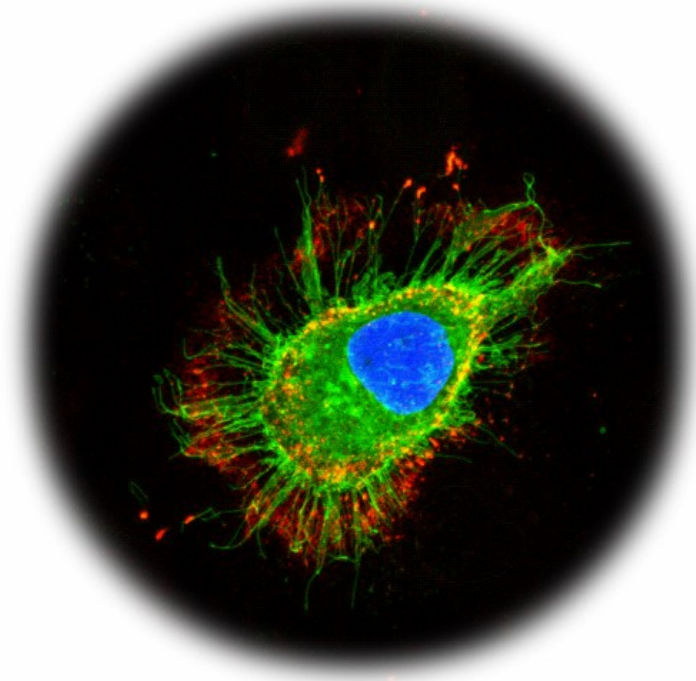


**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY**  
Ph.D. studijní program: **Imunologie**



**Lenka Doubravská**

## **„Wnt signalizace skrz nazkrz“**



**Disertační Ph.D. práce**

**Školitel: RNDr. Vladimír Kořínek CSc.**

**Laboratoř buněčné a vývojové biologie  
Ústav molekulární genetiky, Akademie věd České republiky**

**Praha, 2011**



## Curriculum vitae

**Jméno:** Lenka Doubravská  
**Narozena:** 24.11.1979; Rokycany, Česká republika  
**Občanství:** Česká republika  
**Vzdělání:** 1998-2003 Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha  
2003 **Mgr. obor biologie** (diplom.práce: Charakterizace a identifikace GNA ligandu v thymu – GNA jako nástroj při studiu thymocytů)  
od 2003 PhD studium v Laboratoři buněčné a vývojové biologie v Akademii věd v Praze/Ústav molekulární genetiky; pod vedením RNDr. Vladimíra Kořínka, CSc.  
2011 dizertační PhD práce: Wnt signalizace „skrz nazkrz“

### **Seznam publikací:**

Sinkora J, Kolinska J, Rehakova Z, Cerny J, Doubravska L. Binding of the Galanthus nivalis Agglutinin to Thymocytes Reveals Alterations in Surface Glycosylation during T-Cell Development, Scand J Immunol., 2002

Valenta T, Lukas J, Doubravska L, Fafilek B, Korinek V. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies, EMBO J., 2006

Psahoulia FH, Drosopoulos KG, Doubravska L, Andera L, Pintzas A. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts, Mol Cancer Ther., 2007

Doubravská L, Símová S, Cermak L, Valenta T, Korínek V, Andera L. Wnt-expressing rat embryonic fibroblasts suppress Apo2L/TRAIL-induced apoptosis of human leukemia cells, Apoptosis, 2008

Klíma M, Zájedová J, Doubravská L, Andera L. Functional analysis of the posttranslational modifications of the death receptor 6. Biochim Biophys Acta., 2009

Lukas J, Mazna P, Valenta T, Doubravska L, Pospichalova V, Vojtechova M, Fafilek B, Ivanek R, Plachy J, Korinek V. Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4, Nuc Acids Res, 2009

Doubravska L, Krausova M, Gradl D, Vojtechova M, Tumova L, Lukas J, Valenta T, Pospichalova V, Fafilek B, Plachy J, Sebesta O, Korinek V. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. Cell Signal., 2011

**Kontakt:** Lenka Doubravská (email: lenka.doubravska@img.cas.cz/phone: +420 24106 2469)  
Laboratoř buněčné a vývojové biologie, ÚMG AV ČR  
Václavská 1083, Praha 4, 142 20, Česká Republika

## Seznam zkratek:

APC	Adenomatous Polyposis Coli
Bcl9	B-cell CLL/lymphoma 9
CBP	CREB (cyclic AMP response element binding protein) Binding Protein
CK1	Casein Kinase 1
CtBP	C-terminal Binding Protein
Dazap2	Deleted in azoospermia (DAZ)-associated protein
ECM	Extracellular matrix
GSK3	Glycogen Gynthase Kinase 3
HAT	Histone Acetylase
HDAC	Histone Deacetylase
HDL	High Density Lipoprotein
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HiRE	HIC1 Responsive Element
ICAT	Inhibitor of $\beta$ -Catenin and Tcf4
KLF4	Krüppel-Like Factor 4
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LRP	Low Density Lipoprotein Related Protein
RanBP3	Ran Binding Protein 3
TCF	T Cell Factor
TLE	Transducin-Like Enhancer
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Wnt	Wingless plus Integrated-1
WRE	Wnt Responsive Element

# 1. Abstrakt

Signální dráhy jsou molekulární nástroje buňky zprostředkující odpovědi na vnitřní i vnější podněty, které mohou následně vést k buněčnému dělení nebo diferenciaci na jedné straně, stejně jako k buněčné smrti na straně druhé. Molekulární síť různých signálních drah umožňuje mezibuněčnou komunikaci, a tudíž může celý organismus existovat a koordinovaně fungovat.

Signální dráha Wnt patří mezi evolučně staré a konzervované molekulární dráhy a účastní se celé řady dějů během vývoje. Navíc je nezbytná pro udržování dospělých tkání, protože se podílí na jejich regeneraci. Mnohá zhoubná onemocnění, související s nefunkčními komponentami dráhy Wnt, představují temnější úhel pohledu.

Tato práce je postavena na čtyřech níže uvedených publikacích, které se týkají různých buněčných úrovní dráhy Wnt. Nejdříve je zmíněna práce o ligandu Wnt, jež stojí na samém začátku signalizace, na plazmatické membráně buňky. Dále jsme se zabývali fenoménem přežívajících leukemických buněk, vyvolaném fibroblasty produkujícími protein Wnt po indukci apoptózy ligandem TRAIL. Poslední dvě publikace ukazují nové komponenty Wnt signalizace a uvedou nás do buněčného jádra – až „na dno“ celé dráhy.

1. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. **Doubavská L**, Krausova M, Gradl D, Vojtechova M, Tumova L, Lukas J, Valenta T, Pospichalova V, Fafílek B, Plachy J, Sebesta O, Korínek V. *Cell Signal*. 2011 May;23(5):837-48. Epub 2011 Jan 16.
2. Wnt-expressing rat embryonic fibroblasts suppress Apo2L/TRAIL-induced apoptosis of human leukemia cells. **Doubavská L**, Símová S, Cermak L, Valenta T, Korínek V, Andera L. *Apoptosis*. 2008 Apr;13(4):573-87. Epub 2008 Mar 18.
3. Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4. Lukas J, Mazna P, Valenta T, **Doubavská L**, Pospichalova V, Vojtechova M, Fafílek B, Ivanek R, Plachy J, Novak J, Korínek V. *Nucleic Acids Res*. 2009 May;37(9):3007-20. Epub 2009 Mar 20.
4. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. Valenta T, Lukas J, **Doubavská L**, Fafílek B, Korínek V. *EMBO J*. 2006 Jun 7;25(11):2326-37. Epub 2006 May 25.

## 2. Úvod do problematiky

Signální dráha Wnt je jednou z mnoha buněčných proteinových kaskád. Její role souvisí s diferenciací buněk jak během vývoje organismů, tak v jejich dospělosti, kdy umožňuje regenerovat celé tkáně. Dráha je totiž nezbytnou součástí obnovy tzv. kmenových buněk, které mají potenciál vytvářet tkáně různých typů. Temnou stránkou signalizace Wnt zůstává povaha dějů spojená s jejím poškozením. Neřízené dělení buněk je vhodným podhoubím pro vznik nádorů, přičemž právě schopnost regenerovat působí dvojsečně – dává totiž nádorům šanci znovu povstat po jejich léčbě [1, 2].

Komponenty dráhy Wnt jsou evolučně konzervované, najdeme je u mořské sasanky *Nematostella vectensis* z kmene žahavců stejně jako u lidí [3]. Rozlišujeme kanonickou Wnt dráhu, pro niž je klíčový protein  $\beta$ -katenin, od přinejmenším dvou dalších Wnt signálních drah (dráha planární polarity a signalizace Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ), které, jak už název napovídá, taktéž používají protein Wnt. Vzájemné působení jednotlivých drah je nasnadě, právě kvůli společným komponentám.

Ligand Wnt patří do rodiny proteinů, jež u savců čítá 19 členů. Tyto mají vysoce homologní sekvenci, jinými slovy jsou si velmi podobné, zejména co se týče počtu a pozice cysteinů. Hydrofobní charakter proteinu souvisí s jeho palmitací a Wnt je také N-glykosylován, přičemž obě zmíněné modifikace podmiňují biologickou aktivitu proteinu [4-6]. Ten je sekretován vně buněk, kde silně váže extracelulární matrix a dokáže se po ní pohybovat [7, 8]. Kromě toho Wnt spolu s dalšími morfogeny využívá k mezibuněčnému transportu na delší vzdálenost lipidové váčky, nazvané u octomilky argozómy [9, 10], nebo obdobný nosič - vysokodenzitní lipoprotein (HDL) - u savců [11].

Jestliže není Wnt ligand přítomen, dráha je ve vypnutém režimu. Stěžejní molekula kanonické Wnt signalizace - je průběžně štěpen v cytoplazmě za účasti tzv. degradačního komplexu. Tento proteinový komplex je složen z proteinů axin, APC (adenomatous polyposis coli) a kináz GSK3 (kináza glykogen syntázy 3) a CK1 (kasein kináza 1), které  $\beta$ -katenin fosforylují a tím odesílají do proteazomu. Zároveň se  $\beta$ -katenin nachází v blízkosti plazmatické membrány v místech adhezivních spoju, které fyzicky drží sousední buňky pohromadě [12, 13].  $\beta$ -katenin se tu účastní zcela jiného děje, propojuje vnější prostředí s vnitrobuněčným, konkrétně s cytoskeletem a tudíž ve svém důsledku i s buněčným pohybem. Zdá se, že zmíněné dvě cytoplasmatické niky  $\beta$ -kateninu se mohou vzájemně ovlivňovat a dávají tak nahlédnout míru komplexity, která v buňkách panuje.

Jakmile Wnt ligand propojí svou vazbou receptor Frizzled s koreceptorem LRP, funkce degradačního komplexu je narušena. Frizzled procházející sedmkrát plazmatickou membránou na svém cytoplazmatickém konci naváže adaptor Dishevelled, který zprostředkuje přitažení axinu s navázanou kinázou GSK3 k té části koreceptoru LRP, kde se vyskytuje několik fosforylačních motivů [14, 15]. Ty jsou modifikovány i dalšími kinázami a slouží jako přístav pro axinový komplex. Během minut vzniká na membráně oligomer velikosti ribozomu zvaný též „LRP signalozom“ a degradační komplex přestává fosforylovat  $\beta$ -katenin [16]. Ten se hromadí v cytoplazmě a putuje do jádra, pravděpodobně skrze přímou vazbu s nukleoporiny díky strukturní podobnosti s jaderným importinem [17, 18]. Různí vazební partneři napomáhají pohybu  $\beta$ -kateninu ať už z jádra ven (APC, axin, menin, RanBP3) či dovnitř (Bcl9), takže se zdá, že  $\beta$ -katenin jednoduše stále pendluje mezi jádrem a cytoplazmou [19-23]. Každopádně v jádře váže transkripční faktory z rodiny TCF/LEF a transaktivuje expresi cílových genů dráhy Wnt [24-26].

Jaderné efekторы Wnt dráhy, TCF/LEF proteiny, rozpoznávají specifický motiv v DNA sekvenci, tzv. WRE – „Wnt responsivní element“ (CCTTTGT/AT/A), skrze který ovlivňují transkripci. V případě, že je dráha je vypnutá, tedy není v jádře  $\beta$ -katenin, nalézají se TCF/LEF proteiny v komplexu s transkripčními represory Groucho/TLE. Tyto inhibují transkripci pomocí deacetyláz histonů (tzv. HDAC), které umožní, aby chromatin ztuhněl a nebyl přístupný pro přepisovací aparát. Po aktivaci proteinem Wnt jsou Groucho/TLE nahrazeny  $\beta$ -kateninem a řadou dalších proteinů ovlivňujících transkripci, např. acetylázami histonů (HAT), jež pracují opačně než HDAC a chromatin rozbalují.

