

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Daniela Horázná**

Kinázy rodiny CK1 a jejich úloha v signální dráze proteinu Wnt

CK1 family kinases and their role in Wnt signalling

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Marie Macůrková, Ph.D.

Praha, 2017

## Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. 8. 2017

Podpis

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat paní doktorce Marii Macůrkové za odborné vedení práce, osobní konzultace obsahu práce a konstruktivní připomínky.

# Abstrakt

Wnt signalizace je velmi důležitou drahou pro vývoj a růst buněk. V této signalizaci hraje podstatnou roli fosforylace, kterou provádí mimo jiné kasein kinázy rodiny CK1. Tato rodina u člověka obsahuje šest proteinů různých funkcí a struktur, kódovaných různými geny. Signalizační kaskáda začíná vazbou molekuly Wnt na receptory cílové buňky. Tím je zahájen složitý řetězec navazujících a vzájemně se ovlivňujících reakcí, poháněný a zároveň inhibovaný aktivitou CK1 kináz. Každá kináza má v této signalizaci jinou funkci, ale jejich funkce se mohou překrývat. Za určitých podmínek mohou některé změnit své chování z aktivačního na inhibiční. Tato práce se pokouší rozebrat CK1 členy jednotlivě a ukazuje jejich úlohy ve Wnt signalizaci podle nejnovějších vědeckých poznatků.

Wnt signaling is very important pathway for cell development and growth. The critical aspect of the signaling is phosphorylation which is performed, among others, by casein kinases from the CK1 family. In human there are six proteins in this family with different structures and functions coded by several distinct genes. The signaling cascade starts with coupling of a Wnt molecule to target cell receptors. This initiates complicated process of subsequent and mutually affected reactions. This process is driven and also inhibited by the activity of CK1 kinases. Each kinase plays a specific role in the signaling, however their functions may overlap. Under certain conditions, some kinases can change their behavior from activating to inhibitory. This thesis characterizes CK1 members separately and depicts their tasks in the Wnt signaling according to the latest academic papers.

# Obsah

Úvod.....	1
Kasein kinázy 1.....	2
Struktura .....	2
Substrátová specifita a funkce.....	3
CK1 $\alpha$ .....	6
Struktura a vlastnosti.....	6
Funkce .....	6
CK1 $\gamma$ .....	9
Struktura a vlastnosti.....	9
Funkce.....	9
CK1 $\delta$ .....	11
Struktura a vlastnosti.....	11
Funkce .....	11
CK1 $\epsilon$ .....	12
Funkce.....	12
Kasein kinázy 1 ve Wnt dráze .....	13
Regulace bez přítomnosti Wnt.....	13
Regulace za přítomnosti Wnt.....	13
Formace receptorového komplexu.....	13
Formace signalozomu.....	14
Přitažení destrukčního komplexu.....	15
Oddělení do endosomu.....	15
Oddělení komplexu p120-kateninu a CK1 $\epsilon$ .....	16
Závěr .....	17
Bibliografie .....	18

# Úvod

Wingless/Int-1 (zkráceně Wnt) kanonická signalizace je jedna ze základních drah řídicích proliferaci buněk v těle. Hraje důležitou roli v raném embryonálním vývoji nebo při nádorovém bujení. Dále kontroluje například formování tělních os, určování buněčného osudu, proliferaci nebo migraci buněk.

Kanonická Wnt dráha je tvořena proteiny, které se vzájemně ovlivňují, aby pak v konečném důsledku mohlo dojít k expresi Wnt řízených genů. Molekula Wnt je syntetizována a sekretována ze signalizační buňky a k cílové buňce přistupuje extracelulárně. Na cytoplasmatické membráně cílové buňky se váže na dva receptory Frizzled (Fz) a lipoprotein receptor-related protein 5 nebo jeho blízkce příbuzný LRP6 (dále jen LRP5/6), se kterými vytvoří komplex. Po vazbě Wnt se na tento signalizační komplex intracelulárně váže protein Dishevelled (Dvl), polymeruje a spojuje receptorové komplexy k sobě za tvorby signalozomu. Fosforylace LRP5/6 kinázami GSK-3 $\beta$  a CK1 $\gamma$  přitáhne na membránu protein Axin a s ním degradační komplex. Degradační komplex při nepřítomnosti Wnt signálu fosforyluje  $\beta$ -katenin a směřuje ho tím k degradaci. Vazbou na LRP je ale deaktivován,  $\beta$ -katenin je stabilní, hromadí se v buňce a proniká do jádra, kde se váže na T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) a aktivuje transkripci cílových genů Wnt signalizace.

Signalizace v buňce probíhá přes modifikace proteinů, jednou z těchto modifikací je fosforylace, kterou zajišťují proteiny – kinázy. Ve Wnt signalizaci jsou velmi důležité kasein kinázy z rodiny CK1. Jedná se o kinázy, které mohou fosforylovat široké spektrum substrátů a tím se účastnit různých dějů. Kromě Wnt signalizace zasahují také například do řízení dráhy proteinu Hedgehog, membránového transportu, udržování cytoskeletu, cirkadiálních rytmů, oprav DNA nebo její transkripce.

Do rodiny CK1 patří několik kináz, z nichž většina je zapojena do Wnt dráhy. První z kináz, se kterou se ve Wnt dráze setkáváme je CK1 $\epsilon$ , která je trvale navázána na LRP5/6 a aktivuje Dvl. Další kinázou z rodiny je CK1 $\gamma$ , ta fosforyluje koreceptor LRP5/6 a umožňuje tak jeho vazbu přes protein Dvl s receptorem Fz. CK1 $\alpha$  se pak nachází v degradačním komplexu a působí na Wnt dráhu antagonisticky fosforylací  $\beta$ -kateninu vedoucí k jeho degradaci. CK1 $\delta$  se funkčně i strukturně značně překrývá s CK1 $\epsilon$  (Cheong and Virshup, 2011; Del Valle-Pérez *et al.*, 2011a; Cruciat, 2014).

