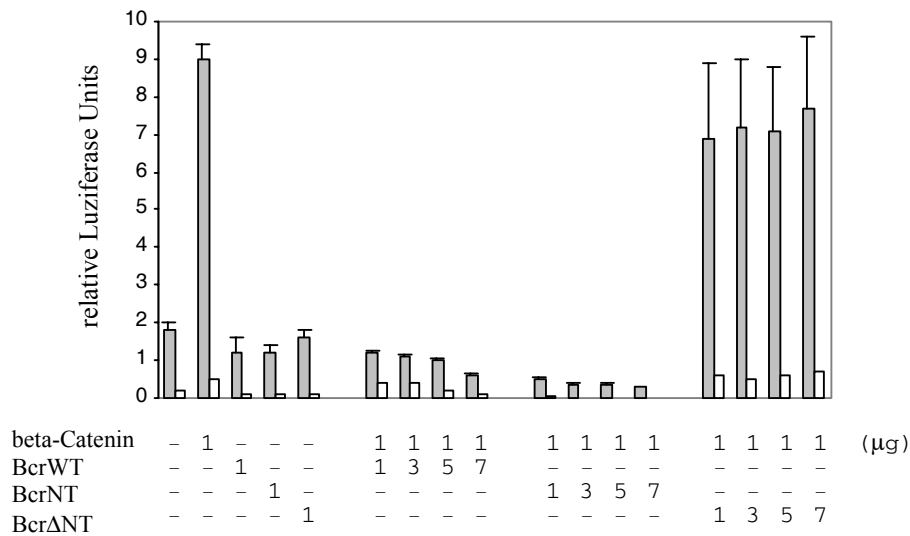


Abb. 4.21: Charakterisierung von Bcr als Inhibitor der Tcf-abhängigen Genexpression im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay in HCT116-Zellen. Der Versuch wurde wie unter Abbildung 4.20 beschrieben durchgeführt.

In den Zelllinien HEK293 und HCT116 konnte nach Induktion der Tcf-abhängigen Genexpression durch die Expression von beta-Catenin eine durch Bcr vermittelte Reduktion der Tcf-abhängigen Promotoraktivität nachgewiesen werden. Der N-Terminus von Bcr konnte als funktionelle Domäne identifiziert werden, der im Vergleich zu BcrWT die Tcf-abhängige Genexpression immer geringfügig stärker inhibiert.

Mit dem Ziel der Charakterisierung der Interaktion zwischen beta-Catenin und den Tcf-Transkriptionsfaktoren wurden von Kries J. P. Punktmutanten von beta-Catenin getestet (*Kries J. P. von., 2000*). Sie beschrieben mehrere beta-Catenin Punktmutanten, die eine reduzierte Bindung zu den Transkriptionsfaktoren Lef-1 und Tcf4 aufweisen. Die beta-Catenin(K435A)-Punktmutante zeigte eine stark reduzierte Bindung zu Lef1 und Tcf4 und eine sehr geringe Tcf-abhängige Transkriptionsaktivierung.

Beta-Catenin(K435A) wurde in dieser Arbeit verwendet, um den Einfluß von Bcr auf den beta-Catenin/Tcf-Komplex zu erklären. Eine effiziente Möglichkeit, die Tcf-abhängige Genexpression zu inhibieren, ist die Dissoziation des beta-Catenin/Tcf-Komplexes durch Blockierung der beta-Catenin Interaktionsdomäne für Tcf4. Tcf4 ist der Hauptakteur der beta-Catenin abhängigen Transkriptionsaktivierung. HEK293-Zellen wurden mit Wildtyp beta-Catenin und beta-Catenin(K435A) transfiziert (**Abb. 4.22**). Für Wildtyp beta-Catenin konnte endogenes Bcr als Interaktionspartner nachgewiesen werden. Die Punktmutante beta-Catenin(K435A) interagiert nur schwach mit endogenem Bcr. Dies bedeutet, daß Bcr wie auch Tcf4 und Lef1 dieselbe Bindedomäne auf beta-Catenin benötigen.

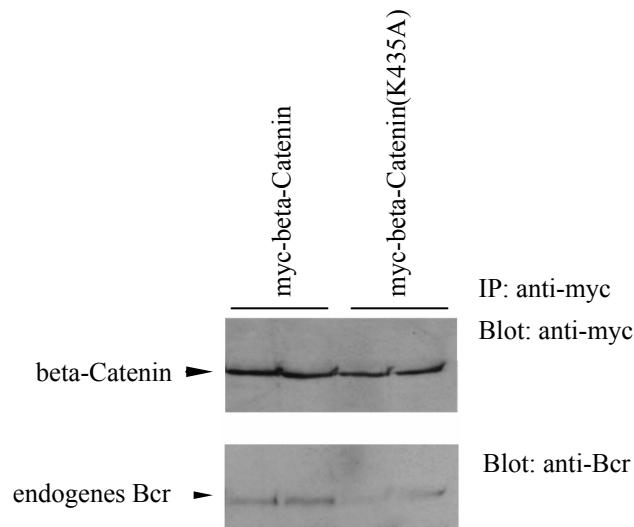


Abb. 4.22: Westernblot zum Nachweis der notwendigen beta-Catenin-Binderegion für den Bcr/beta-Catenin-Komplex. In HEK293-Zellen wurde myc-beta-Catenin bzw. myc-beta-Catenin(K435A) exprimiert. Die Lysate wurden mit anti-myc bzw. anti-Bcr Antikörpern inkubiert. Die anti-myc Immunkomplexe wurden im auf Kopräzipitation von myc-beta-Catenin Wildtyp, myc-beta-Catenin(K435) (oben) und endogenem Bcr getestet (unten) getestet. Die anti-Bcr (anti-Bcr C-20) Immunkomplexe wurden auf Kopräzipitation von Bcr getestet. Es wurden für alle vier Spuren gleiche Mengen an Bcr im DL wie in der Immunpräzipitation nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Es wurden jeweils zwei verschiedene Zelllysate aufgetragen, die mit dem identischen Konstrukt transfiziert wurden.

4.3.4 Einfluß von Bcr auf den beta-Catenin/Tcf4-Komplex

Wie in **Abbildung 4.22** (Kapitel 4.3.3) gezeigt wurde, weist Bcr eine ähnliche Binderegion für beta-Catenin auf wie die Transkriptionsfaktoren Tcf4, Tcf1 und Lef1. In dieser Arbeit wurde Bcr in seiner Möglichkeit getestet, den beta-Catenin/Tcf4 (**Abb. 4.23**) und den beta-Catenin/Tcf1-Komplex (Kapitel 4.4.1.3) zu dissoziieren und so den aktiven Transkriptionskomplex aufzuheben.