Vraťme se ale ještě k TCF/LEF rodině; u savců existují čtyři geny – *Tcf1*, *Lef1*, *Tcf3* a *Tcf4*. Zajímavé je, kolik různých izoform těchto transkripčních faktorů může vzniknout díky alternativním promotorům (*Tcf1*, *Lef1*) a alternativnímu sestřihu exonů, takže vzniká celá škála transkriptů odlišných vlastností. Obecně platí, že TCF1 a TCF4 mohou být jak aktivátory, tak represory transkripce, kdežto LEF1 působí více aktivačně a TCF3 spíše inhibičně. Důležitou roli hrají posttranslační modifikace proteinů, které také ovlivňují TCF/LEF funkci. Např. sumoylace odstraňuje LEF1 do jaderných tělísek, čímž ho inhibuje, na rozdíl od acetylace transkripčních faktorů pomocí p300/CBP, jež působí aktivačně [27, 28]. Fosforylace se liší dle místa a toho kterého proteinu; např. fosforylace TCF3 skrze CK1 $\epsilon$  zvyšuje jeho afinitu k  $\beta$ -kateninu na úkor Groucho/TLE represoru a tudíž roste transkripční aktivita [29].

Vedle zmíněných mechanismů, jež zásadně regulují míru Wnt signalizace a tudíž i soubor cílových genů, které budou přepsány, je třeba vzít taktéž v potaz řadu jaderných

agonistů a antagonistů. Tyto proteiny vesměs modulují vazbu  $\beta$ -kateninu k TCF/LEF faktorům, případně pak regulují univerzální komponenty transkripčního aparátu. Mezi represory se řadí protein CtBP přímo interagující s některými TCF [30], dále proteiny Chibby a ICAT, které vážou  $\beta$ -katenin a brání tak vazbě jiných partnerů [31, 32]. KLF4 zase chrání  $\beta$ -katenin a histony v místě cílových genů od potřebné acetylace [33].

Naproti tomu adaptorový protein Bcl9 a jeho vazebný partner Pygopus jsou nezbytné pro  $\beta$ -kateninem vyvolanou transkripci. Trvale jaderný Pygopus verbuje po spuštění dráhy Bcl9/ $\beta$ -katenin duplex, a protože současně váže také chromatin, vytváří jakousi kotvu pro  $\beta$ -katenin v případě ukončení transkripce [34]. Acetyltransferázy p300/CBP interagují s C-koncem  $\beta$ -kateninu a jak již bylo zmíněno výše, modifikují histony široko daleko (až do 30 kilobází) kolem WRE motivů v promotorech cílových genů [35]. Zajímavé je, že i po stimulaci proteinem Wnt je  $\beta$ -katenin s navázanými koaktivátory periodicky nahrazován represory, a to navzdory přetrvávající stimulaci. Dochází tedy k jakémusi cyklování aktivačních versus inhibičních sad proteinů na TCF/LEF faktorech [36, 37].

Cílové geny dráhy Wnt jsou lemovány zpravidla několika sekvencemi WRE, přičemž některé se nacházejí daleko od počátku transkripce. Může být přítomen ještě další motiv rozpoznávaný TCF/LEF doménou zvanou „C-clamp“ („cysteinová svorka“), kterou lze nalézt v některých variantách transkripčních faktorů. Tento druhý motiv umožňuje regulaci odlišných cílových genů [38-40]. Protože se dráha Wnt účastní různých buněčných procesů, je zřejmé, že exprese cílových genů závisí na té které tkáni a zejména na časové škále po aktivaci [41]. Navzdory tomu však existuje téměř univerzální cílový gen a tím je *Axin2*, podobně jako u octomilky gen *Naked cuticle* indukovaný Wingless dráhou (Wingless je ortolog od Wnt v octomilce) [42, 43]. Mezi další cílové geny patří řada jiných komponent samotné dráhy, která se tímto sama reguluje (Frizzled a LRP receptory, proteiny extracelulární matrix...). Buněčné dělení, apoptóza, diferenciace, adheze nebo imunitní odpověď jsou ovlivněny Wnt-indukovanými geny, nyní známe zhruba 100 přímých cílových genů, jak nás informuje domovská stránka proteinu Wnt ([http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target\\_genes](http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes)). Kromě těchto přímo spuštěných genů kontrolovaných skrze WRE motiv je tu ale celá řada nepřímých cílových genů např. transkripční regulátor c-Myc, který je indukován přímo dráhou Wnt, dále spouští různé efekty jako je protein p21 [44]. Mnoho není známo o represí cílových genů dráhou Wnt, přestože některé důkazy existují. Transkripční faktor Ultrabithorax v octomilce je přepisován v závislosti na síle Wnt signalizace – při slabých signálech je aktivován, kdežto při silných naopak inhibován [45].



### 3. Výsledky

Naše výsledky přispívají do mozaiky vědění o dráze Wnt. První publikace se tématicky drží na plazmatické membráně buňky. Týká se ligandu Wnt, který dává jméno celé dráze, a který byl donedávna záhadou pro své hydrofobní vlastnosti. Neúspěšná snaha izolovat jednotlivé proteiny Wnt byla prolomena, když Karl Willert se svými kolegy objevil metodou hmotnostní spektroskopie, že protein Wnt3a je palmitoylován na cysteinu 77 [4]. Protože je tento cystein evolučně vysoce zakonzervován, najdeme ho v sekvenci i ostatních Wnt proteinů a lze předpokládat, že disponují stejnou modifikací. Posléze byl objeven druhý acyl, palmitát s jednou dvojnou vazbou, na serinu 209 Wnt3a [5]. I tato modifikace je pravděpodobně univerzální, neboť obdobný serin nalezneme i v ostatních Wnt proteinech. Předpokládá se, že obě lipidové úpravy páchá jeden a tentýž enzym, totiž acyltransferáza Porcupine [46]. Celá řada publikací se zabývá rolí obou acylů, nicméně jednotný konsensus neexistuje, ať už proto, že byly zkoumány různé proteiny Wnt nebo proto, že každý modelový organismus může skýtat unikátní prostředí se specifickými mechanismy. Zřejmé je, že acyly dělají Wnt proteiny hydrofobní a souvisí s jejich aktivitou [4, 47-49]. My jsme se soustředili na dva proteiny, myší Wnt1 a Wnt3a a vytvořili jejich mutantní formy, jež disponují vždy jen jedním z obou acylů. Tímto nástrojem jsme chtěli odhalit funkci lipidových modifikací. Zajímavý výsledek byl ten, že pokud jsme zmužovali konzervovaný serin, Wnt nebyl nejen acylován na serinu, ale ani na přítomném cysteinu. Z toho lze vyvodit, že modifikace serinu předchází a podmiňuje palmitaci cysteinu. Wnt bez acylů ztrácí aktivitu, přestože je sekretován vně buněk. Pokud jsme zaměnili konzervovaný cystein za alanin, serin byl i nadále modifikován a proteiny si zachovali alespoň částečnou aktivitu. Sekretovaný Wnt je asociován s plazmatickou membránou a také s extracelulární matrix (ECM), po které se pravděpodobně pohybuje. Dokonce nepalmitoylované formy proteinu Wnt jsou barvitelné extracelulárně, jak už bylo zmíněno. Co je však odlišuje od funkčních proteinů je jejich absence na ECM. Wnt ligandy tedy pro svou funkci potřebují ECM coby nosič či koreceptor a k tomu jsou nezbytné hydrofobní acyly. Jestli pomáhají přímé vazbě Wnt proteinů na ECM nebo je potřeba nějaký prostředník zůstává žhavou otázkou.