# Kasein kinázy 1

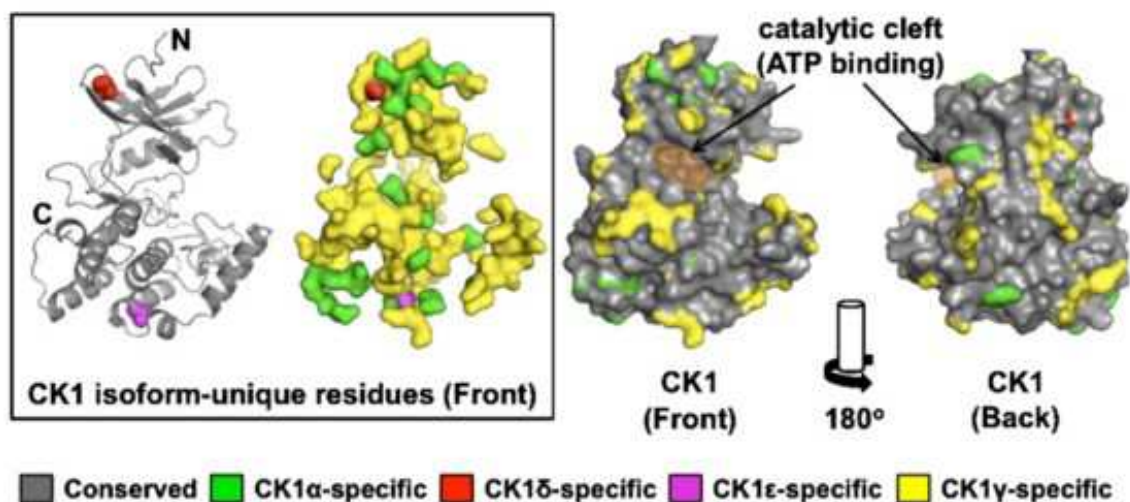
V sedmdesátých letech, při zkoumání AMP (adenosin monofosfát) dependentních kináz, byly objeveny kinázy nezávislé na této molekule. Jejich objev způsobil velký rozmach v oblasti zkoumání kináz a fosfatáz. Nově objevené kinázy za přítomnosti fosfátového donoru ve formě molekuly ATP (adenosin trifosfát) nebo GTP (guanosin trifosfát) fosforylovaly preferenčně kasein na rozdíl od fosvitinu, proteinu používaného pro zkoumání fosforylace. Protože jejich metabolická funkce nebyla ještě známa, dostaly název kasein kináza 1 a kasein kináza 2 (Kumar and Tao, 1975).

Později se zjistilo, že tyto kinázy jsou konzervovány napříč eukaryoty od kvasinek až po člověka. U člověka bylo nalezeno šest kináz patřících do rodiny CK1 ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  a  $\gamma 3$ ) a další sestřihové varianty CK1 $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  a  $\gamma 3$ . Někdy jsou kinázy této rodiny nazývány isoformami, přestože jsou kódovány rozdílnými geny. Existuje i CK1 $\beta$ , ta byla ale zatím nalezena pouze u skota, proto se jí v této práci zabývat nebudeme (Schitteck and Sinnberg, 2014).

## Struktura

Kasein kinázy jsou serin/threoninové kinázy, využívající hydroxidovou skupinu k připojení fosfátu na serin nebo threonin. V některých případech se ukázalo, že jsou schopné za specifických podmínek fosforylovat i tyrosin (Pulgar *et al.*, 1996).

Rodina CK1 vykazuje nejvyšší homologii v kinázové doméně. Tato doména se vyznačuje malým N-koncovým lalokem, větší C-koncovou kapsou a katalytickou štěrbinou, kam se váže substrát a ATP (Prostorový model viz obr. 1). V rámci CK1 rodiny se kinázová doména sekvenčně shoduje minimálně z 50 % zatímco s ostatními Ser/Thr kinázami jen v 21 % a méně. Od ostatních kináz se liší v subdoméně VIII, kde chybí Asp-Phe-Gly motiv pro ostatní kinázy typický (Gross and Anderson, 1998). Největší rozdíly v rodině CK1 kináz lze nalézt v C-koncové doméně, jejíž délka se může pohybovat od 24 až po 200 aminokyselin (AK) různých sekvencí. C-koncová doména tak určuje z části specifitu a zajišťuje regulaci aktivity těchto kináz. Příkladem může být CK1 $\delta$  a CK1 $\epsilon$ , které se v katalytické doméně shodují z 98 %, ale na C-konci je homologie pouze 53 % (Fish *et al.*, 1995). Také délka nekatalytické N-koncové domény se může pohybovat v rozmezí 9-76 aminokyselin. Celková velikost kináz se pohybuje od 37 pro CK1 $\alpha$  do 51 kD pro CK1 $\gamma 3$  (Schitteck and Sinnberg, 2014).



Obr. 1. Terciální struktura CK1 $\delta$  bez variabilního C-konce vytvořená v PyMolu. Obrázek nejvíce vlevo zobrazuje uspořádání sekundárních struktur kinázové domény, kterou tvoří dva laloky. Na N-konci převažují  $\beta$ -listy, na C-konci  $\alpha$ -helixy. Na ostatních třech obrázcích jsou zobrazeny barevně struktury specifické pro jednotlivé kinázy a šedě konzervované sekvence. Hnědá vyznačuje vazebné místo pro ATP (převzato z Cheong and Virshup, 2011)

## Substrátová specifita a funkce

Kasein kinázy jsou obvykle pozitivně nabitě s isoelektrickým bodem vyšším než 9, proto preferují kyselé substráty. Nejčastěji rozpoznávané aminokyseliny jsou ty s kyselými zbytky v pozici n-3 jako například D-X-X-S/T. Nejvyšší afinitu mají pro motiv s připojeným fosfátem, například pS/pT-X-X-S/T, kde p značí fosforylovanou AK (serin nebo threonin), X jakoukoliv a podtržení je cílová aminokyselina, která bude fosforylována. (Cheong and Virshup, 2011).

Ačkoliv fosfát je nejčastěji rozpoznávanou molekulou, není pro reakci nezbytný. Některé substráty totiž neobsahují kyselou ani fosforylovanou AK v pozici n-3 od cílové aminokyseliny. Například  $\beta$ -katenin, který je primárně fosforylován CK1 $\alpha$  na Ser45, tyto vlastnosti nemá. Obsahuje ale S-L-S motiv následovaný po 2-5 AK směrem k C-konci skupinou kyselých zbytků (viz obr. 2). Po otestování na více substrátech se tato vlastnost u některých proteinů ukázala být pro rozpoznání kasein kinázou 1 nezbytná. Byla ale 15-25krát méně účinná než výše zmíněná fosforylovaná aminokyselina. (Marin *et al.*, 2003).

