

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biologie



Daniel Matějů

Úloha endocytózy v signální dráze proteinu Wnt

Role of endocytosis in Wnt signaling pathway

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lenka Libusová, PhD.

Praha 2011

Poděkování:

Poděkování patří mé školitelce RNDr. Lence Libusové, PhD. za poskytnuté rady při psaní této práce. Zároveň děkuji rodičům za podporu při studiu.

Prohlášení:

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

V Praze, 5.5.2011

Daniel Matějů

Abstrakt

Endocytóza a mezibuněčná signalizace jsou úzce propojené procesy. To je nejpatrnější na úrovni endocytózy receptorů a ligandů signálních drah. Dlouhou dobu byla endocytóza signálních receptorů považována za mechanismus negativní zpětné vazby, kterým se po stimulaci ligandem snižuje citlivost buňky k signálu. Dnes je však patrné, že tento proces je komplexnější a endocytóza může ovlivňovat signalizaci jak negativně tak i pozitivně. V této práci se budu zabývat tím, jaký vliv má endocytóza receptorů a ligandů Wnt signalizace na tuto signální dráhu. Wnt signalizace je jednou z nejvýznamnějších a nejstudovanějších signálních drah figurujících ve vývoji živočichů. V poslední době bylo objeveno několik mechanismů, kterými endocytóza ovlivňuje Wnt signalizaci, přičemž některé z nich jsou v rámci ostatních signálních drah unikátní. Pochopení vztahů mezi endocytózou a Wnt signalizací tak přispěje nejen k hlubšímu porozumění Wnt signalizace, ale také toho, jak mohou buňky využívat endocytózu a vezikulární transport pro regulaci mezibuněčné signalizace obecně.

Klíčová slova: Wnt, signalizace, endocytóza, klatrin, kaveolin, MVB, Frizzled, LRP6, GSK3

Abstract

Endocytosis and cell signaling are tightly connected processes. This connection is most obvious at the level of endocytosis of signaling receptors and ligands. For many years, endocytosis of signaling receptors was considered as a negative feedback loop mechanism, which desensitizes the cell after prolonged stimulation by ligand. Now it is evident that the situation is more complex and endocytosis can affect cell signaling both negatively and positively. In this thesis, I will summarize how Wnt signaling can be affected by endocytosis of receptors and ligands of this signaling pathway. Wnt signaling is one of the most important and intensively studied signaling pathways in the metazoan development. Several possible roles of endocytosis in Wnt signaling were uncovered in recent years, some of them unique among other signaling pathways. Understanding the relationship between endocytosis and Wnt signaling will thus help not only to deepen the knowledge of Wnt signaling but also to shed light on the possible roles of endocytosis in regulation of cell signaling in general.

Key words: Wnt, signaling, endocytosis, clathrin, caveolin, MVB, Frizzled, LRP6, GSK3

Seznam zkratek

AP-2 - adaptor protein-2
APC - adenomatous polyposis coli
CK1 - casein kinase 1
CVAK104 - coated vesicle-associated kinase of 104 kDa
Dkk1 - Dickkopf1
Dvl - Dishevelled
EEA1 - early endosome antigen 1
EGFR - epidermal growth factor receptor
ESCRT - endosomal sorting complex required for transport
Fz - Frizzled
GFP - green fluorescent protein
GPCR - G protein-coupled receptor
GPI - glycosylphosphatidylinositol
GSK3 - glycogen synthase kinase 3
HA - hemagglutinin
HEK - human embryonic kidney
HRP - horseradish peroxidase
HRS - hepatocyte growth factor regulated tyrosinekinase substrate
HSPG - heparan sulfate proteoglycan
JNK - Jun N-terminal kinase
LEF - lymphoid enhancing factor
LRP6 - low-density lipoprotein receptor-related protein 6
MAPK - mitogen-activated protein kinase
MVB - multivesicular bodies
NGF - nerve growth factor
PCP - planar cell polarity
TCF - T cell factor
TGF β - transforming growth factor β
Trk - tropomyosin-receptor-kinase
UBPY - ubiquitin-specific protease 8
Wg - Wingless
Wls - Wntless

Obsah

1. Úvod.....	7
1.1. Endocytóza.....	7
1.2. Role endocytózy v signálních drahách	9
1.3. Wnt signalizace.....	10
2. Endocytóza ligandů a receptorů Wnt signální dráhy	13
3. Role endocytózy v přenosu signálu ve Wnt signální kaskádě	15
3.1. Wnt/ β -kateninová signalizace.....	15
3.2. Nekanonická Wnt signalizace.....	20
4. Role endocytózy v regulaci koncentrace Wnt ligandu	21
5. Role endocytózy v regulaci receptorů Wnt signalizace.....	23
5.1. Endocytóza receptoru Frizzled	24
5.2. Endocytóza receptoru LRP6	26
6. Závěr	28
Seznam použité literatury	30

1. Úvod

1.1. Endocytóza

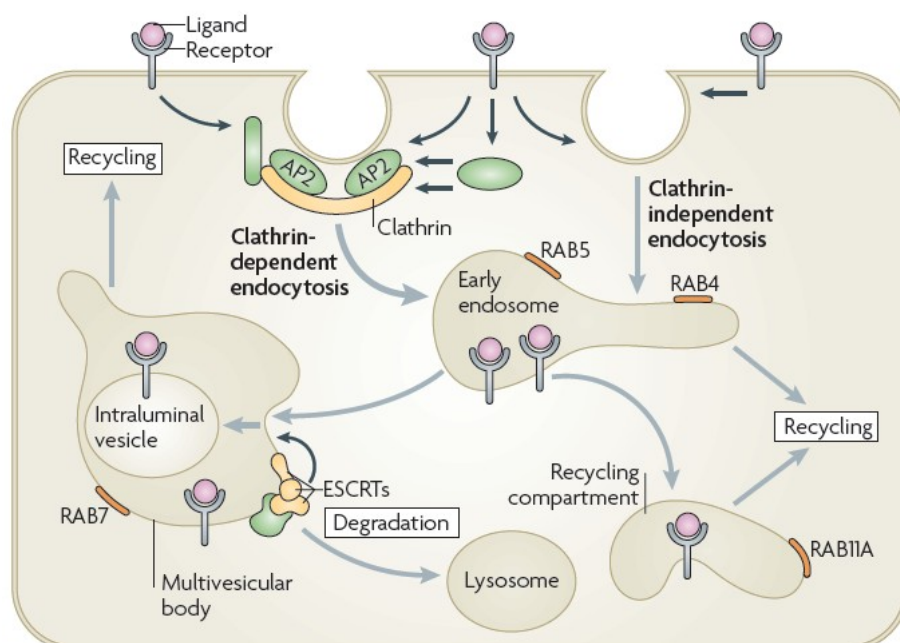
Endocytóza je proces, při kterém buňka pohlcuje extracelulární tekutinu a v ní obsažené látky. Při tomto procesu dochází ke vchlípení části plasmatické membrány, která je následně odštěpena a vzniká tak membránou ohraničený intracelulární váček. Za opačný proces může být považována exocytóza, při které dochází ke splynutí intracelulárního váčku s plasmatickou membránou a uvolnění jeho obsahu z buňky. Ačkoliv exocytóza s endocytózou úzce souvisí, nebude předmětem tohoto textu. Endocytózu buňka využívá především kvůli příjmu živin a kvůli regulaci složení plasmatické membrány. Existuje několik endocytických drah, které se mezi sebou liší mechanismem vzniku váčků a jejich morfologií. Částice větší než 500 nm jsou obvykle internalizovány pomocí fagocytózy či makropinocytózy. Menší váčky vznikají buď prostřednictvím klatrinové endocytózy nebo některou z drah nezávislých na klatrinu (Kumari et al. 2010) (Obr. 1).

Klatrinová endocytóza je nejlépe charakterizovanou endocytickou dráhou. Při klatrinové endocytóze v savčích buňkách dochází ke shlukování receptorů na plasmatické membráně a interakci jejich cytoplasmatických domén s adaptorovými proteiny jako je adaptor protein-2 (AP-2), popřípadě přes další adaptorové proteiny jako β -arrestin, epsin, Disabled 2 či ARH (autosomal recessive hypercholesterolaemia). Adaptorové proteiny současně interagují s klatrinem. Klatrin ve formě triskelionů, složených z tří těžkých řetězců a tří lehkých řetězců, polymerizuje a vytváří plášť. V dalším kroku, kterého se účastní GTPáza dynamin, dochází k odštěpení váčku od cytoplasmatické membrány. Klatrinový plášť je posléze z vezikulu uvolněn pomocí proteinů auxilin a hsc70 (heat shock cognate protein 70) a váček může fúzovat s časným endosomem (Doherty & McMahon 2009).

Mezi dráhy nezávislé na klatrinu patří především kaveolární endocytóza. Při tomto procesu se tvoří tzv. kaveoly, což jsou vchlípeniny plasmatické membrány. Hlavními složkami kaveol jsou proteiny kaveoliny, které v membráně asociují s cholesterolem a se sfingolipidy. Při odštěpení váčku i v této dráze hraje důležitou roli GTPáza dynamin. Takto vzniklé váčky mohou splývat s tzv. kaveosomy, což jsou speciální endosomy bohaté na kaveoliny, ale také s klasickými časnými endosomy (Hansen & Nichols 2010).

Podstatnými regulátory vezikulárního transportu jsou malé GTP-vázající proteiny z rodiny Rab. Tyto proteiny přecházejí mezi aktivním stavem s navázaným GTP a neaktivním stavem s navázaným GDP. Různé Rab proteiny se vážou specificky na membrány různých organel a váčků, kde interagují se svými efektorovými proteiny. Protein Rab5 reguluje

transport endocytovaných váčků od plasmatické membrány a jejich fúzi s časným endosomem. Z časného endosomu jsou endocytované látky roztrženy do různých lokalit. Protein Rab4 reguluje recyklaci váčků z časného endosomu zpět na plasmatickou membránu. Protein Rab11 reguluje pomalejší recyklaci váčků na plasmatickou membránu přes recyklující kompartment, což je membránový kompartment přítomný poblíž organizačního centra mikrotubulů (Jovic et al. 2010; Grant & Donaldson 2009). Ostatní endocytovaný náklad může být transportován do lysosomu. Podstatným krokem na cestě mezi časným endosomem a lysosomem je tvorba multivezikulárních tělísek (MVB). MVB obsahují vnitřní váčky vzniklé vchlípením vnější membrány MVB. Do těchto vnitřních váčků jsou transportovány především ubiquitinované receptory, které jsou určeny k degradaci. Na rozpoznávání ubiquitinovaných receptorů a na tvorbě vnitřních váčků se podílejí komplexy ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). Ubiquitinované receptory jsou rozpoznány ubiquitin-vazebnými proteiny HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), STAM (signal transducing adapter molecule), či dalšími komponenty ESCRT komplexů (Raiborg & Stenmark 2009). Protein Rab7, přítomný na pozdních endosomech či MVB, pak reguluje pravděpodobně splynutí MVB s lysosomem, kde dochází k degradaci endocytovaného nákladu (Vanlandingham & Ceresa 2009).