Druhá publikace se zabývá fenoménem přežívání leukemických buněk vyvolaného proteinem Wnt při snaze zahubit je ligandem TRAIL. Celá řada leukemických buněk využívá kanonickou dráhu Wnt, soudě podle stabilizovaného proteinu  $\beta$ -katenin [50, 51]. Tato dráha je zároveň klíčová pro správný průběh zrání lymfocytů řady B i T, nemluvě o kmenových

hematopoetických buňkách, kterým umožňuje pomalé dělení a brání diferenciaci, takže udržuje jejich stálou přítomnost i během dospělosti [52-54]. Není tedy divu, že dráha Wnt patří k nástrojům, jež si leukemické buňky rády udrží. Podle teorie „rakovinných kmenových buněk“ nádory přetrvávají právě díky rezervoáru rakovinných buněk s vlastnostmi buněk kmenových, které neustále dodávají nové odolné klony [1]. Ty jsou pak příčinou návratu nádorů po jejich léčbě. Ligand TRAIL je zlatým jablkem protirakovinné léčby, protože vyvolává apoptózu především u maligních buněk, kdežto na ostatní nepůsobí. TRAIL vazbou na tzv. „smrtící“ receptory („death receptors“; DR4 a DR5) spustí kaskádu kaspáz, které štěpí celou řadu proteinů a v důsledku navodí buněčnou smrt. My jsme zjistili, že pre-B buněčné linie (REH, KM3) kultivované v prostředí s fibroblasty produkujícími protein Wnt1 nebo Wnt3a na rozdíl od linií jiného původu (Ramos, ML-1, HL-60...) jsou odolné vůči apoptóze vyvolané molekulou TRAIL. Mechanismus tohoto jevu může souviset s nižší expresí „smrtících“ receptorů na povrchu pre-B buněk kultivovaných v přítomnosti proteinů Wnt. Nicméně, samotný protein Wnt nestačí, neboť pouze pokud je produkován právě embryonálními krysími fibroblasty a ne jinými, lze fenomén pozorovat. Lze tedy předpokládat další molekulu(y), indukované Wnt proteiny v daných fibroblastech, které stojí za přežíváním kokultivovaných pre-B buněk. Přestože TRAIL působí apoptoticky na paletu rakovinných buněčných linií, řada primárních nádorů je k němu rezistentní navzdory expresi „smrtících“ receptorů [55, 56]. Dráha Wnt stejně jako další jí způsobené sekundární signály mohou vysvětlit odolnost některých nádorů k ligandu TRAIL.

Zbylé dvě publikace nás přivedou do buněčného jádra, k pomyslné „třešničce“ dráhy Wnt, neboť zde vrcholí signalizace přepisem cílových genů. Jak už bylo zmíněno, transkripční faktory TCF/LEF rodiny fungují ve dvou módech. Buď jako inhibitory transkripce, pokud vážou Groucho/TLE represory, nebo jako aktivátory, když je vystřídá  $\beta$ -katenin [57]. Vedle zmíněných proteinů existuje spousta dalších modulátorů, interakčních partnerů TCF/LEF nebo  $\beta$ -kateninu, které ovlivňují jejich funkci a míru transkripce, případně specifitu přepisu cílových genů.

Protein Dazap2 známý svou úlohou během vývoje srdce nebo nervové soustavy nebyl zatím nikdy dáván do souvislosti s dráhou Wnt [58, 59]. My jsme Dazap2 popsali jako vazebného partnera transkripčního faktoru TCF4. Vazbu obou molekul umožňuje velmi krátký motiv v TCF4 proteinu (aminokyseliny 214-228), který je nalezen i ostatních členů této rodiny. Nejde o tytéž aminokyseliny, nýbrž o motiv podobný strukturou. Dazap2 se nachází v komplexu TCF4: $\beta$ -katenin, pokud je dráha Wnt spuštěna. Kromě buněčného jádra, kde se vyskytuje v neidentifikovaných tělísčích, se Dazap2 barví také v cytoplazmě. Pokud je

však v buňkách ektopicky přepisován spolu s TCF4 proteinem, zcela translokuje do jádra, což jen potvrzuje vzájemnou vazbu obou proteinů. Co se týče funkce, spolu se snížením množství Dazap2 proteinu v různých buňkách se snižuje také transkripce vyvolaná proteinem Wnt. Protože je snížena i vazba TCF4 k promotorům cílových genů, zdá se, že Dazap2 ovlivňuje afinitu tohoto transkripčního faktoru ke specifické DNA sekvenci. Souhrnem, našli jsme novou komponentu dráhy Wnt regulující funkci transkripčních faktorů rodiny TCF/LEF.

V poslední publikaci se soustředíme na protein HIC1, další vazebný partner TCF4 efektoru. Již struktura proteinu HIC1 napovídá několik zajímavých skutečností. Jednak obsahuje vazebný motiv pro univerzální jaderný korepresor CtBP [60], jednak má potenciál vytvářet oligomery, což se skutečně děje v podobě tzv. HIC1 jaderných tělísek [61], a naposled je schopen specifické vazby na DNA, tj. rozpoznává konkrétní sekvenci (HiRE – HIC1 responzivní element) [62]. Skrze HiRE protein inhibuje cílové geny s pomocí i bez histonových deacetyláz [63]. Protože HIC1 může ovlivnit buněčnou distribuci represoru CtBP a CtBP zároveň negativně reguluje kanonickou TCF/ $\beta$ -kateninem řícenou transkripci, pokusili jsme se poodhalit vzájemnou souvislost mezi těmito molekulárními hráči. Naše výsledky potvrdily existenci jaderných HIC1 tělísek, kam je účinně vtažen taktéž protein CtBP, stejně jako TCF4. I bez přítomnosti CtBP je TCF4 stále vtahován do tělísek, což je jen důsledkem přímé vazby k represoru HIC1. Přítomnost jaderných tělísek podmiňuje inhibiční potenciál proteinu HIC1 na kanonickou Wnt dráhu. V těliscích spočívá také mechanismus vlastní represe. To, že je TCF4 a dokonce spolu s  $\beta$ -kateninem vtahován do HIC1 tělísek, způsobí nedostatek těchto transkripčních regulátorů na promotorech cílových genů a hovoříme o jejich represi. Tělíska tedy slouží jako účinné proteinové skladiště. Protože protein HIC1 reguluje geny kontrolující buněčný růst a zároveň buněčnou smrt v důsledku poškození DNA, a protože je umlčen v řadě nádorů, je to velmi zajímavý cíl pro případné léčebné terapie.