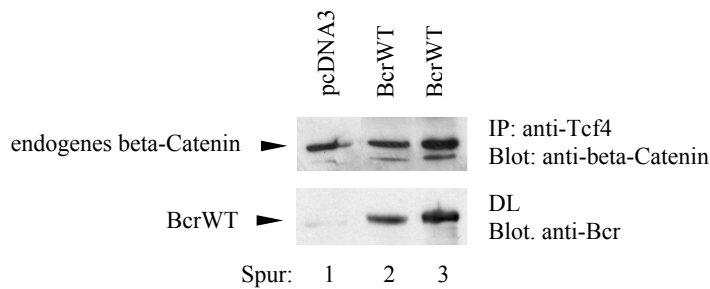


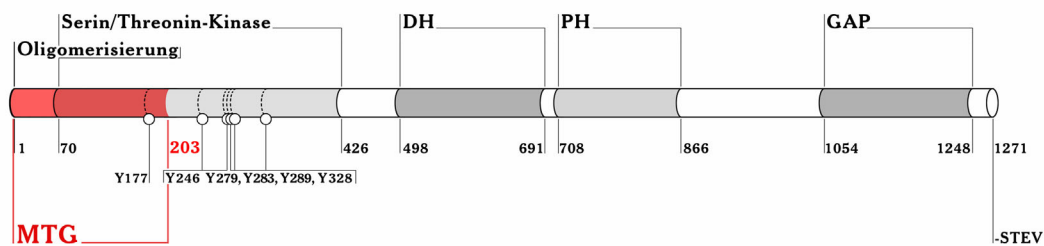
Abb. 4.23: Einfluß von Bcr auf den beta-Catenin/Tcf4-Komplex. In HEK293-Zellen wurde das Plasmid kodierend für Bcr in zunehmenden Mengen transfiziert (3 µg und 5 µg, Spur 2 und 3; DL unten). Als Kontrolle wurde pcDNA3 transfiziert (Spur 1). Die Diektlysate (DL) wurden mit anti-Tcf4 Antikörpern inkubiert und im Immunkomplex auf Kopräzipitation von beta-Catenin (oben) und Tcf4 (Daten nicht gezeigt) getestet. Im Immunkomplex anti-Tcf4 wurde in allen drei Spuren eine konstante Menge an Tcf4 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Bcr ist nach **Abbildung 4.23** nicht in der Lage den beta-Catenin/Tcf4-Komplex zu dissoziieren. Eine Modifikation der Tcf4-abhängigen Genexpression ist aber allein aufgrund der Bindung von beta-Catenin schon anzunehmen. Eine Bindung zwischen Tcf4 und Bcr konnte nicht nachgewiesen werden (Kapitel 4.4.1.2).

4.3.5 Definition der MTG-Domäne für Bcr

Der N-Terminus (1-203 AS) von Bcr konnte als Bindedomäne von beta-Catenin und regulatorische Domäne der beta-Catenin/Tcf-Komplexbildung identifiziert werden (**Abb. 4.19, 4.24**). Aufgrund dieser Daten wurde die N-terminale Region von Bcr als MTG (modulator of Tcf-dependent gene expression)-Domäne definiert.

Bcr (breakpoint cluster region)



DH: dbl-homology
 PH: pleckstrin-homology
 GAP: guanosine triphosphatase activating protein
 MTG: modulator of Tcf-dependent gene expression

Abb. 4.24: Proteindomänenstruktur von Bcr mit der neu definierten MTG (modulator of Tcf-dependent gene expression)-Domäne. Oberhalb der schematischen Darstellung sind die bisher beschriebenen Domänen von Bcr gezeigt. Die Phosphorylierung der N-terminal markierten Tyrosinreste (Y246 bis Y328) nimmt Einfluß auf die Serin/Threonin-Kinaseaktivität von Bcr. Die Phosphorylierung von Y177 ist die Voraussetzung für die Bindung von Grb2, welches auf Ras-Effektoren Einfluß nimmt. Die C-terminale Sequenz (-STEVE) ist Zielsequenz für PDZ-Domänen. Die Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurepositionen.

Um die MTG-Domäne im Vergleich zu anderen Proteinen zu charakterisieren, wurde ein Sequenzvergleich (<http://dodo.bioc.columbia.edu/predictprotein>) durchgeführt (**Abb. 4.25**). Dabei zeigte sich, daß die MTG-Domäne von Bcr eine signifikant ähnliche Sequenz zur zweiten transkriptionellen Repressordomäne von N-CoR2 (nuclear co-repressor 2) aufweist.

BcrMTG	human	1.....MVDPVGF	A	E	A	W	K	A	Q	F	P	D	S	E	P	P	R	M	E	L	R	S	V	G	D	I	E	Q	E	L	E	R	C	K	A	S	I	R	R	L	E	Q	E	V	N	Q							
N-CoR2	human	683.....KKKAPAA	A	S	E	E	A	A	F	P	P	V	V	E	D	E	E	M	E	A	S	G	V	S	G	N	E	E	E	M	V	E	E	A	E	A	L	H	A	S	G	N	E	V	P	R							
N-CoR2	maus	679.....KKKTPAA	A	S	E	E	T	A	F	P	P	A	A	E	D	E	E	M	E	A	S	G	A	S	A	N	E	E	L	A	E	E	A	E	A	S	Q	A	S	G	N	E	V	P	R								
BcrMTG	human	52...--ERFRMIYLQ	T	L	L	A	K	E	K	S	Y	D	R	Q	R	W	G	F	R	R	A	A	Q	A	P	D	G	A	S	E	P	R	A	S	A	S	R	P	Q	P	A	P											
N-CoR2	human	734...--GEC	S	I	P	S	P	H	T	E	A	K	D	T	G	Q	N	G	P	K	P	P	A	T	L	G	A	D	G	P	P	P	P	P	T	P	P	R	T	S	R	A	P	P	P								
N-CoR2	maus	730...--VG----	E	C	S	G	P	A	A	V	N	N	S	S	D	T	E	S	V	P	S	P	R	S	--	E	A	T	K	D	T	G	P	K	P	T	G	T	E	A	L	P	A	A	T								
BcrMTG	human	103.....DGAD	P	P	P	A	---	E	E	P	E	A	R	P	D	G	E	G	S	--	P	G	K	A	R	P	G	T	A	R	R	P	G	A	A		A	S	G	E	R	D	D	R	G	P	P	A					
N-CoR2	human	785.....SPSA	P	P	P	V	V	P	K	E	E	K	E	---	E	E	T	A	A	A	P	P	V	E	E	-	G	E	E	Q	K	P	P	A	A		E	E	L	A	V	D	T	G	K	A	E	E					
N-CoR2	maus	781.....QPPV	P	P	P	---	E	E	E	P	S	P	V	P	D	A	S	G	P	--	P	S	P	E	P	S	H	H	L	P	H	P	R	L	L		W	T	I	P	R	Q	R	M	P	R	S	R					
BcrMTG	human	153...S--	V	A	A	L	R	S	N	F	E	R	I	R	K	G	H	G	Q	P	G	A	D	A	E	K	P	F	Y	V	N	V	E	F	H	H	E	R	G	L	V	K	V	N	D	K	E	V	S	D	R	I	S
N-CoR2	human	835...P--	V	K	S	E	C	T	E	E	A	E	E	G	P	A	K	G	K	D	A	E	A	A	E	A	T	A	E	G	A	L	K	A	E	K	K	E	G	G	S	G	R	A	T	T	A	K	S	S	G	A	P
N-CoR2	maus	831...SLRP--	R	R	S	M	W	E	K	---	P	E	E	P	E	A	S	E	E	P	E	S	V	K	S	D	H	K	E	E	T	E	E	E	P	E	D	K	A	K	G	T	E	A	I	E							