<b>NF-AT4 residues 178-195</b>	<b>D A S S C E <u>S L S H I Y D D V D S E</u></b>
<b><math>\beta</math>-Catenin 39-58</b>	<b>A T T T A P <u>S L S G K G N P E E E D V D</u></b>
<b>Armadillo 50-66 (<math>\beta</math>-catenin of <i>Drosophila</i>)</b>	<b>A V T Q V P <u>S L S G K E D E E M E</u></b>

Obr. 2. Porovnání sekvencí jaderného faktoru NF-AT4 (člověk),  $\beta$ -kateninu (člověk) a Armandilla ( $\beta$ -katenin *drosophily*). Zvýrazněné jsou podobné motivy, které mohou být rozeznávány CK1 (převzato z Marin *et al.*, 2003)

V komplexnějším pohledu na celý děj se ukazuje, že pro interakci kinázy a substrátu jsou důležité nejen rozpoznávané sekvence, ale i terciální struktury obou proteinů. U proteinů NFAT (jaderný faktor aktivovaných T-buněk) a PER (Period protein, účastní se udržování cirkadiánních rytmů) se nachází rozpoznávaný motiv daleko od fosforylované aminokyseliny a bylo prokázáno, že kináza interaguje s povrchem substrátu na více místech, což by mohlo naznačovat, že se substráty chovají jako lešení a snaží se kinázu nastavit do správné pozice (Cegielska *et al.*, 1998; Cheong and Virshup, 2011). C-terminální konec kinázy se může naopak chovat inhibičně a blokovat jak vazebné místo, tak i následnou fosforylaci již navázaného substrátu (Dahlberg *et al.*, 2009). Tato regulace bude pravděpodobně možná jen u kináz s delším C-koncem jako je například CK1 $\delta$ ,  $\epsilon$  nebo  $\gamma$ 3.

Kasein kinázy jsou stále intenzivně zkoumány a je pravděpodobné, že jejich substráty, a tudíž i rozpoznávané motivy a mechanismy určující jejich specifitu, budou přibývat. Některé z nich jsou zakomponované v signálních drahách jakou je například Wnt/ $\beta$ -kateninová signalizace. Ta zatím obsahuje nejvíce nalezených substrátů těchto kináz (viz tab. 1). Dále se také nachází v dráze proteinu Hedgehog (diferenciace buněk), v signalizaci proteinu p53 (transkripční faktor, senzor pro poškození DNA). Další substráty lze nalézt v dráze PI3K/AKT (reguluje buněčný cyklus) a signalizaci buněčné smrti (Schitteck and Sinnberg, 2014).

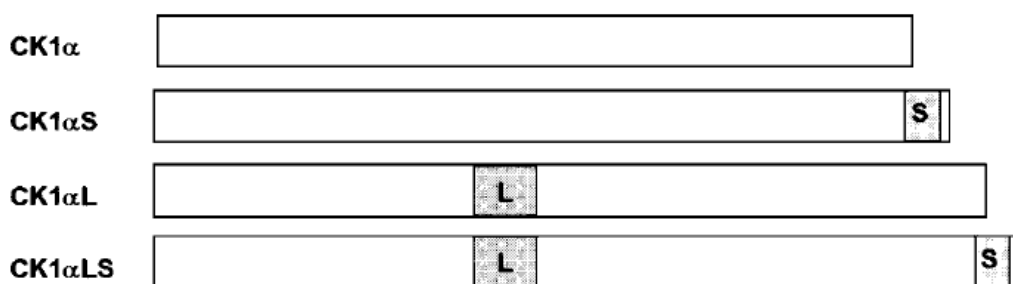
Zkratka	Celý název	CK1	fosforylační místa
APC	Adenomatous polyposis coli	$\alpha, \delta, \epsilon$	u $\epsilon$ : S1279, S1392, S1504, S1505, S1507, S1510
AXIN1, AXIN2	Axin 1 and 2	$\alpha, \delta, \epsilon,$ $\gamma 1$	
CTNNB1	Beta-catenin	$\alpha, \delta, \epsilon$	u $\alpha$ a $\delta$ : S45
NFATC3	Nuclear factor of activated T-cells	$\alpha$	T204, S207, T210, S211, S215
DVL1-3	Dishevelled 1-3	$\delta, \epsilon, \gamma 1$	
CSNK1D	Casein kinase 1 delta	$\epsilon$	
FZD1, FZD5	Frizzled 1 a 5	$\gamma 1$	
GSK3A, GSK3B	Glycogen synthase-kinase alpha and beta	$\gamma 1$	
WNT3A	Wingless 3A	$\gamma 1$	

Tab. č. 1. Substráty CK1 ve Wnt signalizaci s fosforylačními místy. Tabulka obsahuje pouze biochemicky otestované proteiny. Upraveno podle (Schitteck and Sinnberg, 2014).

# CK1 $\alpha$

## Struktura a vlastnosti

Kasein kináza alfa je svou velikostí nejmenší z rodiny. Podle studie z roku 1991 je její velikost 37,6 kDa a tvoří ji 325 aminokyselin (izolováno z hovězího mozku, Rowles *et al.*, 1991). Tato kináza má 4 sestříhové varianty, které vznikají buď vložením kratšího insertu S (12 AK) doprostřed katalytické domény, nebo delšího insertu L (28 AK) do blízkosti C-konce. Vznikají tak 4 sestříhové varianty CK1 $\alpha$ , CK1 $\alpha$ S, CK1 $\alpha$ L a CK1 $\alpha$ LS, které se liší například svojí kinázovou aktivitou, biochemickými vlastnostmi, stabilitou nebo buněčnou lokalizací. (Burzio *et al.*, 2002; struktura viz. obr. 3.).



Obr. 3. Sestříhové varianty CK1 $\alpha$ . Schématické zobrazení všech sestříhových variant: CK1 $\alpha$ , CK1 $\alpha$ S, CK1 $\alpha$ L a CK1 $\alpha$ LS (upraveno podle Burzio *et al.* 2002).

## Funkce

Bylo zjištěno, že v interfázi buněčného dělení se isoforma alfa nachází na cytosolických vezikulárních strukturách v blízkosti ER markerů často spojených s mikrotubuly. V profázi se začíná hromadit v okolí centrozómů a astrálních mikrotubulů. Později se přesouvá na mitotická vřeténka. Během telofáze se potom vrací zpět k centrozómu. Přesná funkce v buněčném dělení dosud není známa, ale lze ji odhadovat na základě podobného chování homologické kinázy HRR25, která reguluje segregaci chromozómů, meiózu a opravu DNA u kvasinek (Brockman *et al.*, 1992).