- 
1. Zhao, C., et al., *Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo*. Cancer Cell, 2007. **12**(6): p. 528-41.
  2. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 255-60.
  3. Guder, C., et al., *The Wnt code: cnidarians signal the way*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7450-60.
  4. Willert, K., et al., *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 448-52.
  5. Takada, R., et al., *Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion*. Dev Cell, 2006. **11**(6): p. 791-801.
  6. Tanaka, K., Y. Kitagawa, and T. Kadowaki, *Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12816-23.

7. Reichsman, F., L. Smith, and S. Cumberledge, *Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction*. J Cell Biol, 1996. **135**(3): p. 819-27.
8. Franch-Marro, X., et al., *Glypicans shunt the Wingless signal between local signalling and further transport*. Development, 2005. **132**(4): p. 659-66.
9. Greco, V., M. Hannus, and S. Eaton, *Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia*. Cell, 2001. **106**(5): p. 633-45.
10. Panakova, D., et al., *Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 58-65.
11. Neumann, S., et al., *Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles*. Traffic, 2009. **10**(3): p. 334-43.
12. Harris, T.J. and M. Peifer, *Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(5): p. 234-7.
13. Nelson, W.J. and R. Nusse, *Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1483-7.
14. Cong, F., L. Schweizer, and H. Varmus, *Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP*. Development, 2004. **131**(20): p. 5103-15.
15. Zeng, X., et al., *Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions*. Development, 2008. **135**(2): p. 367-75.
16. Bilic, J., et al., *Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation*. Science, 2007. **316**(5831): p. 1619-22.
17. Henderson, B.R. and F. Fagotto, *The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport*. EMBO Rep, 2002. **3**(9): p. 834-9.
18. Suh, E.K. and B.M. Gumbiner, *Translocation of beta-catenin into the nucleus independent of interactions with FG-rich nucleoporins*. Exp Cell Res, 2003. **290**(2): p. 447-56.
19. Henderson, B.R., *Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 653-60.
20. Cong, F. and H. Varmus, *Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2882-7.
21. Cao, Y., et al., *Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(20): p. 5477-87.
22. Hendriksen, J., et al., *RanBP3 enhances nuclear export of active (beta)-catenin independently of CRM1*. J Cell Biol, 2005. **171**(5): p. 785-97.
23. Townsley, F.M., A. Cliffe, and M. Bienz, *Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(7): p. 626-33.
24. Huber, O., et al., *Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1*. Mech Dev, 1996. **59**(1): p. 3-10.
25. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
26. Molenaar, M., et al., *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. Cell, 1996. **86**(3): p. 391-9.
27. Sachdev, S., et al., *PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies*. Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3088-103.
28. Hecht, A., et al., *The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates*. Embo J, 2000. **19**(8): p. 1839-50.
29. Lee, E., A. Salic, and M.W. Kirschner, *Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon*. J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 983-93.
30. Valenta, T., J. Lukas, and V. Korinek, *HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(9): p. 2369-80.
31. Li, F.Q., et al., *Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity*. J Cell Biol, 2008. **181**(7): p. 1141-54.
32. Tago, K., et al., *Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein*. Genes Dev, 2000. **14**(14): p. 1741-9.
33. Evans, P.M., et al., *KLF4 interacts with beta-catenin/TCF4 and blocks p300/CBP recruitment by beta-catenin*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(2): p. 372-81.
34. Hoffmans, R., R. Stadel, and K. Basler, *Pygopus and legless provide essential transcriptional coactivator functions to armadillo/beta-catenin*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1207-11.

35. Parker, D.S., et al., *Wingless signaling induces widespread chromatin remodeling of target loci*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(5): p. 1815-28.
36. Sierra, J., et al., *The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 586-600.
37. Wang, S. and K.A. Jones, *CK2 controls the recruitment of Wnt regulators to target genes in vivo*. Curr Biol, 2006. **16**(22): p. 2239-44.
38. Atcha, F.A., et al., *A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 16169-75.
39. Atcha, F.A., et al., *A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8352-63.
40. Hecht, A. and M.P. Stemmler, *Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 3776-85.
41. Vlad, A., et al., *The first five years of the Wnt targetome*. Cell Signal, 2008. **20**(5): p. 795-802.
42. Yan, D., et al., *Elevated expression of axin2 and hnkd mRNA provides evidence that Wnt/beta -catenin signaling is activated in human colon tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 14973-8.
43. Zeng, W., et al., *naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 789-95.
44. Gartel, A.L. and K. Shchors, *Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes*. Exp Cell Res, 2003. **283**(1): p. 17-21.
45. Riese, J., et al., *LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic*. Cell, 1997. **88**(6): p. 777-87.
46. Galli, L.M., et al., *Porcupine-mediated lipid-modification regulates the activity and distribution of Wnt proteins in the chick neural tube*. Development, 2007. **134**(18): p. 3339-48.
47. Kurayoshi, M., et al., *Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling*. Biochem J, 2007. **402**(3): p. 515-23.
48. Komekado, H., et al., *Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a*. Genes Cells, 2007. **12**(4): p. 521-34.
49. Zhai, L., D. Chaturvedi, and S. Cumberledge, *Drosophila wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33220-7.
50. Matushansky, I., R.G. Maki, and C. Cordon-Cardo, *A context dependent role for Wnt signaling in tumorigenesis and stem cells*. Cell Cycle, 2008. **7**(6): p. 720-4.
51. Derksen, P.W., et al., *Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6122-7.
52. Reya, T., et al., *Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 15-24.
53. Verbeek, S., et al., *An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation*. Nature, 1995. **374**(6517): p. 70-4.
54. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-14.
55. MacFarlane, M., et al., *Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia*. Oncogene, 2002. **21**(44): p. 6809-18.
56. Ehrhardt, H., et al., *TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB*. Oncogene, 2003. **22**(25): p. 3842-52.
57. Daniels, D.L. and W.I. Weis, *Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 364-71.
58. Cohen-Barak, O., et al., *Sox6 regulation of cardiac myocyte development*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(20): p. 5941-8.
59. Roche, D.D., et al., *Dazap2 is required for FGF-mediated posterior neural patterning, independent of Wnt and Cdx function*. Dev Biol, 2009. **333**(1): p. 26-36.
60. Deltour, S., et al., *The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4890-901.
61. Stogios, P.J., et al., *Sequence and structural analysis of BTB domain proteins*. Genome Biol, 2005. **6**(10): p. R82.
62. Pinte, S., et al., *The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38313-24.
63. Chen, W.Y., et al., *Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses*. Cell, 2005. **123**(3): p. 437-48.