Abb. 4.25: Sequenzvergleich zwischen der neu definierten MTG-Domäne von Bcr und der zweiten Repressordomäne von N-CoR2. Innerhalb der markierten Kernregion (schwarz, rot) besteht eine Sequenzidentität von 26,5%. Die Zahlen stehen für die entsprechende Aminosäureposition. BcrMTG: 1-203 AS, modulator of Tcf-dependent gene expression; N-CoR2 (683-886 AS): Repressordomäne.

N-CoR2 wurde als Interaktionspartner des nukleären Steroidrezeptors T₃R (thyroid hormone receptor) identifiziert. Im Komplex mit T₃R, inhibiert N-CoR2 die Transkription, vermittelt durch seine beiden Repressordomänen. Der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt (*Hörlein A. J., 1995*).

Eine Sequenzhomologie der transkriptionell inhibitorischen Domäne von Bcr mit der zweiten Repressordomäne von N-CoR2 könnte darauf hinweisen, daß ein durch diese Domänen vermittelter gemeinsamer Mechanismus zur Inhibition der Transkription existiert und die MTG-Domäne eine Klasse von transkriptionellen Repressordomänen darstellen könnte.

4.3.6 Lokalisation von Bcr und beta-Catenin in HEK293-Zellen

Bcr wurde im Kapitel 4.3.3 als Inhibitor der Tcf-abhängigen Genexpression charakterisiert. Um diesen Mechanismus genau abzuklären, wurde dessen Lokalisation in der Zelle bestimmt.

Beta-Catenin kann als Interaktionspartner von E-Cadherin an der Zellmembran, als Interaktionspartner von alpha-Catenin an Strukturen des Zytoskellets und als Regulator der Transkription im Zellkern lokalisiert sein. Für beta-Catenin wurden zahlreiche zytoplasmatische und kernlokalisierte Proteine als Interaktionspartner nachgewiesen.

Die Lokalisation von Bcr wird während der G₀- und G₁-Zellzyklusphase vor allem im Zytoplasma beschrieben. Bcr kann mit dem Eintritt in die Mitose aber auch an den Chromosomen lokalisiert sein (*Wetzler M., 1995*). In nachfolgenden Studien konnte Bcr ebenfalls während der Interphase an Heterochromatin nachgewiesen werden (*Laurent E., 2000*).

Bcr wurde in der vorliegenden Arbeit endogen im Zytoplasma, an der Zellmembran wie auch direkt im Zellkern detektiert mit einem Antikörper der gegen den N-Terminus von Bcr gerichtet ist (**Abb. 4.27**). In **Abbildung 4.26** werden Ausschnitte von Präparaten gezeigt, die transient überexprimiertes Bcr im Zytoplasma wie auch im Zellkern zeigen.

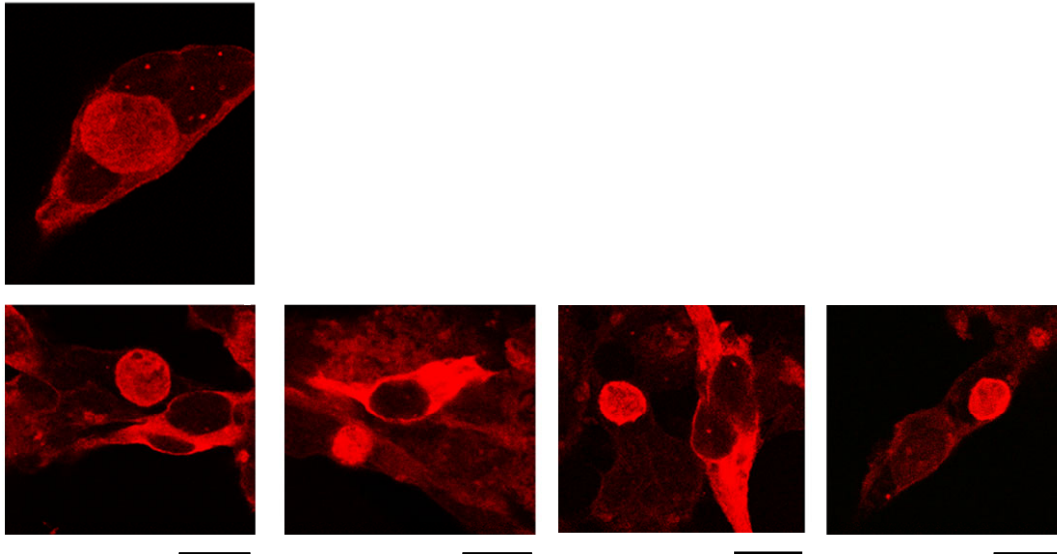


Abb. 4.26: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Lokalisation von transient überexprimierten Bcr in HEK293-Zellen. Die Detektion von Bcr erfolgte mit primären anti-Bcr (C-20) Antikörpern. Als sekundäre Antikörper wurden TRITC-konjugierte Antikörper verwendet. Es wurden gezielt Aufnahmen ausgewählt, die Bcr im Zytoplasma wie auch im Zellkern zeigen. Die Länge der schwarzen Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