Obr. 1: Endocytické dráhy a vezikulární transport. Převzato z Sorkin & von Zastrow et al. 2009.

1.2. Role endocytózy v signálních drahách

Mnoho signálních receptorů (tj. receptorů, které přenášejí extracelulární signál do buňky) je běžně endocytováno z plasmatické membrány. K tomu může docházet konstitutivně, nebo až po stimulaci ligandem. Takto internalizované receptory mohou být pomocí vezikulárního transportu recyklovány zpět na plasmatickou membránu či degradovány v lysosomu (Obr. 1). U většiny receptorů endocytovaných po stimulaci ligandem převládá recyklace. Poměr mezi recyklací a degradací se ale u různých receptorů velmi liší, což značí, že tento poměr je specificky regulován. Jedním z mechanismů regulace je výše zmíněná ubiquitinace receptorů, která směřuje takto modifikované receptory do vnitřních váček MVB a tím je odsuzuje k degradaci v lysosomu. Mimo to mohou být některé receptory transportovány do lysosomů nezávisle na ubiquitinaci a na komponentech ESCRT komplexů. Endocytóza receptorů tak vede ke snížení počtu receptorů na plasmatické membráně, které je buď dočasné (v případě recyklace), či dlouhodobé (v případě degradace). Během vezikulárního transportu komplexu receptor-ligand může dojít k oddělení ligandu a jeho degradaci, ačkoliv samotný receptor je recyklován. Dalším důsledkem endocytózy je tudíž odstranění ligandů z povrchu buňky (Sorkin & von Zastrow 2009; Marchese et al. 2008).

Endocytóza a následná recyklace může hrát roli v resenzitizaci receptoru. Například u receptorů spřažených s G proteiny (G protein-coupled receptors, GPCR) je signalizace prostřednictvím G proteinů ukončena už díky fosforylaci receptoru a jeho interakci s proteinem β -arrestin. Endocytóza má potom za následek defosforylaci receptoru v endosomu a jeho recyklaci na plasmatickou membránu ve stavu, kdy je znovu schopen předávat signál (Calebiro et al. 2010).

Po endocytóze receptoru je jeho cytoplasmatická část stále v kontaktu s cytoplasmou a může tak interagovat s dalšími komponenty signální kaskády. U některých signálních drah bylo prokázáno, že endocytóza a vezikulární transport aktivovaných receptorů jsou využívány k přenosu signálu. Signalizace z endosomů může zajistit dostatečnou dobu a intenzitu signalizace, nebo i kvalitativně odlišný typ signálu, který vzniká až po endocytóze receptoru. Tento koncept „signalizujících endosomů“ pochází především z pozorování, že receptory pro epidermální růstový faktor (EGFR) jsou po stimulaci ligandem endocytovány a v endosomech zůstávají aktivní, asociované s komponenty MAPK signální kaskády a schopné aktivovat proteiny Ras (Di Guglielmo et al. 1994; Haugh et al. 1999). Dalším příkladem je tzv. retrográdní signalizace v neuronech, při které signální molekuly jako

nervový růstový faktor (NGF) aktivují receptory na distálním konci axonu a výsledný signál musí být transportován do jádra. Bylo ukázáno, že v případě NGF a jejich receptorů TrkA k tomu dochází prostřednictvím endosomů, které transportují aktivované receptory směrem k jádru, a že endocytóza společně s mikrotubulárním transportem jsou pro tuto signalizaci nezbytné (Delcroix et al. 2003; Watson et al. 2001; Wu et al. 2007).

Některé signální dráhy využívají složení endosomální membrány k aktivaci signalizace. TGF β (transforming growth factor β) signalizace vede k aktivaci transkripčních faktorů SMAD. Bylo objeveno, že aktivace SMAD2 je zprostředkována adaptorovým proteinem SARA (SMAD anchor for receptor activation), který je přítomný především na endosomální membráně díky své vazbě na fosfatidylinositol-3-fosfát (Hayes et al. 2002). Další vlastností endosomů, kterou mohou signální dráhy využívat, je jejich nízké pH. Signální dráha Notch vyžaduje pro přenos signálu dvě proteolytické štěpení receptoru, ke kterým dochází po jeho aktivaci. První štěpení vytváří extracelulární fragment receptoru, druhé štěpení vytváří intracelulární fragment, který funguje jako regulátor transkripce. Toto druhé štěpení vyžaduje funkční endocytózu a vezikulární transport. Jelikož je katalyzováno komplexem γ -sekretázy, která má optimální aktivitu při nízkém pH, bylo navrženo, že aktivovaný Notch receptor je endocytován a štěpen γ -sekretázou v endosomech (Vaccari et al. 2008). Je tedy patrné, že kromě negativní regulace může endocytóza různými mechanismy přispívat pozitivně k přenosu signálu.

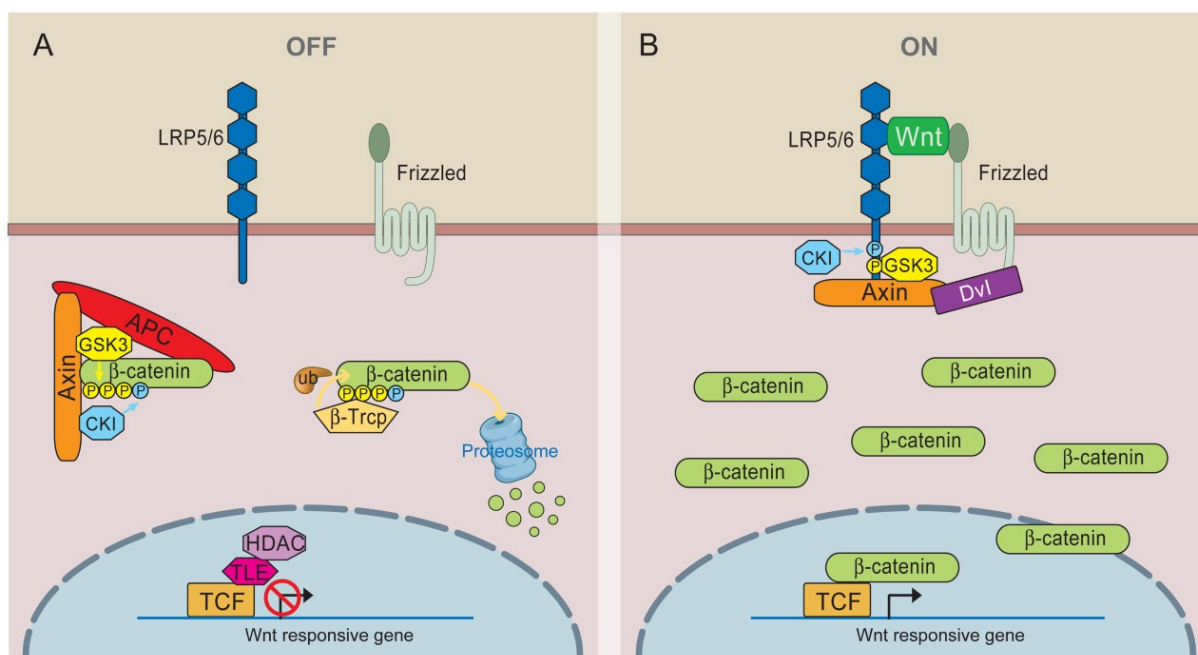
1.3. Wnt signalizace

Wnt signalizace je zprostředkována sekretovanými glykolipoproteiny z rodiny Wnt. Tato rodina byla pojmenována podle zakládajících členů - drozofilního genu *wingless* a myšího genu *Int1* (dnes označován jako *Wnt1*). Ještě před tím, než byla objevena homologie mezi těmito geny, byl gen *Int1* identifikován jako onkogen u myši a gen *wingless* charakterizován jako gen polarity segmentů nutný pro správný vývoj embrya octomilky. Proteiny této konzervované rodiny byly později nalezeny napříč živočišnou říší od žahavců po člověka a Wnt signalizace byla studována především na modelových organismech jako je háďátka (*Caenorhabditis elegans*), octomilka (*Drosophila melanogaster*), drápatka (*Xenopus laevis*), myš (*Mus musculus*), a na kulturách savčích buněk (Auerang & Nusse 2009).

Wnt signalizace řídí mnoho různých procesů ve vývoji živočichů včetně diferenciaci, proliferaci, migraci a polaritu buněk. U člověka se také účastní obnovy kmenových buněk a homeostatických procesů v různých tkáních. Deregulace Wnt signalizace je často spojena s

nádorovými onemocněními. U člověka obsahuje rodina Wnt 19 proteinů. Jako receptory pro Wnt ligandy působí proteiny z rodiny Frizzled. Ty obsahují 7 transmembránových domén a strukturně se podobají receptorům spřaženým s G proteiny (GPCR). Lidský genom obsahuje 10 různých receptorů rodiny Frizzled (MacDonald et al. 2009).

Různé kombinace Wnt ligandů a receptorů mohou aktivovat několik odlišných signálních drah. Tou nejlépe prostudovanou a vysoce konzervovanou dráhou je tzv. kanonická Wnt signalizace, která zahrnuje protein β -katenin a bývá označována též jako Wnt/ β -kateninová signalizace (Obr. 2).



Obr. 2: Model Wnt/ β -kateninové signální kaskády. Převzato z MacDonald et al. 2009.

Této signální dráhy se účastní kromě receptoru Frizzled ještě koreceptor LRP6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) či méně studovaný příbuzný protein LRP5 (Pinson et al. 2000). Klíčovým efektozem této signální dráhy je β -katenin. Ten je v klidovém stavu (Obr. 2A) fosforylován enzymy kasein kináza 1 (CK1) a glykogen syntáza kináza 3 (GSK3), které jsou součástí tzv. β -katenin destrukčního komplexu spolu s proteiny axin a APC (adenomatous polyposis coli) (Liu et al. 2002). Díky této fosforylaci je β -katenin rozeznáván E3 ubiquitin ligázou β -Trcp, je ubiquitinován a posléze degradován v proteasomu (Su et al. 2008). Po navázání Wnt ligandu (např. Wnt3a) na receptor Frizzled a tvorbě komplexu Frizzled-Wnt-LRP5/6 (Obr. 2B) dochází k fosforylaci adaptorového proteinu Dishevelled (Dvl) a jeho interakci s cytoplasmatickou částí receptoru Frizzled (Umbhauer et al. 2000). Dále dochází k fosforylaci cytoplasmatické části receptoru LRP5/6 kinázami CK1

a GSK3 a k vazbě axinu na fosforylovaný receptor LRP5/6 a na protein Dvl (Zeng et al. 2005; Itoh et al. 2000). Ačkoliv přesný mechanismus zatím není známý, tento proces vede k inaktivaci destrukčního komplexu a β -katenin přestává být fosforylován kinázou GSK3. Díky tomu není ubiquitinován a začíná se v buňce hromadit. Takto stabilizovaný β -katenin se dostává do jádra, kde společně s transkripčními faktory TCF (T cell factor) či LEF (lymphoid enhancing factor) aktivuje transkripci cílových genů (MacDonald et al. 2009). U drozofily se této signální dráhy účastní homologní proteiny, jejichž názvy budou v tomto textu také používány (Obr. 3).