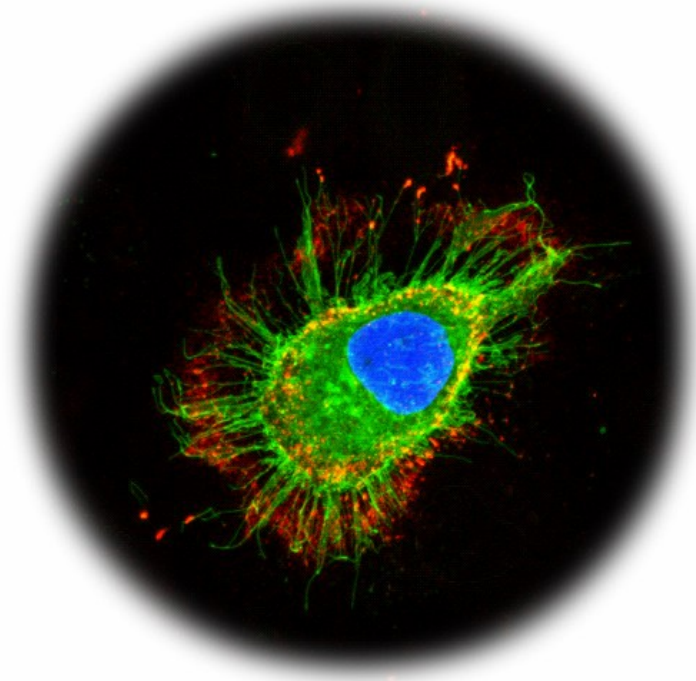


**Faculty of Natural Sciences, Charles University in Prague**  
Ph.D. study program: **Immunology**



**Lenka Doubravská**

# **Wnt signaling inside out**



**Doctoral Ph.D. thesis**

**Supervisor: RNDr. Vladimír Kořínek CSc.**

**Laboratory of Cell and Developmental Biology  
Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic**

**Prague, 2011**





## Curriculum vitae

**Name:** Lenka Doubravská  
**Born:** 24.11.1979; Rokycany, Czech Republic  
**Citizenship:** Czech Republic  
**Education:** 1998-2003 Faculty of Natural Sciences, Charles University, Prague  
2003 **Mgr. in biology** (diploma thesis: Characterization and identification of GNA ligand in thymus – GNA as the instrument of thymocyte development studies )  
since 2003 PhD studies in Laboratory of Cell and Developmental Biology, Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic, & Faculty of Natural Sciences, Charles University, Prague, CR  
2011 PhD thesis: Wnt signaling inside out

### **List of publications:**

Sinkora J, Kolinska J, Rehakova Z, Cerny J, Doubravska L. Binding of the Galanthus nivalis Agglutinin to Thymocytes Reveals Alterations in Surface Glycosylation during T-Cell Development, Scand J Immunol., 2002

Valenta T, Lukas J, Doubravska L, Fafilek B, Korinek V. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies, EMBO J., 2006

Psahoulia FH, Drosopoulos KG, Doubravska L, Andera L, Pintzas A. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts, Mol Cancer Ther., 2007

Doubravská L, Símová S, Cermak L, Valenta T, Korínek V, Andera L. Wnt-expressing rat embryonic fibroblasts suppress Apo2L/TRAIL-induced apoptosis of human leukemia cells, Apoptosis, 2008

Klíma M, Zájedová J, Doubravská L, Andera L. Functional analysis of the posttranslational modifications of the death receptor 6. Biochim Biophys Acta., 2009

Lukas J, Mazna P, Valenta T, Doubravska L, Pospichalova V, Vojtechova M, Fafilek B, Ivanek R, Plachy J, Korinek V. Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4, Nuc Acids Res, 2009

Doubravska L, Krausova M, Gradl D, Vojtechova M, Tumova L, Lukas J, Valenta T, Pospichalova V, Fafilek B, Plachy J, Sebesta O, Korinek V. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. Cell Signal., 2011

**Contact:** Lenka Doubravská (email: lenka.doubravska@img.cas.cz/phone: +420 24106 2469)  
Laboratoř buněčné a vývojové biologie, ÚMG AV ČR  
Vítěňská 1083, Praha 4, 142 20, Česká Republika

# 1. Summary

Signaling pathways function as molecular instruments mediating cellular response to intrinsic and extrinsic inputs, which can consequently lead to cell division or differentiation on one side and cell death on the other. Molecular network of different pathways enables the intercellular communication and hence the whole organism can exist and function coordinately.

The Wnt signaling pathway belongs among evolutionarily old and conserved molecular pathways and acts in many different processes during development. Moreover, it is necessary for maintenance of adult tissues as it participates in regeneration. Diverse malignancies, where repressive components of the Wnt pathway are non-functional, represent seamy side of the scope.

This thesis is based on 4 publications covering Wnt signaling on very multifarious levels. Firstly, I focus on processing of Wnt protein which stands at the beginning of the cascade as extracellular morphogen. Secondly, survival effect of Wnt producing fibroblasts on leukemia cells after induction of apoptosis by ligand TRAIL is discussed. The third issue shows novel components of the Wnt signaling pathway and introduces us into nucleus – “bottom” level of the pathway.

1. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. **Doubravská L**, Krausova M, Gradl D, Vojtechova M, Tumova L, Lukas J, Valenta T, Pospichalova V, Fafilek B, Plachy J, Sebesta O, Korinek V. *Cell Signal*. 2011 May;23(5):837-48. Epub 2011 Jan 16.

2. Wnt-expressing rat embryonic fibroblasts suppress Apo2L/TRAIL-induced apoptosis of human leukemia cells. **Doubravská L**, Šimová S, Cermak L, Valenta T, Korinek V, Andera L. *Apoptosis*. 2008 Apr;13(4):573-87. Epub 2008 Mar 18.

3. Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4. Lukas J, Mazna P, Valenta T, **Doubravská L**, Pospichalova V, Vojtechova M, Fafilek B, Ivanek R, Plachy J, Novak J, Korinek V. *Nucleic Acids Res*. 2009 May;37(9):3007-20. Epub 2009 Mar 20.

4. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. Valenta T, Lukas J, **Doubravská L**, Fafilek B, Korinek V. *EMBO J*. 2006 Jun 7;25(11):2326-37. Epub 2006 May 25.

## 2. Introduction

The Wnt signaling pathway represents one of many cellular protein cascades. It plays a role in cell differentiation during the development as well as in adulthood. Wnt signals provide tissue regeneration via stem cells which have the potential to generate different kinds of tissues. The seamy side of Wnt signaling is connected to dysregulation of pathway components leading to cancers. The advantage of the Wnt-induced regeneration ability is misapplied by tumors and gives them a chance to survive the therapy [1, 2].

The components of the Wnt molecular cascade are evolutionarily conserved as we can find them in both sea anemone *Nematostella vectensis* and humans [3]. There are more pathways using Wnt ligand (planar cell polarity pathway, Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway) but we focus on the canonical Wnt pathway with the key protein  $\beta$ -catenin. However, it is important to perceive that Wnt signaling in terms of linear pathways does not exist. The “individual” pathways mutually interact at least via common molecules.