V oocytech myši ve stádiu zárodečného vajíčku byla nalezena na plasmatické membráně, u sekundárních oocytů na dělicím vřeténku. Při fixaci buněk v metafázi druhého meiotického dělení byla kináza nalezena na dělicím vřeténku. Po oplodnění se přesouvá do prvojader, kde zůstává až do první mitózy, při které CK1 $\alpha$  lze nalézt opět na dělicím vřeténku. Po tomto dělení

zůstává rozptýlena v cytoplasmě s vyšší akumulací kolem jádra. Lokalizace kinázy byla zjišťována pomocí CK1 $\alpha$  protilátek. Pokud byly tyto protilátky injikovány do oocytů těsně po oplození, prodloužila se signifikantně doba před prvním dělením a byla zjištěna blokáde jaderného importu pro CK1. To by mohlo naznačovat roli v syntéze DNA, kterou podporuje i studie na embryích drosofil, kdy po působení  $\gamma$ -záření, které způsobuje dvojřetězcové zlomy v DNA, se CK1 $\alpha$  přesunula do jádra (Santos *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 1997).

Prozkoumanější funkcí u této kinázy je ovlivňování apoptózy přes TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), který je jedním z přirozených způsobů boje těla proti nádorovým buňkám. Bylo dokázáno na několika různých nádorových liniích, že při inhibici CK1 $\alpha$  (nebo  $\epsilon$ ) se stávají buňky náchylnější k působení TRAIL proteinu a snadněji podléhají apoptóze (Izeradjene *et al.*, 2004).

Další role CK1 $\alpha$  je v regulaci apoptózy přes Fas ligand, ve které hraje klíčovou roli štěpení proteinu Bid. Fragment Bid pak vstupuje do mitochondrií, kde indukuje uvolnění proapoptotických faktorů. Pokud je Bid fosforylován CK1, není štěpen a buněčná apoptóza je oddálena. Stejnou regulaci může provádět i CK1 $\epsilon$ . (Desagher *et al.*, 2001).

Ve vysokých koncentracích CK1 $\alpha$  se *in vitro* podařila fosforylace tumor supresoru p53, *in vivo* se tento efekt neprokázal (vliv fosforylace p53 na buněčné pochody viz kapitolu CK1 $\delta$ )(Knippschild *et al.*, 2005).

CK1 $\alpha$  je také schopna fosforylovat některé receptory například m $3$  muskarinový receptor a rodopsin. Spekuluje se také o tom, že dokáže fosforylovat i jiné receptory spřažené s G-proteiny. Dále je schopna fosforylovat insulinový receptor a RXR skupinu receptorů retinové kyseliny (Knippschild *et al.*, 2005).

Nejprozkoumanější funkcí je ale její účast v degradaci  $\beta$ -kateninu a Wnt signalizaci. Tato kináza je součástí destrukčního komplexu, který se bez přítomnosti Wnt molekuly pohybuje volně v cytoplasmě. Zde vychytává  $\beta$ -katenin a váže ho na strukturní proteiny Axin a APC, které ho drží na místě pro fosforylaci (Kimelman and Xu, 2006). V tomto případě CK1 $\alpha$  provádí primární fosforylaci na Ser45, který rozpoznává díky S-L-S motivu a kyselým koncům aminokyselin, jak bylo popsáno v kapitole výše. Dále je  $\beta$ -katenin na několika dalších místech fosforylován kinázou GSK3, rozpoznán  $\beta$ -TrCP podjednotkou ubiquitin ligázy, ubiquitinován a směřován k degradaci (Amit *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2003).

Za přítomnosti Wnt signálu je CK1 $\alpha$  přitažena spolu s destrukčním komplexem na membránu. Fosforylací Axinu, na který je konstitutivně připojena, může zesilovat jeho afinitu vůči fosforylovanému LRP5/6 (Del Valle-Pérez *et al.*, 2011a).

# CK1 $\gamma$

## Struktura a vlastnosti

Kasein kináza gamma je podrodina kináz, která má tři členy – CK1 $\gamma_1$ , CK1 $\gamma_2$  a CK1 $\gamma_3$  o molekulárních hmotnostech 43 kDa, 45,5 kDa a 49,7 kDa. Kasein kináza  $\gamma_3$  může mít pravděpodobně navíc další sestřihové varianty. V kinázové doméně jsou kinázy CK1 $\gamma$  mezi sebou homologické z více než 90 %. Při porovnávání kinázové domény s ostatními členy CK1 rodiny je shoda už jen 50-59 % v této doméně. Mohlo by se proto zdát, že kinázy do této rodiny nepatří. Jejich příslušnost byla potvrzena přítomností charakteristických motivů CK1 kináz a jejich stejnými biochemickými vlastnostmi. Kinázy gamma mají z CK1 nejblíže ke kvasinkovým homologům kasein kináz (Zhai *et al.*, 1995).

Další vlastností, kterou se liší od ostatních kináz CK1 rodiny je jejich vazba lipidovou kotvou na membránu. C-terminální konec obsahuje motivy potencionálně modifikovatelné palmitoylací (TKCCCFKKR), která by mohla způsobovat připojení na membránu. Pokusy dokázat tuto skutečnost probíhaly v HEK293T buňkách připojením žlutého fluorescenčního proteinu na CK1 $\gamma$ , který potvrdil její kolokalizaci s membránou. Při odebrání C-koncové domény se CK1 $\gamma$  ocitla v cytosolu a její signalizační funkce ve Wnt signalizaci byla přerušena. Kinázová aktivita byla ale zachována, z čehož lze soudit, že membránová doména je důležitá pro funkci ve Wnt signalizaci (Davidson *et al.*, 2005).

## Funkce

Nejvíce prozkoumaná funkce této kinázy je ve Wnt signalizaci. CK1 $\gamma$  je ve Wnt signalizaci připojena na Wnt koreceptor LRP5/6, který má několik CK1 fosforylovatelných míst. Delecemi v S/T klastrech na LRP6 byly objeveny dvě oblasti nutné pro kooperaci s CK1 $\gamma$ . Po napojení obou těchto oblastí na Wnt-inaktivní LDL minireceptor (analogní k LRP6) byl tento protein schopen spustit Wnt signalizaci na rozdíl od minireceptorů pouze s jednou touto oblastí. Testováním různých substitucí byla také prokázána důležitost CK1 $\gamma$  a obou fosforylovaných motivů pro nasměrování Axinu na membránu (Davidson *et al.*, 2005).

V širším pohledu pak byl testován účinek injikované mRNA CK1 $\gamma$  do animálního pólu embryí drápatky. To vedlo k nadprodukcí CK1 $\gamma$  v tomto místě a vývoji bezhlavého embrya. Při injekci

mRNA dominantně negativní formy CK1 $\gamma$  vznikala embrya s redukovanými trupy a ocasy, naopak hlavová část a cementové žlázy byly zvětšené. Tyto fenotypy odpovídají hyper- a hypoaktivaci Wnt dráhy, proto z toho lze soudit, že má CK1 $\gamma$  ve Wnt signalizaci nezbytnou a zároveň dostačující roli (Davidson *et al.*, 2005).