Obr. 3: Schéma Wnt/ β -kateninové signalizace u drozofily a obratlovců. Upraveno podle Seto & Bellen, et al. 2004.

Kromě Wnt/ β -kateninové signalizace mohou některé kombinace Wnt ligandů a receptorů aktivovat tzv. nekanonické Wnt signální dráhy. Tyto dráhy využívají některé složky Wnt/ β -kateninové signalizace jako ligandy Wnt, receptory Frizzled a proteiny Dishevelled, ale nejsou založené na stabilizaci β -kateninu. Nekanonické signalizace se neúčastní receptory LRP5/6, ale mohou se jí účastnit tyrosinkinázové receptory Ror a Ryk, které pravděpodobně fungují jako koreceptory spolu s receptory Frizzled. Mezi tyto dráhy patří například Wnt/planar cell polarity (Wnt/PCP) signalizace a Wnt/ Ca^{2+} signalizace. Wnt/PCP signalizace aktivuje prostřednictvím receptorů Frizzled a adaptorových proteinů Dishevelled malé G proteiny RhoA, Rac, Jun N-terminální kinázu (JNK) a Rho-asociovanou kinázu. Tato signální dráha má vliv na polaritu buněk, migraci buněk a přestavbu cytoskeletu. Wnt/ Ca^{2+} signalizace způsobuje prostřednictvím trimerních G proteinů zvýšení

koncentrace Ca^{2+} a aktivaci calcium/calmodulin-dependentní kinázy II (CaMKII) a protein kinázy C (PKC), což může stimulovat migraci buněk (Gao & Chen 2010; Kikuchi et al. 2009).

2. Endocytóza ligandů a receptorů Wnt signální dráhy

Proteiny z rodiny Wnt jsou po navázání na receptory běžně endocytovány do buněk. To dokumentuje celá řada experimentů. Studie gradientu proteinu Wingless (Wg) v křídelním imaginálním disku drozofily ukázaly, že část proteinů Wg je lokalizována intracelulárně a je detekovatelná v podobě teček, jejichž počet klesá se vzdáleností od zdroje Wg. Navíc v klonech buněk mutantních v genu *shibire* (homolog dynaminu) není tento tečkovitý vzor patrný, a naopak je detekováno zvýšené množství extracelulárního Wg, což nasvědčuje, že tyto tečky odpovídají váčkům s internalizovaným Wg (Strigini & Cohen 2000). Některé z těchto váčků s internalizovaným Wg kolokalizují se značeným proteinem GFP-Rab5 jakožto markerem časných endosomů a některé s YFP-Rab7 jakožto markerem pozdních endosomů. Endogenní protein Wg je tedy endocytován a nachází se v časných endosomech i v pozdních endosomech (Marois et al. 2006).

Ve stejné tkáni bylo pozorováno, že na fluorescenčně označených endosomech protein Wg kolokalizuje jak se značeným receptorem Fz2 (Frizzled2) (Piddini et al. 2005), tak i s Arrow (homolog LRP5/6). To nasvědčuje tomu, že receptory Frizzled a Arrow jsou endocytovány spolu s ligandem Wg (Rives et al. 2006).

V kulturách lidských HEK buněk bylo pozorováno, že v intervalu 10 minut až 2 hodiny po přidání ligandu Wnt3a je značený receptor LRP6-GFP internalizován z plasmatické membrány a 1 hodinu po stimulaci kolokalizuje s EEA1 (early endosome antigen 1) a Rab5, což ukazuje na transport LRP6 do časných endosomů. 3 hodiny po stimulaci LRP6-GFP kolokalizuje se značeným proteinem Rab11, což značí recyklaci závislou na Rab11, a do 4 hodin se většina receptorů vrací zpět na plasmatickou membránu. Funkce proteinů Rab5 a Rab11 v internalizaci a recyklaci LRP6 byla ještě potvrzena expresí dominantně negativních forem těchto proteinů, kdy mutantní Rab5 potlačuje internalizaci a mutantní Rab11 snižuje množství LRP6-GFP na plasmatické membráně po 4 hodinách od stimulace. V podobných časových intervalech byla pozorována kolokalizace značeného receptoru Fz5-GFP s EEA1 a Rab5 a posléze se značeným Rab11 (Yamamoto et al. 2006). Studie endogenního LRP6 v kulturách myších fibroblastů potvrdily pomocí povrchové biotinylace, že k endocytóze LRP6 dochází už 10 minut po přidání Wnt3a a do 3 hodin je

většina receptorů recyklována na povrch (Khan et al. 2007). Receptory Frizzled i LRP6 jsou tedy krátce po stimulaci ligandem internalizovány a následně recyklovány.

Jelikož jsou receptory Wnt signalizace endocytovány spolu s ligandem, nabízí se možnost, že tyto receptory zprostředkovávají endocytózu ligandu a jsou tak pro endocytózu ligandu nezbytné. V křídelním disku drozofily klony buněk mutantních v genech *frizzled* a *frizzled2* (tudíž postrádající funkční Fz receptory) akumulují větší množství extracelulárního Wg a obsahují menší množství intracelulárních váčků s Wg než okolní tkáň (Piddini et al. 2005). V kulturách drozofilích S2R buněk je internalizace Wg silnější v buňkách, které mají zvýšenou expresi značeného Fz2. Naproti tomu exprese Frizzled2-GPI snižuje množství internalizovaného Wg jak v buněčných kulturách tak i v imaginálním disku (Frizzled2-GPI je protein tvořený extracelulární doménou Frizzled2 připojenou k membráně GPI kotvou. Tento protein váže Wg, ale nemá žádnou intracelulární doménu, tudíž nemůže stimulovat endocytózu.) (Piddini et al. 2005). Receptor Fz2 tedy zřejmě zprostředkovává endocytózu Wg. Přesto v imaginálním disku i klony buněk mutantních v genech *frizzled* a *frizzled2* nebo v genu *arrow* stále částečně internalizují Wg (Baeg et al. 2004; Rives et al. 2006). Je tedy možné, že k endocytóze Wg dochází i nezávisle na těchto receptorech, popřípadě je mezi receptorem Arrow a receptory Frizzled redundance ve schopnosti internalizovat Wg. Nakolik dochází k endocytóze Wg v buňkách, které nemají funkční receptory Frizzled ani Arrow, ale zatím nebylo studováno.

V současné době v kontextu Wnt/ β -kateninové signalizace existují doklady odhalující roli dvou endocytických drah - klatrinové a kaveolární. Tyto dvě možnosti se nevyklučují a v různých buněčných typech mohou přispívat různou měrou. Pro úlohu klatrinu svědčí studie na myších L buňkách s použitím ligandu Wg v médiu. Řada látek narušujících klatrinovou endocytózu v tomto případě redukuje internalizaci Wg a způsobuje akumulaci Wg na povrchu buněk a to v podobném rozsahu jako exprese mutantního dynaminu, který je pro klatrinovou endocytózu klíčový (Blitzer & Nusse 2006).

V kulturách lidských embryonálních buněk bylo prokázáno, že v buňkách, které jsou transfekovány značeným receptorem LRP6, je pro internalizaci LRP6 po stimulaci ligandem Wnt3a nutný kaveolin a LRP6 s kaveolinem kolokalizuje. Stejně tak v buňkách, které mají zvýšenou expresi obou receptorů LRP6 a Fz5, dochází ke kolokalizaci těchto receptorů s kaveolinem. Naproti tomu v buňkách, které exprimují jen značený receptor Fz5 (a LRP6 je přítomný pouze v endogenním množství), je pro internalizaci Fz5 nutný klatrin a nikoliv kaveolin a Fz5 kolokalizuje s klatrinem (Yamamoto et al. 2006). Receptor LRP6 tedy

pravděpodobně způsobuje kaveolární endocytózu receptorového komplexu na úkor klatrinové endocytózy.

Studie endogenního LRP6 ukázala, že v kulturách myších fibroblastů je internalizace endogenního LRP6 po přidání Wnt3a snížena jak inhibicí kaveolární endocytózy tak i klatrinové endocytózy (Khan et al. 2007). Za zmínku stojí, že použití stejných inhibitorů klatrinové endocytózy (monodansylkadaverin a siRNA proti klatrinu) nemělo vliv na endocytózu LRP6-GFP v předchozí práci (Yamamoto et al. 2006). K endocytóze Wnt ligandů a receptorů je tedy pravděpodobně využívána jak klatrinová tak kaveolární endocytická dráha, a výběr z těchto dvou drah může záviset na zastoupení receptorů či na buněčném typu.

3. Role endocytózy v přenosu signálu ve Wnt signální kaskádě

Velmi aktuální otázkou ve Wnt signalizaci je, zda endocytóza pozitivně přispívá k přenosu signálu v přijímajících buňkách, podobně jako tomu je u několika dalších studovaných signálních drah (viz kapitola 1.2.). Několik novějších studií nasvědčují tomu, že endocytóza je součástí Wnt signální kaskády jak u Wnt/ β -kateninové signalizace (Obr. 6b) tak u nekanonické Wnt signalizace (Obr. 6a).

3.1. Wnt/ β -kateninová signalizace

V pokusech na křídelním disku drozofily bylo pomocí exprese dominantně negativní formy genu *shibire* potlačena endocytóza v buňkách přijímajících Wg. V této tkáni bylo pozorováno zvýšené množství extracelulárního Wg, přesto byla výrazně snižena úroveň exprese cílových genů Wnt signalizace. Podobný výsledek byl pozorován po expresi dominantně negativního Rab5 (Seto & Bellen 2006). V obou případech je nejvýrazněji snížena exprese genu *senseless*, která vyžaduje vysokou úroveň Wnt signalizace, což značí, že endocytóza je nezbytná pro plnohodnotnou aktivaci Wnt signalizace. Oproti tomu exprese cílového genu *distal-less*, která vyžaduje nižší úroveň signalizace, je redukována méně, tudíž k úplnému umlčení Wnt signalizace zřejmě nedochází. Stejně tak v S2R buňkách, které mají experimentálně sníženou hladinu dynaminu či Rab5, je snížena aktivita Wnt reportéru TOPFlash (Seto & Bellen 2006). Zmíněný TOPFlash reportérový systém je založen na plasmidu, který obsahuje gen pro luciferázu umístěný za minimálním promotorem a

TCF/LEF vazebnými místy. To umožňuje měřit aktivitu Wnt signalizace pomocí aktivity nově produkované luciferázy (Korinek et al. 1997).

