

**Charles University in Prague  
Faculty of Sciences**



Summary of dissertation thesis

**Adjusting Wnt signaling**  
**new regulatory mechanisms of the Wnt pathway**

**Mgr. Bohumil Faflek**

Prague, 2012

## **Doctoral studies in biomedicine**

*Charles University in Prague  
and  
Academy of Sciences of the Czech Republic*

Program: Molecular biology, genetics and virology  
Committee chair: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.  
Training institution: Institute of Molecular Genetics, v.v.i.  
Author: Bohumil Fafílek, MSc  
Supervisor: RNDr. Vladimír Kořínek, PhD

The full text of the thesis is available in the respective library of the Faculty of Sciences, Charles University in Prague.

# Contents

Abstract .....	4
Introduction .....	5
List of methods .....	7
Results .....	8
Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts with Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells.....	8
Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling .....	10
Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumour suppressor gene.....	11
Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF4 .....	12
Discussion and conclusions .....	13
References.....	17
Curriculum vitae.....	19

## List of abbreviations

APC	Adenomatous Polyposis Coli
Axin	Axis Inhibition protein
$\beta$ -TrCP	$\beta$ -Transducin repeat-Containing Protein
CBC	Crypt Base Columnar cell, fast cycling Lgr5 <sup>+</sup> intest. stem cell
CK1	Casein Kinase 1
CRD	Cystein Rich Domain
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Fz	Frizzled
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HMG	High Mobility Group
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LGR	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor
LRP	Low density lipoprotein receptor Related Protein
TCF	T Cell-specific transcription Factor

# Abstract

The Wnt pathway is one of the major signaling cascades contributing to multiple cellular processes during embryogenesis, and adult tissue homeostasis and regeneration. Moreover, aberrant activation of the Wnt signaling pathway is connected with development of neoplasia, notably colorectal cancer.

The aim of the thesis was to identify new ways of the Wnt pathway regulation to understand better physiological as well as non-physiological mechanisms of Wnt signaling. The results are summarized in four publications.

The first article deals with *TROY*, a member of tumor necrosis factor receptor family. We identified *TROY* as a Wnt target gene during our search for Wnt responsive genes in colorectal cancer cell lines. Additionally, we detected expression of *Troy* in tumors of two mouse models of intestinal cancer. In the healthy gut, *Troy* is produced in fast cycling intestinal stem cells where negatively regulates the Wnt pathway.

The second study focuses on processing and posttranslational modification of murine Wnt1 and Wnt3a. Wnts are glycosylated and double acetylated by lipid adducts and our results revealed that O-linked acylation of serine is required for the subsequent S-palmitoylation of cysteine. Moreover, acylation of Wnts is connected with their signaling activity which is related to Wnt1 and Wnt3a ability to associate with the extracellular matrix.

The third report describes the generation of conditional knock-out and citrine-reporter alleles of the gene *Hic1*, a tumor suppressor gene which was previously described in our laboratory as a negative regulator of the Wnt signaling pathway.

Finally, protein *Dazap2* a small, evolutionary conserved, ubiquitously expressed gene was identified as an interacting partner of the TCF proteins. We

detected Dazap2 modulates the affinity of TCF4 for its DNA recognition motif and thus enhance the expression of the Wnt signaling target genes.