# CK1δ

## Struktura a vlastnosti

CK1δ je jednou z největších kináz rodiny. Byla charakterizována v roce 1993 týmem Paula Gravesa. Její velikost predikovaná z cDNA byla 428 aminokyselin, což je přibližně 49 kDa. Kromě velké 4,1 kb mRNA izolovali z králíka také 1,9-2,2 kb velké mRNA zlomky, z nichž některé odpovídaly CK1δ a usuzují z toho tedy, že by se mohlo jednat o sestříhové varianty této kinázy (Graves *et al.*, 1993).

Obecně se kasein kinázám přisuzuje konstitutivní aktivita. U CK1δ a ε to ale tak úplně neplatí. Ukázalo se, že jsou schopné jak *in vitro*, tak *in vivo* autofosforylace C-koncových regulačních domén a sami sebe inhibují. V aktivním stavu je v buňce udržují fosfatázy, kinázy tak neustále procházejí cykly fosforylace a rapidní defosforylace. Značné snížení aktivity kasein kináz δ a ε po přidání okadaové kyseliny nebo calyculinu A vedlo k přesvědčení, že fosfatázy, které se na defosforylaci podílejí, jsou podobné PP1 a PP2A (Rivers *et al.*, 1998). Později byla tato skutečnost potvrzena pro PP2A na CK1ε, kdy je kináza touto fosfatázou aktivována ve Wnt signalizaci (Vinyoles *et al.*, 2017).

## Funkce

CK1δ se díky své vysoké homologii účastní velmi podobných dějů jako CK1ε. Například může interagovat s destrukčním komplexem přes Axin a předpokládá se, že je schopna fosforylovat β-katenin místo CK1α na Ser45, stejně jako CK1ε (Amit *et al.*, 2002).

Na rozdíl od CK1ε byla však nalezena ve nezvykle zvýšené koncentraci u některých subtypů rakoviny prsu. U buněk SV40 indukovanal negativně dominantní mutant prsní karcinom. Při hloubějším prozkoumávání se ukázalo, že inhibice CK1δ zabraňuje β-kateninové aktivitě a způsobuje tak apoptózu rakovinných buněk. CK1δ je tedy pro přežití a růst rakovinných buněk důležitá z hlediska udržení β-kateninové signalizace. Bylo také zjištěno, že tato závislost se odvíjí od typu buňky a jejího prostředí. Tým Laury Rosenberg vytvořil molekulu SR-3029, která by měla velmi silně a specificky umlčovat funkci CK1δ. SR-3029 je tak molekulou, která by se měla podrobit dalším testům, které by ukázaly vhodnost molekuly pro léčbu těchto typů karcinomů (Rosenberg *et al.*, 2016).

# CK1 $\epsilon$

Poslední z kasein kináz objevených u obratlovců je epsilon. Tato kináza byla podle cDNA predikována na 416 aminokyselin a 47,3 kDa. Kinázová doména je s ostatními kinázami z rodiny shodná ve 53-98 %. Homologicky nejbližší jsou si s CK1 $\delta$ , až v 98% v kinázové doméně (Fish *et al.*, 1995).

CK1 $\epsilon$  není konstitučně aktivní, jako je tomu u ostatních kasein kináz 1. Podléhá totiž autoinhibici (více viz. CK1 $\delta$ , struktura a funkce).

## Funkce

CK1 $\epsilon$ , stejně tak jako CK1 $\alpha$ , se může účastnit jak aktivačních, tak inhibičních dějů Wnt signalizace. V inhibici se například ukazuje v destrukčním komplexu, kde fosforyluje APC a zvyšuje tak jeho afinitu k  $\beta$ -kateninu (Ha *et al.*, 2004). Pravděpodobně může fosforylovat ve spolupráci s GSK-3 $\beta$  i  $\beta$ -katenin na Ser45 místo CK1 $\alpha$  a směřovat ho tím k degradaci, stejně jako CK1 $\delta$  (Amit *et al.*, 2002). Inhibičně na kanonickou Wnt signalizaci ale působí i fosforylace Dvl3 způsobená CK1 $\epsilon$  na C-koncových klastrech, která změní elektroforetickou mobilitu Dvl3 a má negativní vliv na jeho polymeraci (Bernatík *et al.*, 2014).

Kasein kináza epsilon má však také pozitivní vliv na Wnt signalizaci. U vyšších eukaryot je kináza konstitučně vázána na p120-katenin a přes něj dále na e-kadherin a koreceptor Wnt molekuly LRP5/6 a to i bez Wnt stimulace. p120-katenin má zřejmě roli v aktivitě CK1 $\epsilon$ , protože při jeho eliminaci se aktivita CK1 $\epsilon$  snižuje. Uvažuje se o možné blokaci inhibiční autofosforylace vazbou na tento protein. Tato fosforylace dále spouští Dvl polymeraci a další předání signálu. Dále může ve spolupráci s CK1 $\gamma$  fosforylovat LRP5/6 a zesilovat tak interakci mezi LRP5/6 a Dvl. Bylo zjištěno, že přítomnost komplexu p120-kateninu a CK1 $\epsilon$  je nezbytná pro časné reakce na Wnt (Casagolda *et al.*, 2010; Bernatík *et al.*, 2014).

Další aktivitou CK1 $\epsilon$  ve Wnt signalizaci je fosforylace p120-kateninu a E-kadherinu, která přerušuje vazby E-kadherinu, jak s LRP5/6, tak s p120-kateninem. Tím se komplex CK1 $\epsilon$  a p120-kateninu odpojuje od membrány a uvolňuje pro vazbu na Kaiso, inhibitor Wnt signalizace (více níže v kapitole Regulace za přítomnosti Wnt, Oddělení komplexu p120-kateninu a CK1 $\epsilon$ , Del Valle-Pérez *et al.*, 2011b).