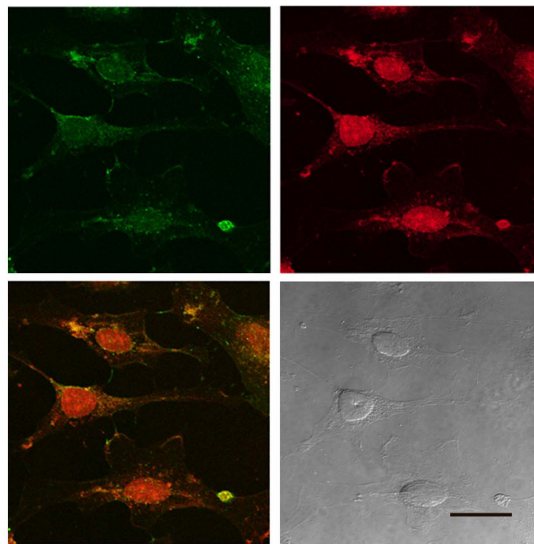


Abb. 4.27: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Lokalisation von endogenen Bcr und beta-Catenin in HEK293-Zellen. Detektion von beta-Catenin mit primären anti-beta-Catenin Antikörpern und sekundären FITC-konjugierten Antikörpern (oben, links). Detektion von Bcr mit primären anti-Bcr (N-20) Antikörpern und TRITC-konjugierten sekundären Antikörpern (oben, rechts). Überlagerung der Aufnahmen (unten, links). Die Gelbfärbung gibt einen Hinweis auf eine Kolokalisation von beta-Catenin und Bcr. DIC (different interfering contrast)-Bild (unten, rechts).

Nach diesen Resultaten kann Bcr als zytoplasmatisches wie auch nukleäres Protein beschrieben werden. Bcr kann nach Immunfluoreszenzdaten im Zytoplasma wie auch im Zellkern mit beta-Catenin kolokalisieren. Es ist daher anzunehmen, daß Bcr im Zytoplasma wie im Zellkern den beta-Catenin/Tcf-Komplex modifizieren kann.

4.3.7 Regulation der Expression von c-Myc durch Bcr in HCT116-Zellen

Nach der Definition einer neuen N-terminalen Domäne für Bcr (Kapitel 4.3.5, **Abb. 4.24**) wurden die in dieser Arbeit getesteten Bcr-Proteine BcrNT (1-203 AS) und BcrANT (168-1271 AS) in BcrMTG (MTG: modulator of Tcf-dependent gene expression) und BcrΔMTG umbenannt (**Abb. 4.28**).

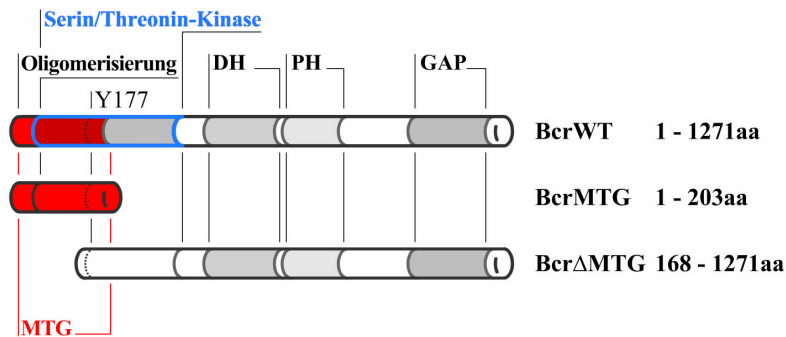


Abb. 4.28: Schematische Darstellung der verwendeten Bcr-Proteine. Zwecks Charakterisierung der in dieser Arbeit neu definierten N-terminalen MTG-Domäne von Bcr wurden die beiden Bcr-Konstrukte BcrNT und BcrANT genutzt, die an dieser Stelle als BcrMTG und BcrΔMTG eingeführt werden. Die Bcr-Proteine BcrMTG und BcrΔMTG sind Kinasetot. Nur BcrWT verfügt über eine Serin/Threonin-Kinase. MTG: modulator of Tcf-dependent gene expression, Oligomerisierung: Oligomerisierungsdomäne, DH: dbl-homology domain, PH: pleckstrin-homology domain, GAP: guanosine triphosphatase activating protein.

Um Bcr als Inhibitor der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Genexpression *in vivo* zu charakterisieren, wurden in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 die Bcr-Proteine BcrWT, BcrMTG und BcrΔMTG transient überexprimiert (**Abb. 4.29**).

HCT116-Zellen exprimieren endogen die ΔS45 beta-Catenin Mutante, die zu einem konstitutiv aktiven Tcf-Signalweg führt. Die Phosphorylierung vom Serin 45 durch die Casein-Kinase Iα/ε

ermöglicht Phosphorylierungen durch die Serin/Threonin-Kinase GSK3-beta im N-terminalen Bereich, die zum proteolytischen Abbau von beta-Catenin führen. Die Deletion vom Serin 45 stabilisiert somit beta-Catenin und kann die Tcf-abhängige Genexpression, z.B. von myc induzieren. HCT116-Zellen weisen eine starke Expression von c-Myc auf, die durch Inhibitoren der Tcf-abhängigen Genexpression reduziert werden kann.