Hlavním problémem ale je, že přerušení endocytózy pomocí inhibice dynaminu či Rab5 má mnoho vedlejších efektů a může ovlivňovat Wnt signalizaci i nepřímo. Expresi dominantně negativního Rab5 v křídelním disku má překvapivě za následek zvýšení transkripce *frizzled2* a snížení transkripce *arrow* (Marois et al. 2006). Klony buněk mutantní v genu *shibire* nebo exprimující dominantně negativní Rab5 vykazují zároveň sníženou expresi genu *engrailed*, což ukazuje na nespécifické snížení exprese více genů v těchto klonech (Rives et al. 2006). Navíc již dříve bylo publikováno, že při použití jiného kontrolního vektoru v TOPFlash reportérové eseji dochází po snížení exprese Rab5 naopak ke zvýšení reportérové aktivity (DasGupta et al. 2005; Rives et al. 2006). Seto a Bellen proto použili více různých vektorů a rozpor uzavřeli tím, že ve většině případů dochází po snížení exprese Rab5 k redukci TOPFlash aktivity (Seto & Bellen 2006). Také bylo zjištěno, že při zvýšené expresi Rab5 je částečně inhibována aktivace TOPFlash reportéru pomocí aktivní formy β -kateninu (která nemůže být fosforylována GSK-3), což potvrzuje, že Rab5 může hrát ve Wnt signalizaci více rolí, například podporovat signalizaci na úrovni endocytózy receptorů a inhibovat ji na úrovni aktivity transkripčních faktorů TCF/LEF (Yamamoto et al. 2006).

Proteiny Rab5 a dynamin hrají roli v klatrinové i kaveolární endocytické dráze (Doherty & McMahon 2009; Hansen & Nichols 2010). Přestože je úloha těchto proteinů v aktivaci Wnt signalizace těžko uchopitelná, existují další doklady potvrzující úlohu klatrinové i kaveolární endocytózy v přenosu signálu v přijímajících buňkách. Na kulturách myších buněk bylo ukázáno, že stejné inhibitory klatrinové endocytózy, které naruší internalizaci Wg (monodansylkadaverin, chlorpromazin, hypertonická sacharóza), naruší i Wnt signalizaci měřenou TOPFlash reportérem nebo vzestupem celkového množství β -kateninu v buňce po stimulaci Wnt3a. Podobný efekt má snížení exprese těžkého řetězce klatrinu pomocí siRNA (Blitzer & Nusse 2006).

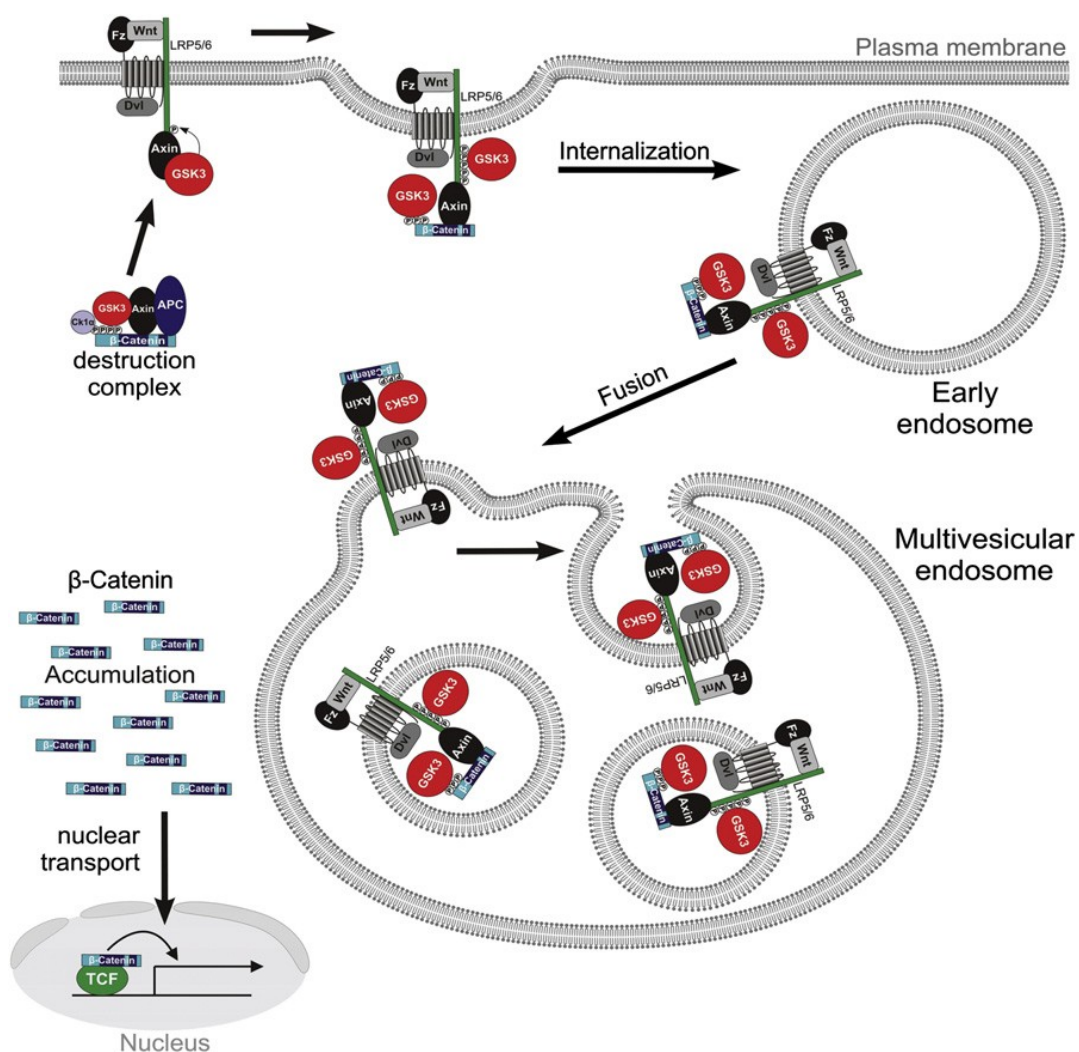
Podstatným proteinem v klatrinové endocytóze signálních receptorů je β -arrestin, který se váže na fosforylované intracelulární domény aktivovaných GPCR, a tím způsobuje jejich desenzitizaci a poté i internalizaci prostřednictvím interakce s klatrinem a AP-2 (Calebiro et al. 2010). Receptory Frizzled, ačkoliv jsou strukturně příbuzné GPCR, pravděpodobně přímo neinteragují s β -arrestiny. V kontextu Wnt/ β -kateninové signalizace bylo ale prokázáno, že β -arrestin1 se váže na protein Dvl, a že tato interakce je posílena fosforylací Dvl, ke které dochází po aktivaci Frizzled receptoru. β -arrestin1 se tedy tímto

způsobem nepřímo váže na aktivovaný receptor Frizzled prostřednictvím proteinu Dvl, což může vést ke klatrinové endocytóze aktivovaných receptorů. V kulturách HEK buněk navíc β -arrestin1 posiluje Wnt/ β -kateninovou signalizaci, pravděpodobně na úrovni receptorů (Chen et al. 2001). Podobně tak v kulturách myších fibroblastů je endogenní β -arrestin1 i β -arrestin2 nezbytný pro Wnt/ β -kateninovou signalizaci, stejně jako endogenní β -arrestin *in vivo* v *Xenopus laevis*. Navíc β -arrestin přispívá k utváření komplexu mezi axinem a fosforylovaným Dvl, což může přímo přispívat k inaktivaci β -katenin-destrukčního komplexu (Bryja et al. 2007). β -arrestin tedy hraje pozitivní roli ve Wnt/ β -kateninové signalizaci, ale zatím není jisté, zda tato role souvisí přímo s endocytózou signálních receptorů.

Jiný model staví na pozorování, že koreceptor LRP6 je internalizován kaveolární endocytózou. Koreceptor LRP6 je po stimulaci Wnt3a fosforylován kinázami GSK3 a CK1. Tato fosforylace vede k vazbě intracelulární domény LRP6 na axin a je nutná pro stabilizaci β -kateninu (Zeng et al. 2005). Na kulturách HEK buněk bylo prokázáno, že po přidání Wnt3a zároveň dochází k vazbě LRP6-GFP na kaveolin-1 a kaveolární endocytóze značeného LRP6 společně s axinem. Narušení kaveolární endocytózy pomocí siRNA proti kaveolinu-1 má za následek, že po přidání Wnt3a nedochází k internalizaci LRP6 ani k akumulaci β -kateninu. To nasvědčuje tomu, že Wnt ligand spouští kaveolární endocytózu komplexu LRP6 s axinem, a že tento proces je nezbytný pro stabilizaci β -kateninu (Obr. 6b) (Yamamoto et al. 2006). Velkým otazníkem ale zůstává fyziologická relevance a možnost zobecnění těchto výsledků, jelikož u drozofily neexistují kaveoliny a navíc myši defektní v kaveolinu-1, 2, nebo 3 nevykazují žádný defekt Wnt signalizace (Le Lay & Kurzchalia 2005).

Nedávno byl navržen nový model Wnt signalizace, který zahrnuje endocytózu receptorů a dalších komponent Wnt signální dráhy, a objasňuje tak jednu z možných rolí endocytózy ve Wnt signální kaskádě. V tomto modelu dochází ke stabilizaci β -kateninu následkem internalizace GSK3 a uvěznění tohoto enzymu v multivezikulárních tělíkách (MVB) (Taelman et al. 2010). Inhibice GSK3 je klíčovým krokem Wnt/ β -kateninové signalizace a její molekulární mechanismus není zatím plně vysvětlen (Wu & Pan 2010). Taelman et al. pozorovali, že stimulace Wnt překvapivě nemění aktivitu GSK3 v buněčných extraktech připravených s detergentem Triton X-100, který rozpouští všechny membrány. Naproti tomu v extraktech buněk připravených pomocí digitoninu, který permeabilizuje jen plasmatickou membránu, aktivita GSK3 po stimulaci Wnt klesá. To znamená, že aktivita GSK3 v cytosolu klesá, ale celková aktivita GSK3 v buňce nikoliv, což značí přemístění GSK3 do některého z membránových kompartmentů. V experimentech na buněčných

kulturách ukázali, že značený protein Wnt je endocytován a akumuluje se ve stejných váčkách jako značený protein GSK3, přičemž množství GSK3 v cytosolu klesá. Endogenní GSK3 po aktivaci Wnt signalizace také kolokalizuje se značeným Rab7 a je chráněn před degradací Proteinázou K v buňkách permeabilizovaných digitoninem, což potvrzuje akumulaci GSK3 uvnitř membránového kompartmentu. Pomocí elektronové mikroskopie bylo ověřeno, že v buňkách stimulovaných Wnt se endogenní GSK3 nachází uvnitř MVB, zatímco v kontrolních buňkách převážně v cytosolu. Na podporu hypotézy, že tento proces je nutný pro přenos signálu a stabilizaci β -kateninu, se autoři zaměřili na proteiny nutné pro tvorbu vnitřních váčků MVB. Inhibice proteinů HRS nebo Vps4 (vacuolar protein sorting 4), dvou komponent ESCRT komplexů, zabraňuje relokizaci GSK3 do MVB po aktivaci Wnt signalizace a zároveň blokuje Wnt/ β -kateninovou signalizaci jak v kulturách HEK buněk tak v embryích *Xenopus laevis* (Taelman et al. 2010).