# Kasein kinázy 1 ve Wnt dráze

## Regulace bez přítomnosti Wnt

Za nepřítomnosti Wnt molekuly zůstávají jeho receptory Frizzled a LRP5 nebo 6 na membráně odděleny a destrukční komplex volně v cytoplasmě. Destrukční komplex obsahuje axin jako strukturní protein držící všechny členy pohromadě; tumor supresorový protein APC (Adenomatous polyposis coli protein) a dvě kinázy GSK-3 $\beta$  (glykogen syntáza kináza-3 $\beta$ ) a CK1. Na axin se může vázat CK1 $\alpha$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ , nejčastěji se však váže forma  $\alpha$  a zároveň se ukazuje pro degradaci  $\beta$ -kateninu nepostradatelná (Cruciat, 2014). Dokázaly to pokusy na myších, kde byla vytvořena kondicionální delece CK1 $\alpha$  lokalizovaná pouze do střev. Tato mutace způsobila stabilizaci  $\beta$ -kateninu a silnou Wnt odpověď (Elyada *et al.*, 2011). CK1 $\alpha$  v destrukčním komplexu primárně fosforyluje  $\beta$ -katenin na Ser45, a stimuluje tak k fosforylaci GSK-3 $\beta$ . Ta fosforyluje  $\beta$ -katenin postupně na dalších 3 pozicích Thr41, Ser37 a Ser33. Poslední dvě fosforylované aminokyseliny jsou rozpoznávány  $\beta$ -TrCP podjednotkou U3 ubikvitin protein ligázy, která  $\beta$ -katenin ubikvitinuje a následně vede k degradaci v proteasomu. V tomto stavu tak nedochází k přepisu Wnt ovládaných genů (Liu *et al.*, 2002; Cruciat, 2014).

## Regulace za přítomnosti Wnt

### Formace receptorového komplexu

Wnt je sekretovaný protein, který putuje od signální buňky k buňce cílové. K té přistupuje z vnějšku a váže se na receptor Fz a koreceptor LRP5/6. Receptor Frizzled je protein procházející 7krát membránou a obsahující domény bohaté na cystein, díky kterým má k Wnt vysokou afinitu a váže jej tedy relativně pevně. Koreceptor LRP5 nebo 6 prochází membránou pouze jednou, má k Wnt menší afinitu, zato však má vazebných míst několik a dokáže nezávisle vázat několik různých isoform Wnt, což by potencionálně mohlo podpořit tvorbu větších receptorových komplexů (Niehrs, 2012). Na LRP5/6 je navázán membránový protein E-kadherin (převažuje v epiteliálních buňkách) nebo N-kadherin (převažuje v nervových buňkách), který je spojkou na komplex p120-kateninu a CK1 $\epsilon$  (Casagolda *et al.*, 2010). CK1 $\epsilon$  je pak aktivována Fz vázanou PP2A fosfatázou. Aktivovaná CK1 $\epsilon$  fosforyluje nejdříve Dvl na Ser280 a Ser311 v PDZ doméně a tím ho aktivuje (Bernatík *et al.*, 2014; více v kapitole CK1 $\epsilon$ , funkce). Poté fosforyluje své vazebné partnery p120-katenin a E-kadherin a zeslabuje tím vazbu

E-kadherinu, jak na LRP5/6, tak na p120-katenin. Komplex p120-kateninu a CK1 $\epsilon$  se odpojuje do cytoplasmy pro další reakce Wnt signalizace.

## Formace signalozomu

Aktivovaný protein Dvl má schopnost polymerace přes DIX doménu. Stejnou doménu, přes kterou polymeruje, obsahuje také Axin (DAX). Agregují tak receptorové komplexy k sobě za tvorby signalozomu. Shlukování těchto komplexů způsobí vysokou lokální koncentraci receptorů, která aktivuje kinázu CK1 $\gamma$  pro fosforylaci LRP5/6 (popsáno níže). Mutanti Dvl s blokací polymerace nebyli schopni agregovat a LRP5/6 nebylo fosforylováno. Polymerace Dvl se tak jeví nezbytná pro další signalizaci (Bilic *et al.*, 2007; Schwarz-Romond *et al.*, 2007; Fiedler *et al.*, 2011).

Zároveň je fosforylována cytosolická doména LRP5/6, která obsahuje 5 PPPS/TPxS motivů, kde P značí prolin, S/T značí serin či threonin a x libovolnou AK (pro zjednodušení dále jen PPPSP motiv). Tyto motivy jsou pro signalizaci kritické. Mutace nebo substituce v tomto motivu, zejména na čtvrté pozici v serinu či threoninu zabraňují iniciaci signalizace. Zároveň se ukázalo, že už jeden tento motiv je schopen signál spustit. Další přidané PPPSP motivy pak signalizaci násobně zesilují (Tamai *et al.*, 2004; Davidson *et al.*, 2005).

Primární fosforylaci PPPSP motivů zajišťuje kináza GSK3. Byly ale objeveny i další kinázy, které se zdají být důležité pro fosforylaci motivů PPPSP jako například kinázy GRK5 a GRK6 (G protein-coupled receptor kinase). Těmito fosforylacemi je vytvořeno vazebné místo pro CK1 $\gamma$  a ta pokračuje ve fosforylacích na dalších místech v S/T klastru a mezi PPPSP motivy. Blíže byl pak lokalizován cíl fosforylace CK1 $\gamma$  jako T1479 směrem k C-konci cytosolické domény a T1493 umístěný 2 AK směrem k C-konci za prvním PPPSP motivem. Obě fosforylace, jak PPPSP motivů, tak S/T motivů, jsou důležité pro vytvoření vazebného místa pro Axin (Davidson *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

Fosforylace LRP5/6 se stále jeví jako ne zcela prozkoumaný děj. Některé zdroje tvrdí, že fosforylovaný Dvl nejprve přitahuje na membránu destrukční komplex a až poté je LRP5/6 fosforylováno GSK3 vázanou v destrukčního komplexu. Další zdroje přisuzují primární fosforylaci jiné isoformě GSK3, která je vázaná na membráně či dávají důležitost jiným kinázám, které by mohly LRP5/6 fosforylovat (Zeng *et al.*, 2005, 2008; Chen *et al.*, 2009).

## Přitažení destrukčního komplexu

Na fosforylovanou cytosolickou doménu LRP5/6 se váže selektivně pouze fosforylovaný Axin. Fosforylovaný Axin je aktivní, připravený pro vazbu a směrování  $\beta$ -kateninu k degradaci (Kim *et al.*, 2013). Axin se přímo váže na fosforylované LRP5/6 a s ním je na membránu přitažen i zbytek destrukčního komplexu – CK1 $\alpha$ , GSK3 a APC. CK1 $\alpha$  v tomto komplexu pak fosforyluje E-kadherin a p120-katenin a uvolňuje tak tyto dva proteiny spolu s CK1 $\epsilon$  pro další reakce v  $\beta$ -kateninové signalizaci (Vinyoles *et al.*, 2014).