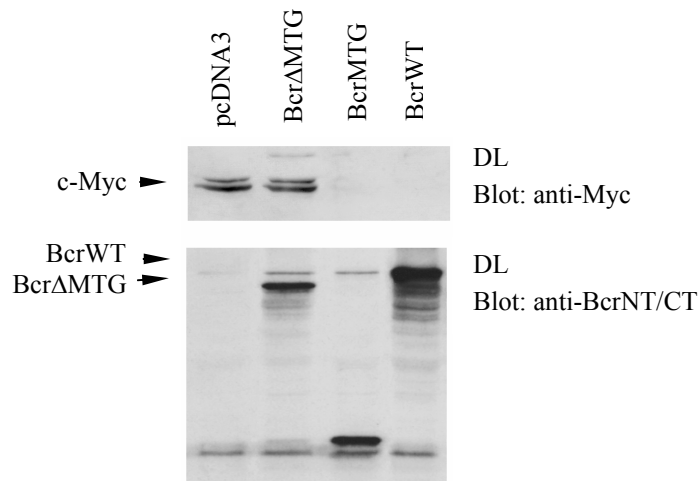


Abb. 4.29: Westernblot zum Nachweis der Reduktion der c-Myc Expression durch Bcr-Proteine in HCT116-Zellen. Die in Abbildung 4.28 dargestellten Bcr-Proteine wurden in HCT116-Zellen in ihrem Einfluß auf die induzierte c-Myc Expression in HCT116-Zellen getestet. Die Zellen wurden mit den Konstrukten BcrΔMTG, BcrMTG und BcrWT transfiziert und nach drei Tagen lysiert. Je 10^7 Zellen wurden in $400 \mu\text{l}$ lysiert von denen $20 \mu\text{l}$ auf das Gel aufgetragen wurden. Mit anti-BcrNT/CT Antikörpern wurde die Expression der Bcr-Proteine nachgewiesen (unten). Die Expression von c-Myc wurde durch anti-Myc Antikörper nachgewiesen (oben). In diesem Versuch wurden die gleichen Lysate auf zwei verschiedenen Proteingelen aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, daß Bcr in der Lage ist, die c-Myc Expression in HCT116-Zellen erheblich zu reduzieren und dies in Abhängigkeit von seiner MTG-Domäne. Das Bcr-Protein BcrΔNT hat keinen Einfluß auf die c-Myc Expression. Diese Versuche zeigen die biologische Relevanz der Tcf-abhängigen Regulation der Transkription durch Bcr und seiner neu definierten MTG-Domäne.

4.3.8 Reduktion der Expression von Bcr durch siRNA in HEK293-Zellen

Um den Einfluß von Bcr auf Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges *in vivo* zu untersuchen, wurde die Proteinexpression von Bcr in HEK293-Zellen mittels siRNA reduziert (**Abb. 4.30**). Nach Reduktion der Proteinexpression von Bcr konnte eine deutliche c-Myc Expression nachgewiesen werden. HEK293-Zellen weisen einen normal regulierten Wnt-Signaltransduktionsweg auf.

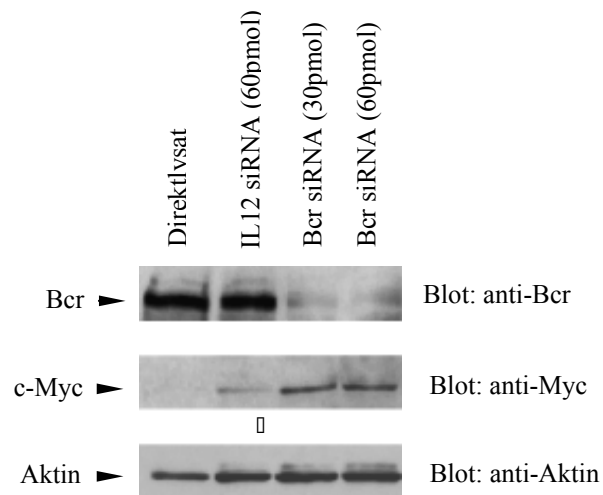


Abb. 4.30: Westernblot zum Nachweis der reduzierten Expression von Bcr in HEK293-Zellen durch siRNA. HEK293-Zellen wurden mit siRNA spezifisch für Bcr und IL12 transfiziert. Die siRNA wurde in den Konzentrationen 30 und 60 pmol eingesetzt. Als Kontrolle wurde Direktlysat aufgetragen. Die Expression von Bcr und Myc wurde mit anti-Bcr Antikörpern (N-20) und anti-Myc Antikörpern im Immunblot nachgewiesen werden. Als interne Kontrolle wurde die Expressionsmenge von Aktin verglichen.

Myc ist ein Zielgen vom Wnt-Signaltransduktionsweg und wichtiger Regulator des Bcr-Abl Phänotyps (*Tauchi T., 1995; Sawyers C. L., 1992*). CML-Patienten, bei denen die Expression von Bcr-Abl nachgewiesen wurde, exprimieren Bcr sehr schwach. Die geringe Expression von Bcr kann somit entscheidend an der starken c-Myc Expression Bcr-Abl exprimierender Zellen beteiligt sein.

4.3.9 Onkogenes Fusionsprotein Bcr-Abl: Interaktionspartner von beta-Catenin?

Im Kapitel 4.3.3 wurde Bcr als Inhibitor der Tcf-abhängigen Transkription charakterisiert. Patienten mit CML exprimieren zu über 90% das Fusionsprotein Bcr-Abl. Bcr wird in solchen Zellen sehr schwach exprimiert. Somit liegt ein Defizit an Bcr-vermittelter Repression des Tcf-Signalweges vor und Onkogene, wie sie für den Wnt-Signaltransduktionsweg beschrieben werden, könnten stärker exprimiert werden.

Die Tcf-abhängige Regulation der Transkription wird durch die MTG-Domäne von Bcr reguliert, die ebenfalls auf dem Bcr-Abl Fusionsprotein zu finden ist. Mit dem Ziel, eine eventuelle Interaktion von Bcr-Abl mit beta-Catenin abzuklären, wurde beta-Catenin als Interaktionspartner von Bcr-Abl getestet. Bcr-Abl bindet kein (**Abb. 4.31**) bzw. nur sehr schwach beta-Catenin (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, daß Bcr-Abl die beta-Catenin-abhängige Repression der Tcf-abhängigen Genexpression durch Bcr nicht kompensieren kann. Die Bedeutung einer schwachen Interaktion von Bcr-Abl und beta-Catenin ist sicher zu vernachlässigen, da das Fusionsprotein Bcr-Abl sehr schwach exprimiert wird (*Dhut S., 1988*) und nur im Zytoplasma, nicht aber im Zellkern lokalisiert ist.

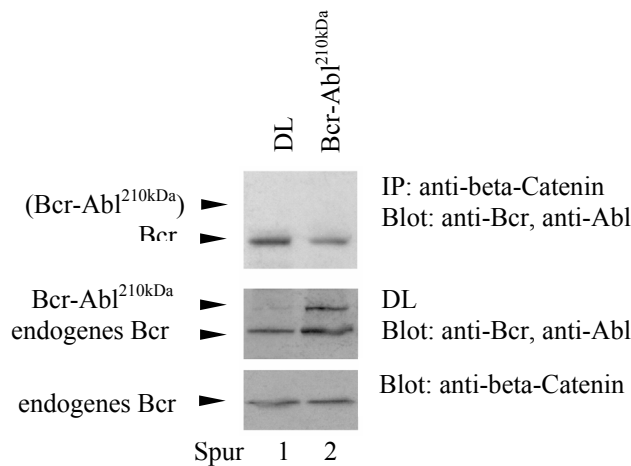


Abb. 4.31: Westernblot zum Test einer eventuellen Interaktion zwischen beta-Catenin und Bcr-Abl. In HEK293-Zellen wurde Bcr-Abl^{210kDa} exprimiert und die Lysate mit anti-beta-Catenin Antikörpern inkubiert. Die anti-beta-Catenin Immunkomplexe wurden auf Kopräzipitation von endogenen beta-Catenin, Bcr (anti-Bcr N-20) und Bcr-Abl getestet. Im Immunkomplex anti-beta-Catenin wurde in allen drei Spuren eine konstante Menge an beta-Catenin nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). In Direktlysaten (DL) (mitte, unten) wurde die Expression von endogenem Bcr (Spur 1 und 2) und transient überexprimierten Bcr-Abl (Spur 2) nachgewiesen.