Obr. 4: Model Wnt/ β -kateninové signalizace zprostředkované uvězněním GSK3 uvnitř multivezikulárních tělísek (MVB). Převzato z Taelman et al., 2010.

Je známo, že po stimulaci receptorů LRP6 a Frizzled dochází k agregaci LRP6, Frizzled, Dvl, axinu a GSK3 na plasmatické membráně (Bilic et al. 2007). Taelman et al. navrhuje model, při kterém dochází k endocytóze těchto agregací a následnému transportu do MVB. Po vytvoření vnitřního váčku MVB je GSK3 odděleno dvěma membránami od cytosolu. β -katenin se dostává do vnitřních váčků MVB spolu s GSK3 a dokonce je pro uvěznění GSK3 nezbytný, ale po dostatečném vyčerpání GSK3 v cytosolu začíná docházet ke stabilizaci volného cytosolického β -kateninu (Obr. 4) (Taelman et al. 2010).

Ačkoliv tato studie prokazuje, že protein HRS je nutný pro Wnt/ β -kateninovou signalizaci v kulturách lidských buněk a *in vivo* v *Xenopus laevis*, několik předchozích studií na drozofile došlo k jiným výsledkům. V kulturách S2 buněk, odvozených z drozofily, snížení exprese HRS pomocí dsRNA nemá vliv na aktivitu reportéru Wnt/ β -kateninové signalizace (Rives et al. 2006). V křídelních imaginálních discích drozofily nebyla sledována změna v expresi cílových genů Wnt/ β -kateninové signalizace v *hrs* mutantních klonech (Rives et al. 2006). V jiné studii bylo dokonce pozorováno zvýšení exprese cílových genů v *hrs* mutantních klonech (Seto & Bellen 2006). Tento rozpor tedy zůstává otevřený. Jedna možnost je, že v drozofile dochází v určité míře k tvorbě MVB i v absenci HRS. Druhá možnost je, že v drozofile není tvorba MVB pro Wnt/ β -kateninovou signalizaci nutná.

Navíc pokud by v endosomech „pouze“ pokračovala signalizace stejným způsobem, jakým probíhá na membráně, a receptory by transportem do MVB prošly samotné, tj. bez asociace s degradačním komplexem, tak by cílení receptorů do MVB mělo naopak za následek terminaci signalizace, jelikož dochází k oddělení cytoplasmatických domén receptorů od cytosolu. Podobně tomu je u tyrosinkinázových receptorů, kde HRS hraje roli v terminaci signalizace (Lloyd et al. 2002). U Wnt signalizace ale není prokázáno, že by docházelo k terminaci signalizace v endosomech.

Tento model má ještě jednu „slabinu“. Proteiny, které se dostanou do vnitřních váčků MVB, by podle očekávání měly být degradovány v lysosomu. Zdá se ale, že stimulace Wnt ligandem nezpůsobuje lysosomální degradaci GSK3 (Taelman et al. 2010), ani LRP6 (Khan et al. 2007), ani receptorů Frizzled (Terabayashi et al. 2009; Mukai et al. 2010). Zda mohou tyto proteiny z vnitřních váčků MVB uniknout před degradací zůstává nevyjasněno.

Ačkoliv zůstává mnoho otázek nezodpovězených, je pravděpodobné, že endocytóza aktivovaných receptorů přispívá k přenosu signálu ve Wnt/ β -kateninové signalizaci. V tomto ději může hrát roli klatrinová i kaveolární endocytická dráha a proces uvěznění enzymu GSK3 do MVB.

3.2. Nekanonická Wnt signalizace

V signálních drahách patřících do tzv. nekanonické Wnt signalizace nefiguruje β -katenin ani GSK3. Pokud endocytóza přispívá k přenosu signálu i v těchto signálních drahách, bude k tomu tedy docházet jiným způsobem než u Wnt/ β -kateninové signalizace.

Wnt5a patří mezi ligandy aktivující nekanonickou Wnt dráhu. V kulturách HEK buněk je značený receptor Frizzled4 endocytován po stimulaci Wnt5a. Tomuto procesu zabráňují inhibitory klatrinové endocytózy a siRNA proti β -arrestinu2 a nikoliv siRNA proti β -arrestinu1 (Chen et al. 2003). β -arrestin2 je další člen β -arrestin rodiny, který se může funkčně lišit od β -arrestinu1 (Zhang et al. 2005). Frizzled4 je tedy pravděpodobně internalizován pomocí klatrinu a β -arrestinu2. Protein Dvl je potřeba pro přemístění β -arrestinu2 k membráně a zároveň zvyšuje interakci mezi Frizzled4 a β -arrestinem2. Dvl tedy zprostředkovává vazbu mezi receptorem Frizzled a β -arrestinem, podobně jako tomu je u Wnt/ β -kateninové signalizace (Chen et al. 2003). V HeLa buňkách Wnt5a spouští internalizaci Frizzled2 pomocí klatrinové endocytické dráhy a proteinů β -arrestin2, Dvl a koreceptorů Ror. Inhibice klatrinové endocytózy potlačuje schopnost ligandu Wnt5a aktivovat protein Rac. Klatrinová endocytóza Frizzled receptorů tedy může být nutná pro aktivaci nekanonické Wnt signalizace (Sato et al. 2010).

U *Xenopus laevis* je β -arrestin2 potřeba pro aktivaci RhoA v rámci Wnt/PCP signalizace, jelikož inhibice translace β -arrestinu2 vede k defektům této signální dráhy (Kim & J. Han 2007). Dále bylo u *Xenopus laevis* prokázáno, že ligand Wnt11 spouští endocytózu Frizzled7, a k tomuto procesu je zapotřebí koreceptor Ryk (Kim et al. 2008).

Kromě β -arrestinu protein Dvl interaguje i přímo s proteinem AP-2, hlavním adaptorovým proteinem klatrinové endocytózy. Tato interakce se zdá být nutná pro endocytózu Frizzled4 spouštěnou ligandem Wnt-5a, jelikož exprese Dvl s mutací v doméně nutné pro tuto vazbu zabráňuje endocytóze Frizzled4. Využitím stejných mutací v experimentech na embryích *Xenopus laevis* bylo ukázáno, že interakce mezi Dvl a AP-2 je potřeba specificky pro Wnt/PCP signalizaci, a ne pro Wnt/ β -kateninovou signalizaci (Yu et al. 2007). Klatrinová endocytóza spolu s proteiny β -arrestin2 a AP-2 tedy hraje roli v přenosu signálu nekanonické Wnt signalizace, ačkoliv mechanismus tohoto jevu zatím není známý (Obr. 6a).

4. Role endocytózy v regulaci koncentrace Wnt ligandu

Wnt ligandy fungují jako morfogeny - šíří se od zdroje a tvoří koncentrační gradient, čímž určují různou buněčnou odpověď v různých místech tkáně. Tvorba stabilního koncentračního gradientu vyžaduje kromě produkce difuzibilního ligandu i jeho degradaci. Degradace morfogenů může být zajišťována například pomocí extracelulárních proteáz nebo lysosomální degradací internalizovaného ligandu. Endocytóza tak může odstraňovat ligand z extracelulárního prostoru a regulovat jeho distribuci v tkáni.

Wnt ligandy mají díky svým lipidovým modifikacím hydrofobní charakter a asociují s membránami (Willert et al. 2003). Přesto se šíří extracelulárním prostorem (Strigini & Cohen 2000). Jedním modelem transportu Wnt je difúze s pomocí heparan sulfát proteoglykanů (HSPG) přítomných na buněčném povrchu. Wnt může interagovat s polysacharidovými řetězci na molekulách HSPG a přesakovat z jednoho na druhý, což umožňuje šíření Wnt mezi buňkami (Han et al. 2005). Druhým modelem je transport Wnt v lipoproteinových částicích, které mohou putovat mezibuněčným prostorem (Panáková et al. 2005; Neumann et al. 2009).

Distribuce Wnt ligandu je nejlépe prostudována na křídelním imaginálním disku a embryonální epidermis drozofily. V křídelním disku je protein Wingless (Wg) produkován pásem širokým 4-5 buněk ležících na dorzoventrální hranici disku, tvoří symetrický gradient a aktivuje různé cílové geny v závislosti na koncentraci až do vzdálenosti 25 buněk (Cadigan et al. 1998). V embryonální epidermis octomilky je protein Wg produkován řadou buněk v každém tělním segmentu a tvoří asymetrický gradient s větší distribucí Wg a vyšší úrovní signalizace anteriorně (3-4 buňky) než posteriorně (1 buňka) od produkující řady buněk (Dubois et al. 2001), přičemž v této asymetrii hraje roli regulovaná endocytóza ligandu (viz dále).

Protein Wingless je degradován v lysosomech jak v embryonální epidermis (Dubois et al. 2001) tak v křídelním disku (Piddini et al. 2005). To vychází z experimentů s fúzním proteinem křenová peroxidáza-Wingless (HRP-Wg). Protein HRP má relativně vysokou stabilitu v pozdních endosomech a lysosomech, a to i když je součástí fúzního proteinu, tudíž přetrvává v lysosomu i po degradaci samotného Wg. Přítomnost proteinu HRP pak může být detekována elektronovou mikroskopií po přeměně diaminobenzidinu na elektrondensní produkt (Dubois et al. 2001).

Ačkoliv receptor Fz2 zprostředkovává endocytózu Wg (viz kapitola 2), uměle zvýšená exprese Fz2 vede překvapivě ke stabilizaci Wg v embryu i v křídelním disku

(Cadigan et al. 1998; Piddini et al. 2005). Naopak overexprese obou koreceptorů Fz2 a Arrow vede k úbytku Wg. Tento úbytek je závislý na endocytóze, jelikož v *shibire* mutantní tkáni k němu nedochází. Zvýšená exprese samotného receptoru Arrow nemá na distribuci Wg vliv. Receptory Fz2 a Arrow tedy pravděpodobně spolupracují při degradaci Wg, přičemž Fz2 je nutný pro internalizaci a Arrow pro cílení do lysosomů (Piddini et al. 2005). Roli receptoru Arrow v lysosomální degradaci Wg potvrzuje i experiment, při kterém redukce proteinu Arrow pomocí RNAi vede ke hromadění Wg v endosomech bez následného odbourání v lysosomech (Marois et al. 2006). Jelikož receptor Arrow je nutný pro Wg signalizaci, může být takto spřažena signalizace s následnou degradací ligandu.