Wnt ligands belong to a protein family composed of 19 members in mammals which have highly conserved sequences. Especially the number and the position of cysteines are very similar in Wnt proteins. Hydrophobic properties are based on the palmitoylation status of the Wnts and N-glycosylations are also employed. Both posttranslational modifications condition ligand biological activity [4-6]. Wnt proteins are secreted out of the cells where they tightly associate with extracellular matrix that is used as a transport medium [7, 8]. Furthermore, the Wnts together with other morphogenes use lipoparticles to travel longer distances. We call them argosomes in *Drosophila* [9, 10] and the analogical lipoprotein HDL in mammals serves similarly [11].

The Wnt signaling pathway is not triggered in the absence of the ligand. The key molecule of the canonical Wnt pathway -  $\beta$ -catenin - is continually diminished in the cytoplasm via the “degradation complex”. This protein conglomerate composes of axin, APC (adenomatous polyposis coli) and kinases GSK3 (glycogen synthase kinase 3) and CK1 (casein kinase 1), which address  $\beta$ -catenin to the proteasome by phosphorylation on multiple sites. Simultaneously,  $\beta$ -catenin is located in the adhesive junctions in plasmatic membranes and so it participates in physical connection among neighbouring cells [12, 13]. Moreover, linking extracellular environment to intracellular one, especially to cytoskeleton, may lead to cell movement. Obviously, there are two distinct cytoplasmic  $\beta$ -catenin pools, whereas one

can influence each other. This kind of insight allows us to understand how complex the cellular response is.

Immediately after Wnt ligand is added, it bridges Frizzled receptor with LRP co-receptor. Consequently, the function of the “degradation complex” is disrupted. In more detail, Frizzled receptor, passing seven times through the plasmatic membrane, binds on its cytoplasmatic end an adaptor protein Dishevelled. This adaptor brings axin with bound GSK3 to close proximity of the LRP phosphorylation sites [14, 15]. The LRP modification by GSK3 and other kinases makes the co-receptor serve as a dock for the axin complex. Within minutes the “LRP signalosome” – the ribosome-sized protein oligomer – is generated leading to the arrest of  $\beta$ -catenin phosphorylation by the already non-functional “degradation complex” [16].  $\beta$ -catenin cumulates in the cytoplasm and further translocates into the nucleus. It probably happens via direct interaction of nucleoporins with the  $\beta$ -catenin domain that is structurally similar to the nuclear importin [17, 18]. There are plenty of  $\beta$ -catenin interacting partners which help protein move outside the nucleus (APC, axin, menin, RanBP3) or inside (Bcl9), so  $\beta$ -catenin seems to shuttle between the cytoplasm and the nucleus [19-23]. Anyway, being in the nucleus,  $\beta$ -catenin binds to transcription factors of the TCF/LEF protein family and transactivates target genes expression [24-26].

Nuclear effectors of Wnt signaling, TCF/LEF proteins, recognize a specific DNA sequence called the Wnt responsive element (WRE) [CCTTTGT/AT/A]. If the pathway is switched off and so there is no nuclear  $\beta$ -catenin, than TCF/LEF proteins stay in the complex with Groucho/TLE transcriptional repressors. These repressors use histone deacetylases (HDACs) that provide chromatin compaction as an inhibition mechanism. Upon HDACs action genes are then less accessible for the transcription apparatus. After adding Wnt ligand, Groucho/TLE repressors are substituted by  $\beta$ -catenin together with a set of transcriptional activators such as histone acetylases (HATs). HATs function conversely than HDACs and decompress chromatin.

But back to the TCF/LEF protein family; there are four genes in mammals – *Tcf1*, *Lef1*, *Tcf3* and *Tcf4*. It is interesting how many isoforms of these transcription factors may be generated by alternative promoters (*Tcf1*, *Lef1*) and alternative exon splicing. As the result there are a number of transcripts with different functional properties. Generally, TCF1 and TCF4 may act either as transcriptional activators or repressors while LEF1 rather activates and TCF3 more inhibits transcription. Posttranslational modifications further modulate TCF/LEF function. For instance, sumoylated LEF1 is inhibited by targeting into nuclear bodies in contrast to via p300/CBP acetylated factors that are more actively potent [27, 28].

As for the phosphorylation, it depends on each TCF/LEF family member but as an example, CK1 $\epsilon$  modifies and increases so TCF3 affinity to  $\beta$ -catenin instead of Groucho/TLE repressors which consequently means transcriptional activation [29].

Besides the mentioned regulation mechanism of Wnt signaling that can influence which set of target genes will be transcribed there are also nuclear agonist and antagonists. These proteins modulate especially  $\beta$ -catenin - TCF/LEF interaction or they can influence universal components of a transcriptional apparatus. Protein CtBP functions in a repressive way and binds directly to TCF [30]. Chibby and ICAT are  $\beta$ -catenin partners that blockade it from binding other proteins [31, 32] and KLF4 protects  $\beta$ -catenin and histones from acetylation needed for target genes expression [33].

On the contrary, the adaptor protein Bcl9, together with its interactor Pygopus, are essential for Wnt/ $\beta$ -catenin mediated transcription. The protein complex of Bcl9 and  $\beta$ -catenin is recruited by nuclear Pygopus upon Wnt stimulus. Pygopus generates a kind of an anchor for  $\beta$ -catenin in case of transcription termination as it binds also chromatin at the same time [34]. Acetyl transferases p300/CBP interact with the  $\beta$ -catenin C-terminus and as already mentioned these enzymes modify histones up to 30 kilo bases around WRE motifs in target genes promoters [35]. It is interesting that even upon Wnt stimulation  $\beta$ -catenin with bound co-activators is changed periodically by transcriptional repressors. So, we can observe permanent cycling of activating versus inhibiting sets of proteins on TCF/LEF factors [36, 37].

The Wnt signaling target genes are flanked by several WRE motifs; some of them may be situated faraway from transcription start sites. There is another element recognized by the TCF/LEF domain called “C-clamp”, which is present in several splicing variants. This second motif may regulate a different set of target genes [38-40]. Because the Wnt pathway takes part in various cellular processes, it is obvious that expression of target genes depends on the tissue context and time after activation [41]. Nevertheless, there is a universal Wnt target gene – *Axin2* in mammals, similarly to *Drosophila* gene *Naked cuticle* [42, 43]. The components of the Wnt pathway itself are also target genes (Frizzled and LRP receptors, ECM proteins...) and manage signaling autoregulation. Cell division, apoptosis, differentiation, adhesion or immune response, all these processes are influenced by Wnt-induced genes. Nowadays, one hundred direct target genes are known, as “the Wnt home page” informs us ([http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target\\_genes](http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes)). There are plenty of indirect Wnt target genes next to the direct ones controlled via WRE motifs. For instance, the transcriptional regulator c-Myc, which is induced directly by the Wnt pathway,

further triggers various effectors such as protein p21 [44]. Not much is known about repression of Wnt target genes but some evidence exists. Ultrabithorax, a *Drosophila* transcription factor, is expressed according to the strength of Wnt signaling – it is activated during weak signaling and *vice versa* [45].