4.4 Bcr: multipler Inhibitor der Zielgene vom Wnt-Signalsignaltransduktionsweg in Tcf1 exprimierenden Zellen

Bcr wurde in den vorangegangenen Kapiteln als Interaktionspartner von beta-Catenin und als Inhibitor der aktivierten beta-Catenin/Tcf-abhängigen Genexpression beschrieben. Dies geschieht durch Modifikation des beta-Catenin/Tcf-Komplexes. In diesem Kapitel wird die Interaktion zwischen Bcr und Tcf1 nachgewiesen und der Einfluß von Bcr auf den Tcf1/beta-Catenin-Komplex untersucht. Tcf1 wird im Gegensatz zu Tcf4 als Inhibitor der Genexpression des Wnt-Signalsignaltransduktionsweges beschrieben und dies obwohl beide Transkriptionsfaktoren über die gleichen Proteindomänen verfügen wie eine beta-Catenin-Bindedomäne. Die Dissoziation des beta-Catenin/Tcf1-Komplexes und eine Modifikation der beta-Catenin-Bindedomäne auf Tcf1 durch Bcr, könnte zu einem erheblich besseren Verständnis von Tcf1 als Inhibitor der aktivierten Tcf-abhängigen Genexpression beitragen.

4.4.1 Bcr: Proteininteraktionspartner von Tcf1, Repressor der beta-Catenin/Tcf4-abhängigen Genexpression

4.4.1.1 Spezifische Expression von Tcf1

Tcf1 wurde ursprünglich als T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor identifiziert. Mittlerweile konnte aber die Expression von Tcf1 auch in anderen Zelllinien wie Tumorzelllinien und Vorläuferzellen der B-Zellen nachgewiesen werden. Mit dem Ziel eine Zelllinie zu finden, die gut transfizierbar ist und eine deutliche Tcf1 Expression aufweist, testete ich Lysate verschiedener adhärenter Zelllinien auf eine Tcf1-Expression (**Abb. 4.32**). HEK293T-Zellen exprimieren deutlich nachweisbar Tcf1.

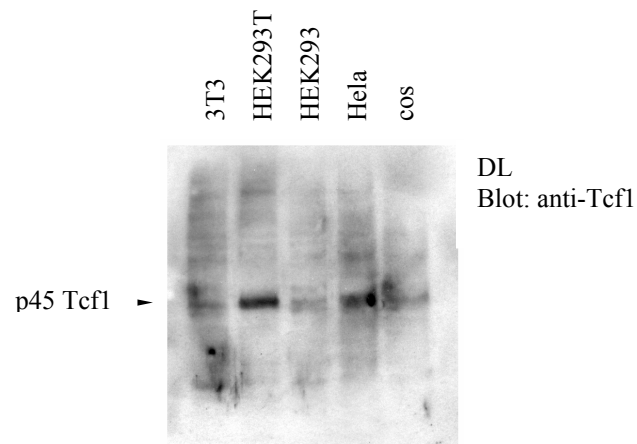


Abb. 4.32: Westernblot zum Test der Expression von Tcf1. Die Direktlysate der verschiedenen Zelllinien 3T3-, HEK293T-, HEK293-, HeLa- und cos-Zellen wurden im Immunblot auf Expression von Tcf1 getestet. Es sind jeweils ca. 2×10^7 Zellen in 400 μ l Lysepuffer lysiert worden von denen 20 μ l auf das Proteingel aufgetragen wurden. Mit einem spezifischen Antikörper für Tcf1 wurde im Blot die Expression von Tcf1 getestet.

4.4.1.2 Endogene Interaktion zwischen Bcr und Tcf1 in HEK293T-Zellen

Um Bcr als Modulator der Tcf-abhängigen Genexpression exakt zu beschreiben, wurde eine eventuelle Bindung zu den Transkriptionsfaktoren Tcf4 und Tcf1 getestet. In HEK293T-Zellen konnte die endogene Interaktion zwischen Tcf1 und Bcr nachgewiesen werden (**Abb. 4.33**), wohingegen Bcr nicht an Tcf4 bindet (**Abb. 4.3.3, 4.34**).

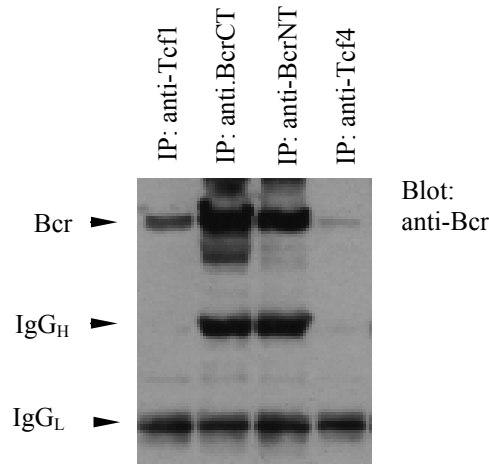


Abb. 4.33: Westernblot zum Nachweis der endogenen Interaktion zwischen Tcf1 und Bcr. HEK293T-Zellen wurden lysiert und die Lysate mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Die Immunkomplexe wurden im Immunblot auf Kopräzipitation von Bcr getestet. Als Kontrolle wurde ein für Tcf1 unspezifische Antikörper (anti-Tcf4) verwendet.

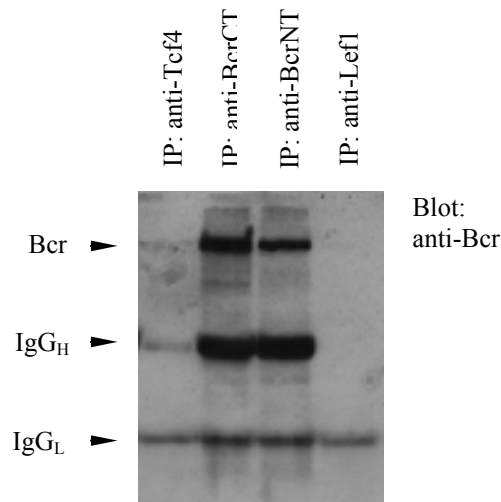


Abb. 4.34: Westernblot zum Test der Interaktion zwischen Tcf4 und Bcr. Die HEK293T-Zellen wurden lysiert und die Lysate mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Die Immunkomplexe wurden im Immunblot auf Kopräzipitation von Bcr getestet. Als Kontrolle wurde ein für Tcf4 unspezifischer Antikörper eingesetzt (anti-Lef1).