Endocytóza a lysosomální transport tedy přispívá k degradaci Wg a umožňuje tak tvorbu stabilního gradientu. Celkový vliv endocytózy na množství extracelulárního Wg je ale komplikovanější. V křídelním disku klony buněk mutantních v genu *shibire* akumulují extracelulární Wg (Strigini & Cohen 2000; Marois et al. 2006). Podobně v embryonální epidermis je rozšířená distribuce Wg v embryích mutantních v *klatrinu* (Dubois et al. 2001). Starší studie na embryích s teplotně senzitivní mutací genu *shibire* naopak ukázala, že ztráta funkce *shibire* má za následek zúžení distribuce Wg a akumulaci Wg v oblasti produkujících buněk. To bylo interpretováno tak, že endocytóza přispívá šíření Wg v tkáni pomocí transcytózy - endocytózy následované transportem váčku skrz buňku a exocytózou na opačné straně buňky (Bejsovec & Wieschaus 1995; Moline et al. 1999). Částečně je tento spor vysvětlen experimenty na křídelním disku. Zaprvé se v této tkáni Wg šíří i přes *shibire* mutantní klony buněk, tudíž endocytóza není přímo pro transport Wg potřeba. Zadruhé ztráta funkce *shibire* v celém křídelním disku má za následek úbytek extracelulárního Wg doprovázený akumulací intracelulárního Wg v produkujících buňkách. Dynamin/Shibire je tedy spíše potřeba pro sekreci Wg než pro jeho šíření (Strigini & Cohen 2000). Jeden z možných mechanismů tohoto jevu souvisí s transmembránovým proteinem Wntless (Wls), který v Golgiho aparátu interaguje s Wnt a napomáhá jeho sekreci. Tím se Wls dostává na plasmatickou membránu, odkud může být endocytován a pomocí retromerového komplexu transportován zpět do Golgiho aparátu, kde může přispívat k sekreci dalších molekul Wg (Belenkaya et al. 2008). Navíc exprese dominantně negativního *shibire* v produkujících buňkách vede neznámým způsobem ke snížení transkripce Wg (Seto & Bellen 2006). Tudíž endocytóza reguluje distribuci Wnt ligandu už v produkujících buňkách tím, že pozitivně přispívá k jeho sekreci. V okolní tkáni zřejmě endocytóza hraje roli především v degradaci ligandu.

V embryonální epidermis přispívá endocytóza a následná degradace Wg k tvorbě asymetrického gradientu. Sledováním fúzního proteinu HRP-Wg bylo zjištěno, že na anteriorní straně od zdroje Wg je přítomno více váčků s HRP-Wg než na posteriorní straně. Naproti tomu na posteriorní straně je přítomno více váčků obsahujících jen protein HRP jakožto stopu po degradovaném fúzním proteinu. Na obou stranách od zdroje tedy dochází k endocytóze Wg, ale buňky na posteriorní straně degradují Wg více než buňky na anteriorní straně, kde protein Wg přetrvává v časných endosomech a může být potenciačně recyklován. Redukce endocytózy pomocí mutace *klatrinu* vede k posílení Wnt signalizace na posteriorní straně. Regulovaná endocytóza a vezikulární transport Wg tak v této tkáni přispívá k asymetrické distribuci Wg a k utlumení Wnt signalizace na posteriorní straně, ačkoliv mechanismus této regulace není zcela známý (Dubois et al. 2001). Je více možností, jak zvýšená lysosomální degradace může tlumit signalizaci. Na anteriorní straně může docházet více k recyklaci Wg na úkor degradace, či může docházet delší dobu k signalizaci z endosomů, popřípadě na posteriorní straně může být endocytóza Wg zprostředkována jinými receptory a být tak odpřažena od signalizace. Je známo, že v embryonální epidermis dochází k recyklaci Wg (Pfeiffer et al. 2002). Tudíž je možné, že distribuce Wg je regulována rovnováhou mezi recyklací a lysosomální degradací. V křídelním disku ale recyklace zřejmě nepřispívá k distribuci Wg, jelikož exprese dominantně negativních proteinů Rab4 a Rab11 nemá žádný efekt na množství extracelulárního ani intracelulárního Wg (Marois et al. 2006). Zůstává tedy nezodpovězeno, zda je recyklace Wg potřeba pro distribuci Wg v embryonální epidermis, a jak přesně v této tkáni souvisí zvýšená degradace Wg se sníženou Wnt signalizací. Podstatným cílem výzkumu by také mělo být odlišení obecně platných mechanismů vezikulárního transportu Wnt ligandů od těch tkáňově specifických.

5. Role endocytózy v regulaci receptorů Wnt signalizace

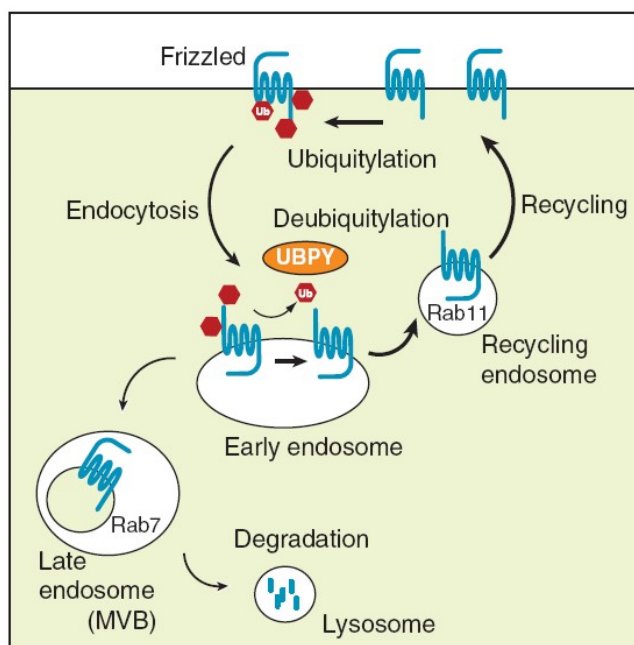
Buněčná odpověď na signalizaci je kromě koncentrace ligandu určena i stavem cílové buňky a její citlivostí na daný signál. Jedním z klíčových faktorů v citlivosti na signál může být počet receptorů na plasmatické membráně. Ten je mimo jiné regulován pomocí endocytózy a vezikulárního transportu. Signální receptor může být endocytován po stimulaci svým ligandem, ale také nezávisle na ligandu či po interakci s jiným ligandem, který nespouští signalizaci. Po internalizaci mohou být receptory recyklovány zpět na plasmatickou membránu nebo transportovány do lysosomů a následně degradovány.

5.1. Endocytóza receptoru Frizzled

Na kulturách savčích buněk bylo ukázáno, že receptory Frizzled endocytované po stimulaci Wnt jsou z významné části recyklovány pomocí Rab11-pozitivních endosomů (viz kapitola 2). Navíc stimulace buněk ligandem Wnt3a neovlivňuje degradaci značeného Fz5 v HEK buňkách ani značeného Fz4 v HeLa buňkách (Terabayashi et al. 2009; Mukai et al. 2010). Endocytóza Frizzled stimulovaná Wnt ligandem tedy zřejmě nevede k významné lysosomální degradaci tohoto receptoru, ale jen k dočasnému odstranění receptorů z membrány a následné recyklaci. Naproti tomu v křídelním disku drozofily bylo ukázáno, že v klonech buněk mutantních v genu *hrs* dochází k akumulaci receptorů Fz2 v endosomech. Jelikož protein HRS je nutný pro třídění receptorů do MVB a následnou degradaci, je pravděpodobné, že i receptor Fz2 je degradován touto cestou (Rives et al. 2006). Tento rozpor může být způsoben rozdíly mezi organismy a tkáněmi. Další možností je, že k endocytóze a lysosomální degradaci receptorů Frizzled dochází i nezávisle na stimulaci Wnt ligandem.

Nedávno bylo objeveno, že receptor Frizzled je ubiquitinován a tato modifikace hraje roli v transportu receptoru Frizzled do lysosomů (Mukai et al. 2010). Podobně je tomu u tyrosinkinázových receptorů a některých GPCR, kde stimulace ligandem vede k endocytóze a ubiquitinaci receptoru a následnému transportu ubiquitinovaných receptorů do lysosomů pomocí ESCRT komplexů, které rozpoznávají ubiquitin a transportují receptory do vnitřních váček MVB (Sorkin & von Zastrow 2009). V HeLa buňkách je receptor Frizzled4 ubiquitinován neznámým enzymem a deubiquitinován enzymem UBPY (ubiquitin-specific protease 8). Narozdíl od výše zmíněného modelu není ubiquitinace Fz4 ovlivněna stimulací ligandem (Wnt3a). Stejně tak vazba UBPY na Fz4 není ovlivněna stimulací Wnt3a. Úroveň ubiquitinace receptoru Frizzled tedy není regulována přítomností ligandu. Povrchová biotinylace značeného receptoru Fz4 ukázala, že tento receptor je nepřetržitě endocytován a degradován v lysosomu a stimulace ligandem na rychlost degradace nemá vliv. Expres konstitutivně aktivní formy enzymu UBPY inhibuje degradaci Fz4, zvyšuje množství deubiquitinovaného Fz4 a množství Fz4 na povrchu buňky. Enzym UBPY tak pomocí deubiquitinace receptoru Frizzled zabraňuje jeho degradaci a zvyšuje počet jeho molekul na plasmatické membráně. V křídelním disku drozofily enzym UBPY podobně reguluje množství Fz2 na povrchu buněk. Uměle zvýšená exprese enzymu UBPY nesnižuje množství váček s Fz2, ale snižuje kolokalizaci mezi značeným Fz2 a Rab7, což značí, že deubiquitinace Fz2 chrání receptor před akumulací v pozdních endosomech a umožňuje jeho

recyklaci. Snížení exprese endogenního UBPY vede k defektu ve Wnt signalizaci v křídelním disku drozofily a současná overexprese Fz2 vede k potlačení tohoto defektu. Podobně i v kulturách savčích buněk stimulovaných Wnt3a je endogenní UBPY pozitivním regulátorem Wnt signalizace. Endogenní UBPY tak v buňkách savců i drozofily posiluje Wnt signalizaci tím, že zvyšuje počet receptorů na plasmatické membráně (Mukai et al. 2010). Receptor Frizzled je tedy endocytován a ubiquitinován nezávisle na stimulaci ligandem. Rovnováha mezi ubiquitinací a deubiquitinací receptoru Frizzled určuje poměr mezi lysosomální degradací a recyklací receptoru a tím i jeho množství na plasmatické membráně. V případě, že je množství receptoru Frizzled limitujícím faktorem, může tato rovnováha významně regulovat citlivost buňky na Wnt signalizaci. Zatím se ale neví, čím je ubiquitinace a deubiquitinace Frizzled receptoru regulována.