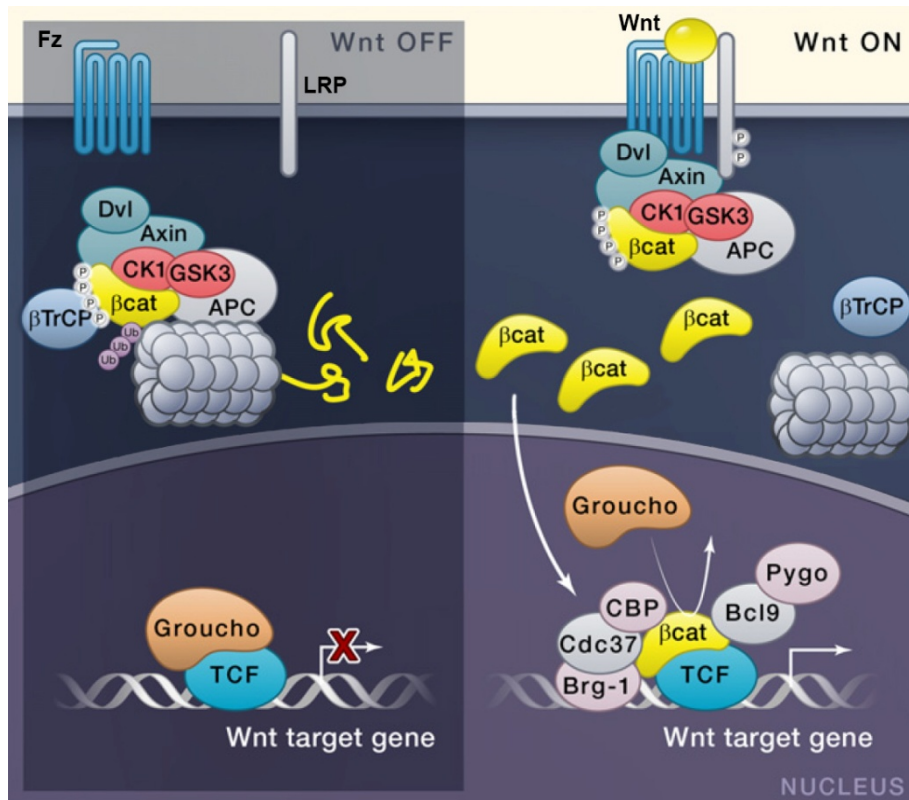
## Introduction

The signaling pathway initiated by the extracellular ligands Wnts is one of a few evolutionarily-conserved signal transduction pathways used largely during animal development, from Hydra to humans<sup>1</sup>. Wnt signals control myriads of processes in animal development, tissue regeneration, stem cell maintenance, synaptic plasticity and neurotransmission, and additionally, cancer development and progression<sup>2</sup>.

The Wnt pathway is initiated by binding of Wnt proteins to the Frizzled/LRP heterodimer at the cell surface<sup>3</sup>. These receptors transduce a signal to protein complex which consist several intracellular proteins including Dishevelled (Dvl), glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3), Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC), and  $\beta$ -catenin. The level of  $\beta$ -catenin is normally kept low in the cell by continuous proteasome-mediated degradation. The process is controlled by above mentioned protein complex and E3 ubiquitin ligase  $\beta$ -transducin repeat-containing protein ( $\beta$ -TrCP) (Figure 1)<sup>4</sup>. When cells receive Wnt signals, the degradation is inhibited, and consequently  $\beta$ -catenin accumulates in the cytoplasm and enters into nucleus. There, it interact with transcription factors of the T cell-specific transcription factor/ lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) family, which are in the absence of the Wnt signal bonded by Groucho transcription repressors, to turn on the expression of large set of genes<sup>5</sup>.

The most notable Wnt targets include members of the Wnt signal transduction pathway itself, providing a negative feedback control, as Axin2, cell cycle progression related genes as c-Myc and stem cells markers as leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor (LGR) 5<sup>1, 6</sup>.

There are numerous regulators that contribute to balanced Wnt pathway activity. To reveal new ways of canonical Wnt pathway regulation were aims of this thesis.



**Figure 1:** A simplified scheme of canonical Wnt signaling. In the absence of Wnt, the  $\beta$ -catenin destruction complex comprising scaffolding proteins Axin and APC, kinases CK1 and GSK3, and protein Dvl continuously binds, phosphorylates, and mediates

ubiquitination of  $\beta$ -catenin by  $\beta$ -TrCP. The proteasome instantly recognizes and degrades such modified  $\beta$ -catenin. Wnt induces the association of the entire complex with phosphorylated LRP through proteins Dvl and Axin, while  $\beta$ -TrCP dissociates. After binding to LRP, the destruction complex saturates with phosphorylated, but not ubiquitinated,  $\beta$ -catenin and newly synthesized  $\beta$ -catenin accumulates in the cytoplasm and enters the cell nucleus. In there, it displaces the Groucho transcriptional repressors from Wnt target gene regulatory elements occupied by TCF transcription factors, and recruits the transcriptional coactivators instead. Modified from the reference<sup>4</sup>.