Bcr konnte als Interaktionspartner von Tcf1 identifiziert werden, einem Inhibitor der Tcf4-abhängigen Genexpression Wnt-Signaltransduktionsweges.

4.4.1.3 Regulation des beta-Catenin/Tcf1-Komplexes durch Bcr

Im Kapitel 4.3.3 (Abb. 4.22) wurde gezeigt, daß Bcr, Tcf4 und Lef1 eine ähnliche Binderegion auf beta-Catenin benötigen und somit Bcr diese Transkriptionsfaktoren verdrängen bzw. den beta-Catenin/Tcf-Komplex modifizieren könnte. Wie im Kapitel 4.4.1.2 gezeigt, interagiert Bcr mit Tcf1 (Abb. 4.33). Nachfolgend wurde nun ebenfalls der Einfluß von Bcr auf den beta-Catenin/Tcf1-Komplex untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Bcr Tcf1 von beta-Catenin verdrängen kann (Abb. 4.35, 4.36). Mit zunehmender Expression von Bcr Wildtyp wird der beta-Catenin/Tcf1-Komplex entsprechend zunehmend dissoziiert. Der N-Terminus von Bcr tut dies effizienter als Bcr Wildtyp. Dieser Effekt war zu erwarten, da der N-Terminus (MTG-Domäne) von Bcr stärker an beta-Catenin bindet als Bcr Wildtyp (Abb. 4.19) und die Tcf-abhängige Genexpression effizienter inhibiert (Abb. 4.20, 4.21). Bcr Δ NT ist nicht in der Lage, den beta-Catenin/Tcf1-Komplex zu dissoziieren (Abb. 4.36).

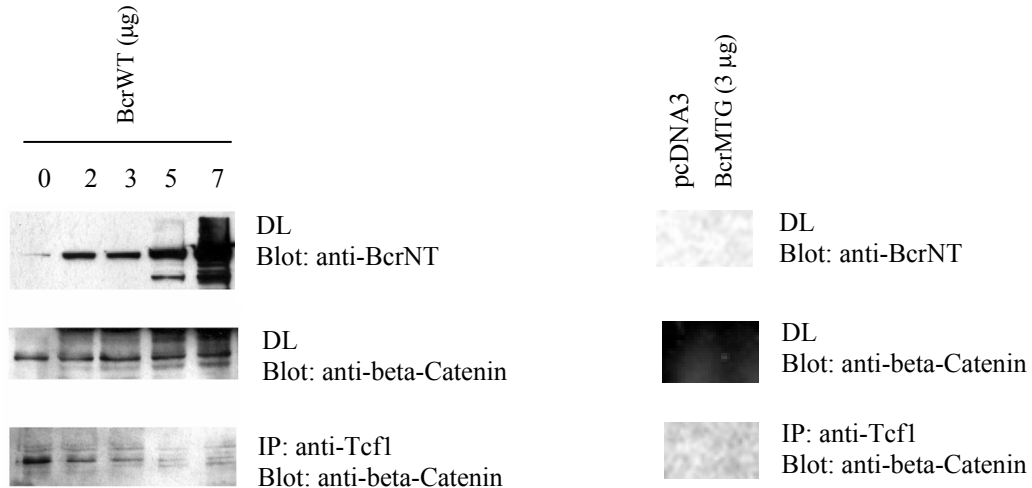


Abb. 4.35: Einfluß von Bcr Wildtyp und seines N-Terminus (MTG-Domäne) auf den beta-Catenin/Tcf1-Komplex. In HEK293-Zellen wurde ein für BcrWT kodierendes Plasmid in zunehmenden Mengen transfiziert (2, 3, 5 und 7 µg) (linke Abbildungen) und ein für BcrMTG kodierendes Plasmid (3 µg) (rechte Abbildungen). Die Lysate wurden mit anti-Tcf1 Antikörpern inkubiert. Die anti-Tcf1 Immunkomplexe wurden auf Kopräzipitation von endogenem beta-Catenin (unten) und Tcf1 getestet. Im Immunkomplex anti-Tcf1 wurden für beide Versuche gleiche Mengen an Tcf1 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Mittels Direktysat (DL) wurde die Expression von transient überexprimierten Bcr-Proteinen (oben) und endogenem beta-Catenin (Mitte) nachgewiesen.

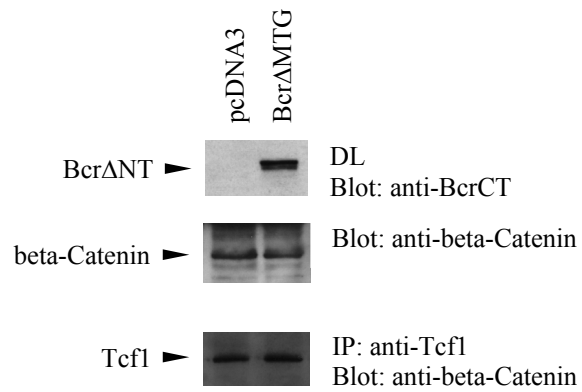


Abb. 4.36: BcrΔNT und der beta-Catenin/Tcf1-Komplex. In HEK293-Zellen wurde ein Plasmid transfiziert (3 μ g) das für BcrΔNT kodiert. Die Lysate wurden mit anti-Tcf1 inkubiert. Die anti-Tcf1 Immunkomplexe wurden auf Kopräzipitation von endogenem beta-Catenin und Tcf1 getestet. Im Immunkomplex anti-Tcf1 wurden für beide Versuche gleiche Mengen an Tcf1 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Mittels Direktlysa (DL) wurde die Expression von transient überexprimierten BcrMTG und endogenem beta-Catenin nachgewiesen.

