

Neue Mechanismen der Regulation von Conductin im Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Asbrand

angefertigt am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin
in der Arbeitsgruppe von Prof.Dr. Walter Birchmeier

Berlin, im April 2002

Gutachter: Prof. Dr. Walter Birchmeier
Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

Disputation am 11.07.2002.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Das Wnt-Netzwerk	4
1.2. Der Verlauf des β-Catenin-Signals	5
1.2.1. Liganden und Rezeptoren	6
1.2.2. β -Catenin in Entwicklung und Tumorigenese	7
1.2.3. Die HMG-Box Transkriptionsfaktoren	8
1.3. Der Conductin/Axin-Komplex	9
1.3.1. Conductin / Axin	9
1.3.2. APC	13
1.3.3. Phosphorylierung von Conductin/Axin und APC	15
1.4. Die Phosphorylierung von β-Catenin	16
1.4.1. Glycogen Synthase Kinase 3 β	16
1.4.2. Casein Kinase I	17
1.5. Die Inaktivierung des Conductin/Axin-Komplexes	19
1.5.1. Dishevelled	19
1.5.2. Frat-1 / GBP	20
1.6. Zielsetzung	22
2. Ergebnisse	23
2.1. Conductin	23
2.1.1. Conductin reprimiert die β -Catenin-abhängige Transkription	23
2.1.2. Funktionelle Charakterisierung der Domänenstruktur von Conductin	24
2.2. Interaktionspartner von Conductin: I-mf	27
2.2.1. Analyse der I-mf α -Bindung an Conductin	27
2.2.2. Einfluss von I-mf α auf die Conductin-gebundene GSK3 β	29
2.2.3. Weitere Interaktionspartner von I-mf α	30
2.2.4. Funktionelle Charakterisierung	32
2.3. Interaktionspartner von Conductin: Diversin	36
2.3.1. Frat-1 und Diversin synergieren bei der Aktivierung von β -Catenin	36
2.3.2. Einengung der Diversin-Bindestelle an Conductin	39
2.3.3. Einfluss von Diversin auf Conductin-gebundene GSK3 β	40
2.3.4. Indirekte Interaktion von Diversin mit GSK3 β über Conductin	41

2.3.5. Die Synergie von Diversin und Frat-1 ist abhängig von Conductin	42
2.3.6. Einfluss der DIX-Domäne auf die Synergie von Diversin und Frat-1	44
2.3.7. Dimerisierungseigenschaften von Conductin	46
2.3.8. Das Diversin-verwandte Protein Diego synergisiert nicht mit Frat-1	48
3. Diskussion	50
3.1. Conductin/Axin	50
3.1.1. Die Domänenstruktur von Conductin	50
3.2. I-mf	53
3.2.1. Mechanismus der I-mf Wirkung	53
3.2.2. I-mf und β -Catenin-abhängige Transkription	54
3.2.3. Die mögliche Bedeutung von I-mf <i>in vivo</i>	55
3.3. Diversin	57
3.3.1. Auswirkungen von Diversin und Frat-1 auf GSK3 β	57
3.3.2. Die Rolle Conductins bei der Synergie von Diversin und Frat-1	58
3.3.3. Die Bedeutung der DIX-Domäne von Conductin	59
3.3.4. Der Mechanismus der Synergie von Diversin und Frat-1	61
3.3.5. Diversin und Frat stellen ein evolutionär junges Synergiesystem dar	63
3.3.6. Diversin: Regulator der Frat-Aktivität	64
3.3.7. Diversin bildet eine Schaltstation im Wnt-Netzwerk	65
3.3.8. Ausblick	67
4. Material & Methoden	69
4.1. Material	69
4.2. Methoden	70
4.2.1. Standardmethoden	70
4.2.2. Hefe-2-Hybrid System	71
4.2.3. Reporterassays	72
4.2.4. Immunpräzipitation und Immunoblot	74
4.2.5. <i>Xenopus</i> Injektionen	75
4.2.6. RNA-Präparation aus <i>Drosophila</i> und RT-PCR	76
4.2.7. Klonierungen	76
4.2.8. Abkürzungen	78
5. Literaturverzeichnis	79
6. Anhang	94

Zusammenfassung

Der evolutionär stark konservierte Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg reguliert eine Vielzahl essenzieller biologischer Prozesse. Aberrante Aktivierung des Signalwegs führt zur Entstehung von Tumoren. Das zentrale Effektormolekül β -Catenin wird daher streng durch Proteolyse reguliert. Den kontinuierlichen proteosomalen Abbau und die dafür notwendige Phosphorylierung von β -Catenin gewährleistet ein zytoplasmatischer Multiproteinkomplex, dessen Rückgrat von den Gerüstproteinen Conductin oder Axin gebildet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems neue Interaktionspartner von Conductin als potentielle β -Catenin-Regulatoren identifiziert und deren Wirkmechanismen charakterisiert.

Zunächst wurde der Einfluss von Conductin auf die Signalaktivität von β -Catenin untersucht. Conductin konnte in unserer Arbeitsgruppe neu identifiziert werden, und der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit ist Teil der von Behrens et al. (1998), durchgeführten funktionellen Charakterisierung. Dazu wurde ein Testsystem auf Basis eines synthetischen Wnt-Zielgens etabliert und damit die Funktion Conductins als negativer Regulator des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs nachgewiesen. Weiterhin wurde die Domänenstruktur Conductins in diesem System analysiert.

Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems konnte I-mf a als Bindungspartner von Conductin isoliert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass I-mf a auch mit dem GSK3 β -Inhibitor Frat-1 interagiert. I-mf a moduliert die Competition von Conductin und Frat-1 um die Kinase GSK3 β . Dabei unterstützt I-mf a den Verbleib der Kinase an Conductin und behindert den kompetitiven Angriff von Frat-1 auf die Conductin-gebundene GSK3 β . Die Verdrängung von GSK3 β aus dem Conductin-Komplex durch Frat-1, aber auch durch Dishevelled, wird als ein Schlüssel-Mechanismus zur Aktivierung β -Catenins angesehen. Die Befunde dieses ersten Teils etablieren eine neue Möglichkeit zur Feinregulation eines solchen Verdrängungsmechanismus.

Mit Diversin konnte in unserer Arbeitsgruppe ein weiterer Bindungspartner von Conductin identifiziert werden (Schwarz-Romond et al., 2002). Diversin ist in der Lage, die Frat-1-vermittelte Aktivierung des β -Catenin-Signals Conductin-abhängig zu potenzieren. Es konnte

gezeigt werden, dass die Bildung von ternären Komplexen aus Diversin, Conductin und GSK3 β für diesen Synergieeffekt essenziell ist. Grundlage dieser ternären Komplexe, und damit auch die der Synergie von Diversin und Frat-1, bildet die Di- oder Oligomerisierung von Conductin. Über diese Dimerisierungsfunktion hinaus ist die DIX-Domäne von Conductin für das Zustandekommen der ternären Komplexe und der Synergie von Bedeutung. Die Ergebnisse deuten auf einen neuen Mechanismus der Frat-1-Regulation im Wnt-Signalweg hin: Diversin ermöglicht eine optimale Konfiguration des Conductin-Komplexes für die Frat-1-vermittelte Verdrängung von GSK3 β und fügt so dem Wnt-Signalweg eine neue Ebene der regulativen Einflussnahme durch laterale Signale wie Frat-1 hinzu.