Obr. 5: Model regulace receptoru Frizzled pomocí ubiquitinace a deubiquitinace. Převzato z Mukai et al. 2010.

Dalším proteinem, který hraje roli v lysosomální degradaci receptoru Frizzled je kináza CVAK104 (coated vesicle-associated kinase of 104 kDa) (Terabayashi et al. 2009). Tento protein interaguje s klatrinem a AP-2 a je schopný fosforylovat β -podjednotku AP-2 (Conner & Schmid 2005). V kulturách lidských HEK buněk protein CVAK104 interaguje specificky s receptorem Frizzled5 a nikoliv s ostatními receptory rodiny Frizzled. Expresí CVAK104 v těchto buňkách vede specificky k internalizaci značeného receptoru Frizzled5 a tato internalizace je potlačena jak inhibicí klatrinové endocytózy tak expresí dominantně negativního proteinu Rab5. Především ale zvýšení exprese CVAK104 vede k lysosomální

degradaci značeného receptoru Frizzled5 a naopak snížení exprese endogenního CVAK104 pomocí siRNA vede k akumulaci Frizzled5 v buňce. Protein CVAK104 negativně reguluje Wnt signalizaci, jelikož snížení exprese endogenního CVAK104 snižuje TOPFLASH reportérovou aktivitu po stimulaci HEK buněk ligandem Wnt3a (Terabayashi et al. 2009). Kináza CVAK104 tedy specificky spouští klatrinovou endocytózu receptoru Frizzled5 a takto internalizovaný receptor je degradován v lysosomu. Úbytek receptoru Frizzled5 na plasmatické membráně má za následek pokles Wnt signalizace, a to především v tkáních kde Frizzled5 má jako receptor dominantní roli.

Tyto nové výsledky ukazují, že množství receptorů Frizzled na plasmatické membráně je regulováno pomocí endocytózy a lysosomální degradace. Nabízí se otázka, zda tato lysosomální degradace Frizzled5 pomocí CVAK104 je také závislá na ubiquitinaci Frizzled5 a zda CVAK104 potencionálně nezpůsobuje ubiquitinaci Frizzled5. Dále vyvstává možnost, že mohou existovat další proteiny, které specificky regulují lysosomální degradaci ostatních receptorů Frizzled rodiny. Pro porozumnění regulace Frizzled receptorů endocytózou bude dále nutné identifikovat konkrétní ubiquitin ligázu zodpovědnou za ubiquitinaci Frizzled receptorů a objasnit jakým způsobem je regulována tato ubiquitin ligáza a jakým způsobem je regulován enzym UBPY.

5.2. Endocytóza receptoru LRP6

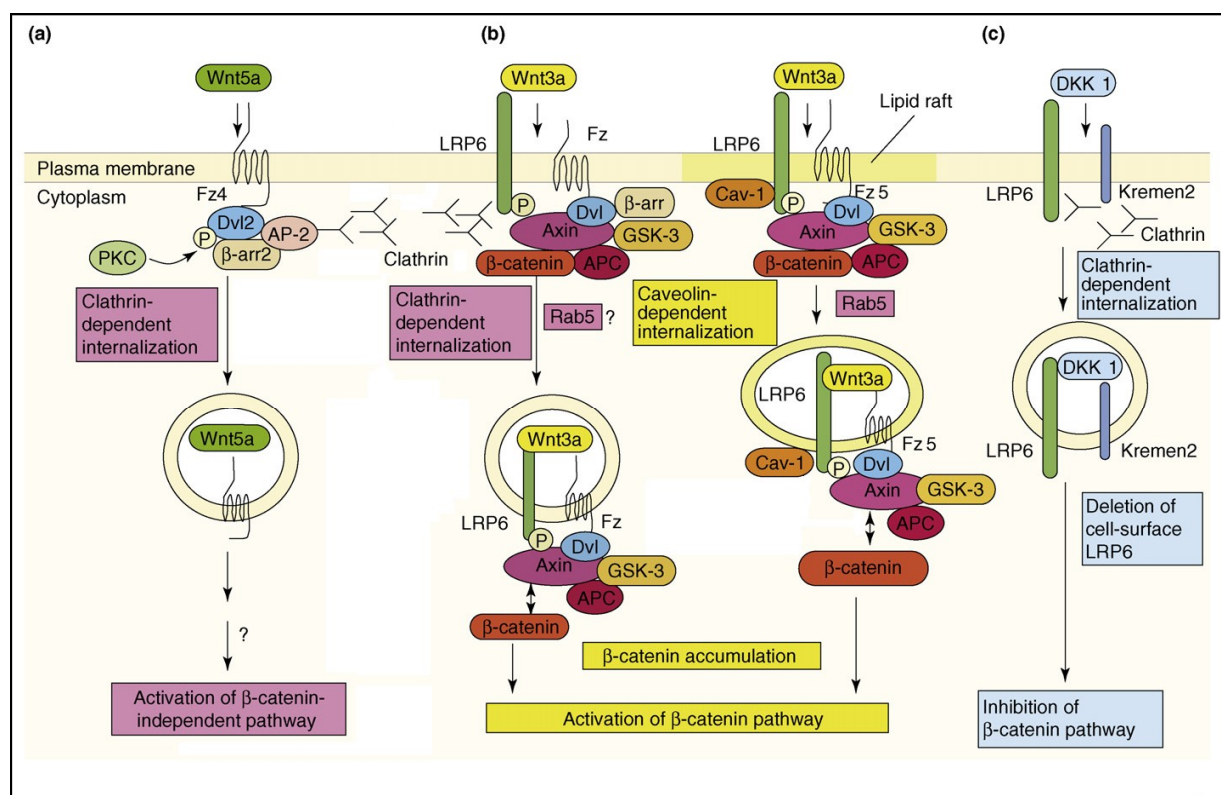
Stejně jako receptory Frizzled, i receptory LRP6 jsou v kulturách savčích buněk po stimulaci Wnt ligandem recyklovány pomocí Rab11-pozitivních endosomů (viz kapitola 2) a jejich degradace není ovlivněna stimulací Wnt ligandem (Khan et al. 2007). Stejně jako v případě Frizzled je receptor Arrow v křídle drozofily degradován pomocí proteinu HRS a třídění do MVB (Rives et al. 2006). I pro receptor LRP6 bylo prokázáno, že může být endocytován bez navázaného Wnt ligandu, tudíž v neaktivovaném stavu.

Endocytóza receptoru LRP6 může být spuštěná vazbou proteinu Dickkopf1 (Dkk1) (Obr. 6c) (Mao et al. 2002). Protein Dkk1 je přítomný u obratlovců a nikoliv u drozofily či *Caenorhabditis elegans*. Tento sekretovaný protein působí jako antagonist Wnt/ β -kateninové signalizace a hraje roli v embryogenezi obratlovců, především v procesech vývoje hlavy a končetin (Glinka et al. 1998; Mukhopadhyay et al. 2001). Dkk1 se váže na receptor LRP6 (Seměnov et al. 2001). Existují dva mechanismy, jakým způsobem může Dkk1 inhibovat Wnt signalizaci. První z nich je založen na pozorování, že Dkk1 inhibuje interakci mezi LRP6 a Wnt1 a tím i tvorbu komplexu mezi LRP6 a Fz8 v přítomnosti Wnt1. Tímto

způsobem Dkk1 inhibuje tvorbu Fz-Wnt-LRP6 komplexu (Seměnov et al. 2001; Seměnov et al. 2008). Druhý model staví na pozorování, že stimulace HEK či HeLa buněk proteinem Dkk1 vede k internalizaci LRP6 spolu s Dkk1. Takto Dkk1 odstraňuje LRP6 z plasmatické membrány a tím může inhibovat Wnt signalizaci (Mao et al. 2002; Sakane et al. 2010). Receptor LRP6 internalizovaný po vazbě Dkk1 kolokalizuje s klatrinem a nikoliv s kaveolinem, narozdíl od LRP6 internalizovaného po navázání ligandu Wnt3a. Přerušení klatrinové endocytózy zabraňuje internalizaci LRP6 i inhibici Wnt signalizace způsobené proteinem Dkk1. Dkk1 tedy spouští klatrinovou endocytózu LRP6 a ta je nutná pro funkci Dkk1 v inhibici Wnt signalizace (Yamamoto et al. 2008). Povrchová biotinylace endogenního LRP6 navíc ukázala, že do 30 minut po přidání proteinu Dkk1 jsou receptory LRP6 z velké části endocytovány a do 120 minut recyklovány na plasmatickou membránu. Na druhou stranu protein Dkk1, který je endocytován spolu s LRP6, přestává být po 120 minutách detekovatelný. Navíc recyklace LRP6 je potlačena expresí dominantně negativního proteinu Rab11 a degradace Dkk1 je potlačena expresí dominantně negativního proteinu Rab7. Dkk1 tedy spouští endocytózu receptoru LRP6, načež LRP6 je recyklován zpět na plasmatickou membránu pomocí Rab11-pozitivních endosomů, zatímco Dkk1 je degradován v lysosomu (Sakane et al. 2010).

V procesu internalizace LRP6 spuštěné proteinem Dkk1 navíc hrají roli transmembránové proteiny z rodiny Kremen. Tato rodina obsahuje proteiny Kremen1 a Kremen2, které jsou konzervované napříč obratlovci. Proteiny Kremen1 i Kremen2 interagují s Dkk1 a prostřednictvím Dkk1 tvoří komplex s LRP6. Overexprese proteinů Kremen1 a Kremen2 v HEK buňkách ukázala, že tyto proteiny kooperují s Dkk1 v inhibici Wnt signalizace. Tvorba komplexu mezi proteinem Kremen a LRP6 je zřejmě nutná pro internalizaci LRP6, jelikož zvýšená exprese Kremen2 posiluje internalizaci značeného LRP6 (Mao et al. 2002). Proteiny Kremen jsou potřeba pro funkci Dkk1 v inhibici Wnt signalizace při vývoji hlavy u *Xenopus leavis* (Davidson et al. 2002) a při vývoji končetin myši (Ellwanger et al. 2008). Dkk1 ale inhibuje Wnt signalizaci i v buňkách, které neexprimují *Kremen1* a *Kremen2* (Ellwanger et al. 2008). Zatímco *Dkk1* knockout myši nejsou životaschopné a vykazují více defektů souvisejících s posílenou Wnt signalizací, *Kremen1*^{-/-} *Kremen2*^{-/-} myši jsou životaschopné a sdílejí s *Dkk1* mutanty jen některé z defektů jako tvorbu ektopických prstů a zvýšení hmotnosti kostí (Ellwanger et al. 2008; Mukhopadhyay et al. 2001; Morvan et al. 2006). Protein Dkk1 tedy zřejmě je schopen inhibovat Wnt signalizaci nezávisle na proteinech Kremen a nezávisle na internalizaci LRP6. Každopádně

endocytóza receptoru LRP6 a jeho dočasné odstranění z membrány pomocí proteinů Dkk1 a Kremen může v některých tkáních významně přispívat k inhibici Wnt signalizace.