### **3. Results**

Our results aim to increase the knowledge about the Wnt signaling pathway. The first publication deals with the plasmatic membrane of the cell. We focus on the Wnt protein, which gives name to the whole pathway and which was until recently kind of mystery for its hydrophobic properties. The unsuccessful effort to isolate any of the Wnts was finally broken by Karl Willert and his colleagues. Using a mass spectrometry method they discovered the protein Wnt3a is palmitoylated on cysteine 77 [4]. The individual cysteine is highly conserved through the Wnt family and may be modified in other members as well. Later on, the second acyl, palmitoleoyl, was shown to be attached to serine 209 of Wnt3a [5]. Also this modification seems to be universal as homologous serine is present in other Wnt proteins. It is supposed that acyltransferase Porcupine can append both lipids [46]. The role of acyls has already been described many times. However, a final unified consensus does not exist for several reasons. Different Wnt proteins were researched and also each model organism can provide special environment with its specific mechanisms. Nevertheless, it is obvious that both Wnt hydrophobicity and activity are connected to the acyls presence [4, 47-49]. We focused on murine Wnt1 and Wnt3a and generated mutant protein forms having only one of the proposed lipids. This should be the instrument to uncover the lipids role. The first interesting result was that when we mutated conserved serine, the Wnts were acylated neither on serine, as supposed, nor on conserved cysteine. So serine modification precedes and conditions cysteine palmitoylation. Non-acylated Wnt proteins lose their activity despite being properly secreted outside the cells. When we changed conserved modified cysteine for alanine, serine was still acylated and proteins functional, at least partially. Secreted Wnt ligand associates with the plasmatic membrane and also with the ECM, which serves for transportation evidently. As I have already mentioned, even the non-acylated forms of the Wnts are stainable extracellularly. But what makes them different from functional proteins is their absence from the ECM. The ECM acts as a Wnt carrier or a co-receptor and the acyls are

necessary for their mutual binding. Whether the lipids help to manage direct interaction or an unknown mediator is necessary remains a hot question.

The second publication deals with the phenomenon of leukemic cell survival caused by fibroblasts producing a Wnt protein upon TRAIL-induced apoptosis. Leukemic cells often use canonical Wnt signaling judging by the stabilized  $\beta$ -catenin [50, 51]. At the same time, the Wnt pathway is the key protein cascade necessary for proper maturation of B and T lymphocytes. Moreover, it enables hematopoietic stem cells to divide slowly and regulates differentiation to maintain their pool during the whole life [52-54]. It is easy to understand why leukemias tend to keep this instrument. Agreeably with “the theory of cancer stem cells” tumors resist thanks to the reservoir of cancer cells with stem cell characteristics that continuously supply new clones [1] and are believed to be responsible for recurrence of the disease after therapy. TRAIL ligand represents the promising anticancer molecule as it induces apoptosis particularly in malignant cells. After TRAIL binding to the “death receptors” (DR4 and DR5) the cascade of caspases is triggered leading to consequent cleavage of different cellular proteins and finally to the cell death. We found that pre-B cell lines (REK, KM3) co-cultured with fibroblasts producing Wnt1 or Wnt3a in contrast to lines of another origin (Ramos, ML-1, HL-60...) are TRAIL resistant. The mechanism can be partially explained by lower expression of surface “death receptors” on pre-B cells in the presence of Wnt proteins. However, Wnt ligand alone is not enough to induce the mentioned phenomenon. It must be produced solely by rat embryonic fibroblasts. So we suppose that there is (are) (an)other Wnt-triggered fibroblast molecule(s) responsible for pre-B cells survival. Although many cancer cell lines are TRAIL sensitive, the primary tumors are often resistant despite the expression of “death receptors” [55, 56]. The Wnt pathway together with its consequent secondary signals may help to explain this puzzle.

The remaining two publications introduce us into the nucleus – “icing on the Wnt cake”. As already mentioned, transcription factors of the TCF/LEF family function in two modes; either as transcriptional inhibitors if they bind Groucho/TLE repressors or as activators if they change them for  $\beta$ -catenin [57]. Besides the mentioned interacting proteins, plenty of other modulators exist that influence transcription or target genes specificity.

Protein Dazap2 known for its role during heart and brain development has not been associated with Wnt signaling yet [58, 59]. We recognized Dazap2 as an interacting partner of transcription factor TCF4. The very short TCF4 motif (amino acids 214-228) is responsible for the binding. This motif is structurally conserved also in the rest of TCF/LEF protein family members meaning that Dazap2 can interact with all of them. After activation, Dazap2

is found in the TCF4: $\beta$ -catenin protein complex in the nucleus. Otherwise, it is stained both in the cytoplasm and in the dot-like structures in the nucleus. If there are both Dazap2 and TCF4 ectopically expressed in the cells, Dazap2 then completely translocates to the nucleus which only confirms mutual interaction. As for the function, we found that the lower cellular amount of Dazap2 protein leads to the down-regulated Wnt-induced transcription. Because TCF4 binds target genes promoters less while Dazap2 knocked-down we speculate that Dazap2 may influence TCF4 affinity to the specific DNA sequence. Summing up, there is a novel component of the Wnt signaling pathway that regulates TCF/LEF proteins function.

Another TCF4 interacting protein, HIC1, is focused in the last publication. There are several interesting HIC1 properties anticipated by its structure. Firstly, HIC1 is able to bind the universal nuclear co-repressor CtBP [60]. Secondly, the protein is easy to oligomerize and the generated structure is called “HIC1 nuclear bodies” [61]. And lastly, HIC1 specifically interacts with DNA via an individual sequence element (HiRE – HIC1 responsive element) and inhibits target genes [62, 63]. Since CtBP distribution can be regulated by HIC1 and at the same time CtBP regulates TCF/ $\beta$ -catenin driven transcription negatively; we tried to uncover mutual relation among these molecules. Our results confirmed the existence of HIC1 nuclear bodies that effectively drag in both CtBP and TCF4. Even in the absence of CtBP, TCF4 is still retracted into the bodies as a consequence of direct interaction with the repressor HIC1. Canonical Wnt signaling can be negatively modulated by HIC1 in dependence on suppressor oligomerization ability. And HIC1 nuclear bodies also mediate the repression by recruitment of TCF4 with bound  $\beta$ -catenin from target gene promoters. The bodies serve as a kind of depository. HIC1 regulates genes controlling cell growth on one side and cell death resulting from DNA damage on the other. It is the reason why tumors often silence HIC1 and why this protein could be a good object of anticancer therapy.

---

**List of abbreviations: page 3**  
**Literature list: pages 10-12**