Dieser Effekt wurden ebenfalls mit transient überexprimierten Bcr Wildtyp und Tcf1 in HEK293-Zellen nachgewiesen (**Abb. 4.37**)

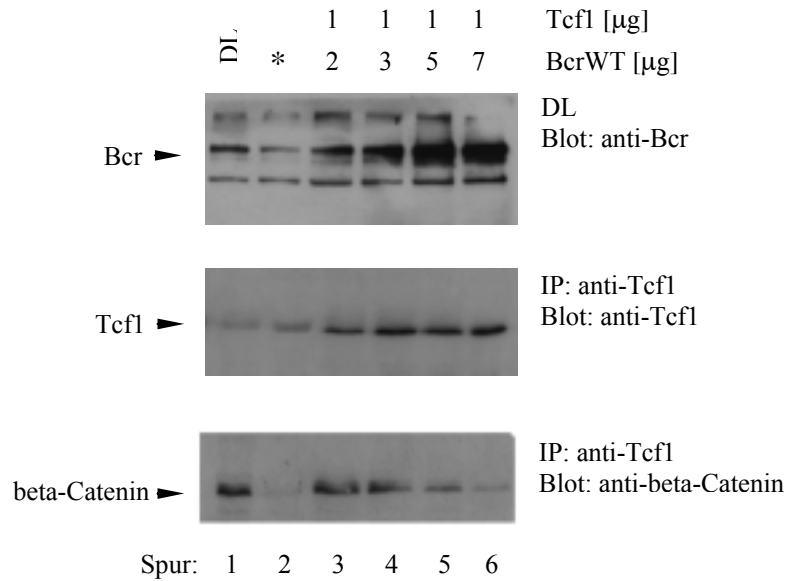


Abb. 4.37.: Regulation des Tcf1/beta-Catenin-Komplexes durch Bcr in HEK293-Zellen. In HEK293T-Zellen wurde ein für BcrWT kodierendes Plasmid in zunehmenden Mengen transfiziert (2, 3, 5 und 7 μ g). Die Lysate wurden mit anti-Tcf1 und beta-Catenin Antikörpern inkubiert. Die anti-Tcf1 Immunkomplexe wurden auf Kopräzipitation von endogenen beta-Catenin und Tcf1 getestet. In Direktlysaten wurde die Expression von endogenen und transient überexprimierten Bcr nachgewiesen (oben) wie auch von endogenen beta-Catenin (Daten nicht gezeigt). * ca. 1/10 der DL-Menge von Spur 1 (Geltasche defekt).

Diese Resultaten deuten einen multiplen Inhibitor-Mechanismus der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Genexpression durch Bcr an. Bcr blockiert die Bindung von Tcf1 an beta-Catenin und bindet selbst an Tcf1, einen Transkriptionsfaktor der als Repressor der beta-Catenin/Tcf4-abhängigen Genexpression beschrieben ist. Momentan laufende Experimente werden abklären, inwiefern Bcr durch seine Bindung an Tcf1 die beta-Catenin/Tcf1-Komplexbildung modifiziert.

4.4.1.4 IGF-abhängige Regulation des Tcf1/Bcr-Komplexes

IGF (insulin-like factor) induziert den Wnt-Signaltransduktionsweg. Die IGF-abhängige Stimulation führt zur Tyrosin-Phosphorylierung von beta-Catenin, welches dann von E-Cadherin dissoziiert (*Playford M. P., 2000*). Die Dissoziation des beta-Catenin/E-Cadherin-Komplexes führt zur Aufhebung der epithelialen Zell-Zelladhäsion. Weiterhin führt die IGF-Stimulation zu einer Stabilität von beta-Catenin und damit zu einer Aktivierung der beta-Catenin/Tcf-abhängigen Genexpression.

Um Bcr in seinem Verhalten als Interaktionspartner von Tcf1 unter beta-Catenin-induzierten und nicht induzierten Bedingungen zu testen, wurde in HEK293T-Zellen in einem Vorversuch unter IGF-induzierten im Vergleich zu nicht induzierten Bedingungen diese Komplexbildung charakterisiert (**Abb. 4.38**).

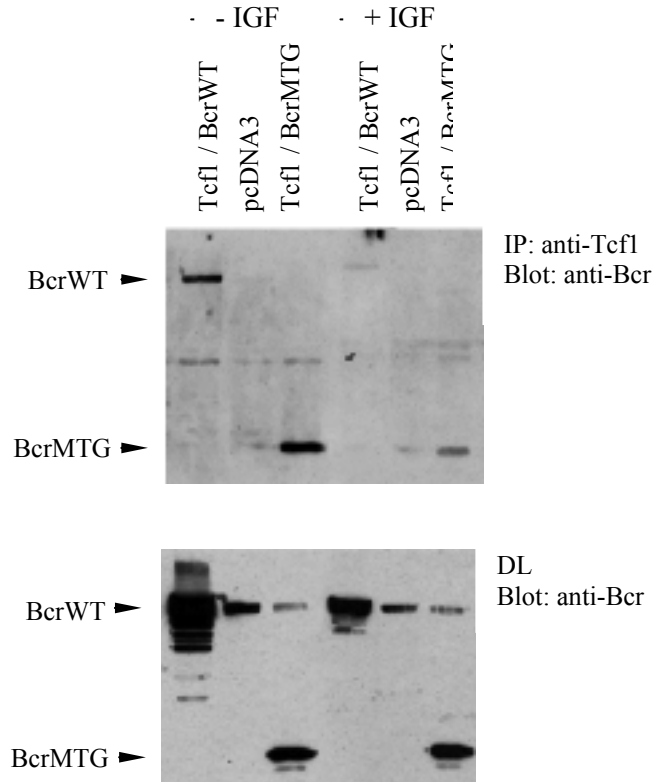


Abb. 4.38: Regulation der Tcf1/Bcr-Komplexbildung durch IGF in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden die Bcr-Proteinkonstrukte BcrWT und BcrMTG exprimiert und zur Kontrolle pcDNA3 transfiziert. Die Direktlysate (DL) wurden mit anti-Tcf1 Antikörpern inkubiert. Die Immunkomplexe wurden im Immunblot auf Kopräzipitation von Bcr-Proteinen getestet. Vor der Lyse wurden die Zellen 4 h gehungert und anschließend 20 Min. mit Medium mit FCS gehalten bzw. mit IGF stimuliert Die Expression der Bcr-Proteine wurde durch Analyse der Lysate nachgewiesen. Spur 2 und 5 der Lysate zeigen aufgrund defekter Slots exprimiertes Bcr Wildtyp wie Spur 1 und 4.

Die Expression von Bcr Δ NT konnte nicht nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Induktion der Tcf-abhängigen Genexpression zur Dissoziation des Tcf1/beta-Catenin-Komplexes führt. Tcf1 wie Bcr (in dieser Arbeit) wurden als Inhibitoren für den Wnt-Signaltransduktionsweg beschrieben. Das Vorliegen des Bcr/Tcf1-Komplexes unter nicht stimulierten Bedingungen (-IGF) deutet darauf hin, daß Bcr als Inhibitor der Tcf1 vermittelten Transkription in ruhenden Zellen fungieren könnte.