GSK3 má nízkou specifitu, a tudíž mnoho substrátů, na které se může vázat. Velké množství těchto substrátů je nahromaděno v signalozomu – Axin, APC,  $\beta$ -katenin a LRP5/6. Není tedy divu, že se na signalozom nenaváže jedna, ale hned několik GSK3, které jsou inhibovány a odděleny do multivesikulárních tělísek. Velikost signalozomu se pak může blížit velikosti ribozomu (Taelman *et al.*, 2010).

## Oddělení do endosomu

Signalozom, konkrétně LRP5/6, kolokalizuje s kaveolinem v membránových raftech a tvoří s ním komplex, jak bylo ukázáno v testech na LRP6 a kaveolinu-1 po přidání Wnt-3a. K redukcí internalizace dochází při přidání siRNA proti kaveolinu nebo Nynstatinu (váže se na cholesterol a rozpouští lipidové rafty), což poukazuje na roli kaveolinu v internalizaci. Některé testy také ukázaly, že kaveolin inhibuje vazbu  $\beta$ -kateninu na Axin v signalozomu, to by mohlo podpořit akumulaci  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě (Yamamoto *et al.*, 2006). S tvorbou váčku pomáhá také ATPasa typu V, která váček okyseluje a podporuje tak tvorbu časného endosomu. Později je tento endosom přeměněn na multivesikulární tělíčko (MVB) a destrukční komplex se tak stává prostorově oddělený od cytoplasmy. Společně s GSK3 jsou odděleny do MVB proteiny Fz, Dvl-2, Axin, LRP5/6 i  $\beta$ -katenin.  $\beta$ -katenin zůstává navázaný na Axinu a fosforylovaný na Ser37, jak dokázaly fosfospecifické protilátky. Není degradován, neboť  $\beta$ -TrCP zůstává v cytoplasmě. V MVB tedy je  $\beta$ -katenin fosforylován, zabráněno je pouze fosforylaci  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě (Vinyoles *et al.*, 2014).

Za přítomnosti mutací v p120-kateninu a E-kadherinu bylo zabráněno oddělení signalozomu do MVB. Za těchto podmínek nebyla akumulace  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě zcela zastavena, ale stoupla pouze 2-2,5krát v závislosti na použitých mutantech. Při obnově nemutovaným p120-

kateninem stoupla koncentrace  $\beta$ -kateninu v cytoplasmě 4,5krát. U mutací v kaveolinu se projevila podobná reakce (Vinyoles *et al.*, 2014).

## Oddělení komplexu p120-kateninu a CK1 $\epsilon$

CK1 $\epsilon$  fosforylovaný p120-katenin uvolněný do cytoplasmy má ještě další funkci v dráze. Fosforylací totiž získává afinitu k proteinu Kaiso, inhibitoru formace transkripčního komplexu, váže se na něj a zabraňuje jeho působení proti transkripci. Bez inhibice vycytává Kaiso  $\beta$ -katenin a Tcf-4 a zabraňuje jejich vzájemné interakci a spuštění transkripce. Při Wnt signálu je ale Kaiso blokováno vazbou p120-kateninu, formuje se komplex  $\beta$ -kateninu s Tcf-4, který se váže na DNA a spouští transkripci Wnt řízených genů (Del Valle-Pérez *et al.*, 2011b).

# Závěr

Zdá se, že o struktuře CK1 už víme poměrně velké množství informací. V databázích můžeme nalézt tisíce osekvenovaných proteinů. Od rostlin, hub přes kvasinky až po obratlovce a člověka. Zatímco u rostlin je známo o funkci homologů CK1 velmi málo, u živočichů jsou poznatky o něco dále. Známe substráty a dráhy, kterých se CK1 účastní a není jich málo. Důležitou funkci mají při vývoji embrya při určování buněčného osudu buněk. Zasahují pravděpodobně také do buněčného dělení a možná hrají roli při opravě DNA. Tyto dvě funkce je třeba ještě hlouběji prozkoumat, neboť tyto domněnky byly zatím vyřčeny pouze na základě kolokalizace s cytoskeletem a jadernými strukturami.

Rodina CK1 kináz se účastní několika důležitých signalizačních drah v životě buňky. Jednou z těchto drah je právě Wnt/ $\beta$ -kateninová signalizace, kterou se tato práce primárně zabývá. Každá z těchto kináz má v signalizaci svou funkci, ale jejich funkce se mohou překrývat. Velmi výrazně se toto projevuje u CK1 $\delta$  a  $\epsilon$ , kde se tyto kinázy často nachází ve stejných reakcích, na stejných substrátech. Otázkou tedy je, které kasein kinázy jsou schopné se takto zastupovat a za jakých podmínek a s jakou specifitou.

Další velmi zastřenou otázkou je jejich regulace. Předpokládaná je konstitutivní, u CK1 $\delta$  a  $\epsilon$  se však objevila inhibice autofosforylací. Nalezení regulačních mechanismů kasein kináz by mohlo vést k vývoji léčiv některých typů karcinomů. Například, jak bylo zmíněno výše, u některých subtypů rakoviny prsu se ve větší koncentraci nachází CK1 $\delta$  a její účinná a mířená inhibice v lidském těle by pravděpodobně nádor potlačila. Stejný potenciál by ale mohly mít všechny kinázy této rodiny. V této oblasti vidím možnost rozvoje pro aplikovanou vědu.

## Bibliografie

- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-shushan, E., Mann, M., Ben-neriah, Y., and Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of b-catenin at Ser45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* *16*, 1066–1076.
- Bernatík, O., Šedová, K., Schille, C., Ganji, R. S., Červenka, I., Trantírek, L., Schambony, A., Zdráhal, Z., and Bryja, V. (2014). Functional analysis of dishevelled-3 phosphorylation identifies distinct mechanisms driven by casein kinase 1 $\epsilon$  and Frizzled5. *J. Biol. Chem.* *289*, 23520–23533.
- Bilic, J., Huang, Y.-L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.-M., Bienz, M., and Niehrs, C. (2007). Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science (80-. )*. *316*, 1619–1622.
- Brockman, J. L., Gross, S. D., Sussman, M. R., and Anderson, R. A. (1992). Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 9454–9458.
- Burzio, V., Antonelli, M., Allende, C. C., and Allende, J. E. (2002). Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1 $\alpha$  from zebrafish (*Danio rerio*). *J. Cell. Biochem.* *86*, 805–814.
- Casagolda, D. *et al.* (2010). A p120-catenin-CK1epsilon complex regulates Wnt signaling. *J Cell Sci* *123*, 2621–2631.
- Cegielska, A., Gietzen, K. F., Rivers, A., and Virshup, D. M. (1998). Autoinhibition of casein kinase I  $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) is relieved by protein phosphatases and limited Proteolysis. *J. Biol. Chem.* *273*, 1357–1364.
- Chen, M., Philipp, M., Wang, J., Premont, R. T., Garrison, T. R., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Chen, W. (2009). G protein-coupled receptor kinases phosphorylate LRP6 in the Wnt pathway. *J. Biol. Chem.* *284*, 35040–35048.
- Cheong, J. K., and Virshup, D. M. (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 465–469.
- Cruciat, C.-M. (2014). Casein kinase 1 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *31*, 46–55.
- Dahlberg, C. L., Nguyen, E. Z., Goodlett, D., and Kimelman, D. (2009). Interactions between

casein kinase I $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) and two substrates from disparate signaling pathways reveal mechanisms for substrate-kinase specificity. *PLoS One* 4.

Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1  $\gamma$  couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867–872.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2001). Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell* 8, 601–611.

Elyada, E. *et al.* (2011). CKI $\alpha$  ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature* 470, 409–413.

Fiedler, M., Mendoza-Topaz, C., Rutherford, T. J., Mieszczanek, J., and Bienz, M. (2011). Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating  $\beta$ -catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1937–1942.

Fish, K. J., Cegielska, A., Getman, M. E., Landes, G. M., and Virshup, D. M. (1995). Isolation and Characterization of Human Casein Kinase I epsilon (CKI) a Novel Member of the CKI Gene Family. *J. Biol. Chem.* 270, 14875–14883.

Graves, P. R., Haas, D. W., Hagedorn, C. H., DePaoli-Roach, a a, and Roach, P. J. (1993). Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. *J. Biol. Chem.* 268, 6394–6401.

Gross, S. D., and Anderson, R. a (1998). Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell. Signal.* 10, 699–711.

Gross, S. D., Simerly, C., Schatten, G., and Anderson, R. a (1997). A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte. *J. Cell Sci.* 110 ( Pt 2, 3083–3090.

Ha, N. C., Tonzuka, T., Stamos, J. L., Choi, H. J., and Weis, W. I. (2004). Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to  $\beta$ -catenin and its role in  $\beta$ -catenin degradation. *Mol. Cell* 15, 511–521.

Izeradjene, K., Douglas, L., Delaney, A. B., and Houghton, J. A. (2004). Casein kinase I attenuates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by regulating the recruitment of fas-associated death domain and procaspase-8 to the death-inducing signaling complex. *Cancer Res.* 64, 8036–8044.

- Kim, S.-E., Huang, H., Zhao, M., Zhang, X., Zhang, a., Semonov, M. V., MacDonald, B. T., Abreu, J. G., Peng, L., and He, X. (2013). Wnt Stabilization of  $\beta$ -Catenin Reveals Principles for Morphogen Receptor-Scaffold Assemblies. *Science* (80-. ). *340*, 867–870.
- Kimelman, D., and Xu, W. (2006).  $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* *25*, 7482–7491.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., and Stöter, M. (2005). The casein kinase 1 family: Participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell. Signal.* *17*, 675–689.
- Kumar, R., and Tao, M. (1975). Multiple forms of casein kinase from rabbit erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *410*, 87–98.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of B-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* *108*, 837–847.
- Marin, O., Bustos, V. H., Cesaro, L., Meggio, F., Pagano, M. a, Antonelli, M., Allende, C. C., Pinna, L. a, and Allende, J. E. (2003). A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10193–10200.
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 767–779.
- Pulgar, V., Tapia, C., Vignolo, P., Santos, J., Sunkel, C. E., Allende, C. C., and Allende, J. E. (1996). The recombinant a isoform of protein kinase CKI from *Xenopus Laevis* can phosphorylate tyrosine in synthetic substrates. *Eur. J. Biochem.* *528*, 519–528.
- Rivers, A., Gietzen, K. F., Vielhaber, E., and Virshup, D. M. (1998). Regulation of casein kinase I  $\epsilon$  and casein kinase I  $\delta$  by an in vivo futile phosphorylation cycle. *J. Biol. Chem.* *273*, 15980–15984.
- Rosenberg, L. H. *et al.* (2016). Therapeutic Targeting of Casein Kinase 1  $\delta$  in Breast Cancer. *Sci. Transl. Med.* *7*, 1–24.
- Rowles, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., and Cobb, M. H. (1991). Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 9548–9552.

Santos, J. a, Logarinho, E., Tapia, C., Allende, C. C., Allende, J. E., and Sunkel, C. E. (1996). The casein kinase 1 alpha gene of *Drosophila melanogaster* is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. *J. Cell Sci.* *109* ( Pt 7, 1847–1856.

Schittek, B., and Sinnberg, T. (2014). Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol. Cancer* *13*, 231.

Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J. G., Kikuchi, A., Higuchi, Y., and Bienz, M. (2007). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 484–492.

Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D., and De Robertis, E. M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* *143*, 1136–1148.

Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., and He, X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol. Cell* *13*, 149–156.

Del Valle-Pérez, B., Arqués, O., Vinyoles, M., de Herreros, A. G., and Duñach, M. (2011a). Coordinated action of CK1 isoforms in canonical Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 2877–2888.

Del Valle-Pérez, B., Casagolda, D., Lugilde, E., Valls, G., Codina, M., Dave, N., de Herreros, A. G., and Duñach, M. (2011b). Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1 $\epsilon$ -dependent phosphorylation of p120-catenin. *J. Cell Sci.* *124*, 2298–2309.

Vinyoles, M., DelValle-Pérez, B., Curto, J., Viñas-Castells, R., Alba-Castellón, L., García de Herreros, A., and Duñach, M. (2014). Multivesicular GSK3 Sequestration upon Wnt Signaling Is Controlled by p120-Catenin/Cadherin Interaction with LRP5/6. *Mol. Cell* *53*, 444–457.

Vinyoles, M., Del Valle-Pérez, B., Curto, J., Padilla, M., Villarroel, A., Yang, J., de Herreros, A. G., and Duñach, M. (2017). Activation of CK1 $\epsilon$  by PP2A/PR61 $\epsilon$  is required for the initiation of Wnt signaling. *Oncogene* *36*, 429–438.

Yamamoto, H., Komekado, H., and Kikuchi, A. (2006). Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of  $\beta$ -catenin. *Dev. Cell* *11*, 213–223.

Zeng, X. *et al.* (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* *135*, 367–375.

Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodget, J., and He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation. *October 454*, 42–54.

Zhai, L., Graves, P. R., Robinson, L. C., Italiano, M., Culbertson, M. R., Rowles, J., Cobb, M. H., DePaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (1995). Casein kinase Igamma subfamily. *J. Biol. Chem. 270*, 12717–12724.