Obr. 6: Vliv různých endocytických drah na Wnt signalizaci. (a) Aktivace nekanonické Wnt signalizace (bez účasti koreceptoru LRP6) klatrinovou endocytózou. (b) Aktivace kanonické Wnt/β-kateninové signalizace pomocí klatrinové či kaveolární endocytózy. (c) Inhibice Wnt/β-kateninové signalizace pomocí klatrinové endocytózy spuštěné proteiny Dkk1 a Kremen. Upraveno podle Kikuchi et al. 2009.

6. Závěr

Cílem této práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o úloze endocytózy ve Wnt signalizaci. Endocytóza Wnt ligandů a jejich receptorů ovlivňuje Wnt signalizaci na několika úrovních. Důsledek této endocytózy závisí na stavu a zastoupení receptorů, na interakcích s dalšími regulačními proteiny, na typu endocytické dráhy a na konečném osudu endocytovaných proteinů. Zaprvé internalizace aktivovaných receptorů hraje roli v přenosu signálu. Zadruhé internalizace Wnt ligandu přispívá k odstraňování Wnt z mezibuněčného prostoru a může tak ovlivňovat distribuci tohoto morfogenu. Zatřetí internalizace receptorů může snížit citlivost buňky vůči Wnt signalizaci buď dočasným odstraněním receptorů z plasmatické membrány spojeným s recyklací, nebo trvalým odstraněním receptorů pomocí

lysosomální degradace. Zůstává z velké části nezodpovězeno, nakolik jsou tyto mechanismy využívány pro regulaci Wnt signalizace v různých tkáních za fyziologických podmínek. Stejně tak zůstává nezodpovězeno mnoho otázek týkajících se vezikulárního transportu endocytovaných Wnt ligandů a receptorů, včetně potenciačních rozdílů mezi různými buněčnými typy. V tomto ohledu bude prospěšná identifikace dalších proteinů regulujících endocytózu a vezikulární transport komponent Wnt signalizace.

Seznam použité literatury

- van Amerongen, R. & Nusse, R., 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development (Cambridge, England)*, 136(19), 3205-3214.
- Baeg, G. et al., 2004. The Wingless morphogen gradient is established by the cooperative action of Frizzled and Heparan Sulfate Proteoglycan receptors. *Developmental Biology*, 276(1), 89-100.
- Bejsovec, A. & Wieschaus, E., 1995. Signaling activities of the *Drosophila* wingless gene are separately mutable and appear to be transduced at the cell surface. *Genetics*, 139(1), 309-320.
- Belenkaya, T.Y. et al., 2008. The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network. *Developmental Cell*, 14(1), 120-131.
- Bilic, J. et al., 2007. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5831), 1619-1622.
- Blitzer, J.T. & Nusse, R., 2006. A critical role for endocytosis in Wnt signaling. *BMC Cell Biology*, 7, 28.
- Bryja, V. et al., 2007. Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), 6690-6695.
- Cadigan, K.M. et al., 1998. Wingless repression of *Drosophila* frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell*, 93(5), 767-777.
- Calebiro, D. et al., 2010. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(5), 221-228.
- Conner, S.D. & Schmid, S.L., 2005. CVAK104 is a novel poly-L-lysine-stimulated kinase that targets the beta2-subunit of AP2. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21539-21544.
- DasGupta, R. et al., 2005. Functional genomic analysis of the Wnt-wingless signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5723), 826-833.
- Davidson, G. et al., 2002. Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development (Cambridge, England)*, 129(24), 5587-5596.
- Delcroix, J. et al., 2003. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron*, 39(1), 69-84.
- Di Guglielmo, G.M. et al., 1994. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *The EMBO Journal*, 13(18), 4269-4277.

- Doherty, G.J. & McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857-902.
- Dubois, L. et al., 2001. Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in *Drosophila* embryos. *Cell*, 105(5), 613-624.
- Ellwanger, K. et al., 2008. Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Molecular and Cellular Biology*, 28(15), 4875-4882.
- Gao, C. & Chen, Y., 2010. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22(5), 717-727.
- Glinka, A. et al., 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391(6665), 357-362.
- Grant, B.D. & Donaldson, J.G., 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(9), 597-608.
- Han, C. et al., 2005. *Drosophila* glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc. *Development (Cambridge, England)*, 132(4), 667-679.
- Hansen, C.G. & Nichols, B.J., 2010. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 177-186.
- Haugh, J.M. et al., 1999. Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21(ras) in fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34350-34360.
- Hayes, S., Chawla, A. & Corvera, S., 2002. TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *The Journal of Cell Biology*, 158(7), 1239-1249.
- Chen, W. et al., 2001. beta-Arrestin1 modulates lymphoid enhancer factor transcriptional activity through interaction with phosphorylated dishevelled proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 14889-14894.
- Chen, W. et al., 2003. Dishevelled 2 Recruits {beta}-Arrestin 2 to Mediate Wnt5A-Stimulated Endocytosis of Frizzled 4. *Science*, 301(5638), 1391-1394.
- Itoh, K. et al., 2000. Interaction of dishevelled and *Xenopus* axin-related protein is required for wnt signal transduction. *Molecular and Cellular Biology*, 20(6), 2228-2238.
- Jovic, M. et al., 2010. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and Histopathology*, 25(1), 99-112.
- Khan, Z. et al., 2007. Analysis of endogenous LRP6 function reveals a novel feedback mechanism by which Wnt negatively regulates its receptor. *Molecular and Cellular*

Biology, 27(20), 7291-7301.

- Kikuchi, A., Yamamoto, H. & Sato, A., 2009. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends in Cell Biology*, 19(3), 119-129.
- Kim, G. & Han, J., 2007. Essential role for beta-arrestin 2 in the regulation of *Xenopus* convergent extension movements. *The EMBO Journal*, 26(10), 2513-2526.
- Kim, G., Her, J. & Han, J., 2008. Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements. *The Journal of Cell Biology*, 182(6), 1073-1082.
- Korinek, V. et al., 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5307), 1784-1787.
- Kumari, S., Mg, S. & Mayor, S., 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research*, 20(3), 256-275.
- Le Lay, S. & Kurzchalia, T.V., 2005. Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1746(3), 322-333.
- Liu, C. et al., 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108(6), 837-847.
- Lloyd, T.E. et al., 2002. Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell*, 108(2), 261-269.
- MacDonald, B.T., Tamai, K. & He, X., 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9-26.
- Mao, B. et al., 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 417(6889), 664-667.
- Marchese, A. et al., 2008. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 601-629.
- Marois, E., Mahmoud, A. & Eaton, S., 2006. The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient. *Development (Cambridge, England)*, 133(2), 307-317.
- Moline, M.M., Southern, C. & Bejsovec, A., 1999. Directionality of wingless protein transport influences epidermal patterning in the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge, England)*, 126(19), 4375-4384.
- Morvan, F. et al., 2006. Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21(6), 934-945.
- Mukai, A. et al., 2010. Balanced ubiquitylation and deubiquitylation of Frizzled regulate cellular responsiveness to Wg/Wnt. *The EMBO Journal*, 29(13), 2114-2125.

- Mukhopadhyay, M. et al., 2001. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Developmental Cell*, 1(3), 423-434.
- Neumann, S. et al., 2009. Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(3), 334-343.
- Panáková, D. et al., 2005. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature*, 435(7038), 58-65.
- Pfeiffer, S. et al., 2002. Producing cells retain and recycle Wingless in Drosophila embryos. *Current Biology: CB*, 12(11), 957-962.
- Piddini, E. et al., 2005. Arrow (LRP6) and Frizzled2 cooperate to degrade Wingless in Drosophila imaginal discs. *Development (Cambridge, England)*, 132(24), 5479-5489.
- Pinson, K.I. et al., 2000. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, 407(6803), 535-538.
- Raiborg, C. & Stenmark, H., 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458(7237), 445-452.
- Rives, A.F. et al., 2006. Endocytic trafficking of Wingless and its receptors, Arrow and DFrizzled-2, in the Drosophila wing. *Developmental Biology*, 293(1), 268-283.
- Sakane, H., Yamamoto, H. & Kikuchi, A., 2010. LRP6 is internalized by Dkk1 to suppress its phosphorylation in the lipid raft and is recycled for reuse. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 3), 360-368.
- Sato, A. et al., 2010. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *The EMBO Journal*, 29(1), 41-54.
- Semënov, M.V. et al., 2001. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Current Biology: CB*, 11(12), 951-961.
- Semënov, M.V., Zhang, X. & He, X., 2008. DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21427-21432.
- Seto, E.S. & Bellen, H.J., 2006. Internalization is required for proper Wingless signaling in Drosophila melanogaster. *The Journal of Cell Biology*, 173(1), 95-106.
- Seto, E.S. & Bellen, H.J., 2004. The ins and outs of Wingless signaling. *Trends in Cell Biology*, 14(1), 45-53.
- Sorkin, A. & von Zastrow, M., 2009. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(9), 609-622.
- Strigini, M. & Cohen, S.M., 2000. Wingless gradient formation in the Drosophila wing. *Current Biology: CB*, 10(6), 293-300.

- Su, Y. et al., 2008. APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Molecular Cell*, 32(5), 652-661.
- Taelman, V.F. et al., 2010. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, 143(7), 1136-1148.
- Terabayashi, T. et al., 2009. A coated vesicle-associated kinase of 104 kDa (CVAK104) induces lysosomal degradation of frizzled 5 (Fzd5). *The Journal of Biological Chemistry*, 284(39), 26716-26724.
- Umbhauer, M. et al., 2000. The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *The EMBO Journal*, 19(18), 4944-4954.
- Vaccari, T. et al., 2008. Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Cell Biology*, 180(4), 755-762.
- Vanlandingham, P.A. & Ceresa, B.P., 2009. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12110-12124.
- Watson, F.L. et al., 2001. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nature Neuroscience*, 4(10), 981-988.
- Willert, K. et al., 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448-452.
- Wu, D. & Pan, W., 2010. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(3), 161-168.
- Wu, C. et al., 2007. A functional dynein-microtubule network is required for NGF signaling through the Rap1/MAPK pathway. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(11), 1503-1520.
- Yamamoto, H., Komekado, H. & Kikuchi, A., 2006. Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Developmental Cell*, 11(2), 213-223.
- Yamamoto, H. et al., 2008. Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling. *Developmental Cell*, 15(1), 37-48.
- Yu, A. et al., 2007. Association of Dishevelled with the clathrin AP-2 adaptor is required for Frizzled endocytosis and planar cell polarity signaling. *Developmental Cell*, 12(1), 129-141.
- Zeng, X. et al., 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, 438(7069), 873-877.

Zhang, X. et al., 2005. Beta-arrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylation-dependent and -independent internalization of delta-opioid receptors. *Journal of Neurochemistry*, 95(1), 169-178.