# List of methods

preparation of plasmids with recombined proteins  
lentiviral/retroviral infection  
cell culture, transfection and generation of stable cell lines  
recombinant protein isolation, coimmunoprecipitations  
western and Southern blotting,  
immunocytochemistry, confocal microscopy, FRET, FACS  
immunohistochemistry, *in situ* hybridization  
radioactive labeling, cell proliferation assay  
double axis formation assay in *Xenopus* embryos  
RNA isolation, cDNA synthesis and qRT PCR  
density gradient ultracentrifugation and extracellular matrix isolation  
reporter assays, cell siRNA treatments  
yeast two hybrid screen  
antigen preparation, antibody purification  
chromatin immunoprecipitation  
expression profiling - microarrays  
transgenic mouse strain preparation, gene targeting, reporter mouse analysis  
bisulfite sequencing  
organoid isolation and cultivation

# Results

## **Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts with Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells**

**Fafílek B**, Krausova M, Vojtechova M, Tumova L, Pospichalova V, Sloncova E, Huranova M, Stancikova J, Sedlacek R, Luksan O, Oliverius M, Voska L, Jirsa M, Paces J, Kolar M, Krivjanska M, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H, Korinek V.

*Gastroenterology*. 2012, accepted for publication

### **Abstract:**

**Background & Aims:** The Wnt signaling pathway is required for maintenance of the intestinal epithelia; blocking this pathway reduces the proliferative capacity of the intestinal stem cells. However, aberrant Wnt signaling leads to intestinal cancer. We investigated the roles of the Wnt pathway in intestinal epithelium homeostasis and during malignant transformation in human cells and mice.

**Methods:** We performed chromatin immunoprecipitation with DNA microarray analysis (ChIP-onchip) to identify genes regulated by Wnt signaling in human colorectal cancer (CRC) cells Colo320, DLD1, LS174T, and SW480. Intestinal tumor formation was induced in C57BL/6J mice using azoxymethane and dextran sulphate. Intestine tissues from these mice, as well as  $Apc^{+/Min}$  and  $Apc^{CKO/CKO}/Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2$  mice, were analyzed by immunohistochemistry and in situ hybridization.

**Results:** We identified promoter regions of 960 genes that interacted with the Wnt pathway nuclear effector T-cell factor 4 in four different human CRC-derived cell lines; 18 of these promoters were present in all chromatin



precipitates. Wnt signaling upregulated a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily called TROY. Levels of TROY mRNA were increased in human cells with deficiencies in the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene and in cells stimulated with the Wnt3a ligand. Troy expression was significantly upregulated in neoplastic tissues from mice during intestinal tumorigenesis. Lineage-tracing experiments revealed that Troy is produced specifically by fast-cycling intestinal stem cells. TROY associated with a unique marker of these cells, leucine-rich-repeat containing G-protein coupled receptor (LGR) 5. In organoids established from the intestinal crypts, Troy suppressed signaling by R-spondin, a Wnt agonist.

**Conclusions:** TROY is upregulated in human colorectal cancer cell lines and in intestinal tumors in mice. It functions as a negative modulator of the Wnt pathway in LGR5-positive stem cells.

## **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. *Cellular signalling*. 2011 May;23(5):837-48. Epub 2011 Jan 16.

### **Abstract:**

The Wnt family of proteins is a group of extracellular signalling molecules that regulate cell-fate decisions in developing and adult tissues. It is presumed that all 19 mammalian Wnt family members contain two types of post-translational modification: the covalent attachment of fatty acids at two distinct positions, and the N-glycosylation of multiple asparagines. We examined how these modifications contribute to the secretion, extracellular movement and signalling activity of mouse Wnt1 and Wnt3a ligands. We revealed that O-linked acylation of serine is required for the subsequent S-palmitoylation of cysteine. As such, mutant proteins that lack the crucial serine residue are not lipidated. Interestingly, although double-acylation of Wnt1 was indispensable for signalling in mammalian cells, in *Xenopus* embryos the S-palmitoyl-deficient form retained the signalling activity. In the case of Wnt3a, the functional duality of the attached acyls was less prominent, since the ligand lacking S-linked palmitate was still capable of signalling in various cellular contexts. Finally, we show that the signalling competency of both Wnt1 and Wnt3a is related to their ability to associate with the extracellular matrix.

## **Generation of two modified mouse alleles of the *Hic1* tumour suppressor gene**

Pospichalova V, Tureckova J, **Fafilek B**, Vojtechova M, Krausova M, Lukas J, Sloncova E, Takacova S, Divoky V, Leprince D, Plachy J, Korinek V. *Genesis*. 2011 Mar;49(3):142-51.

### **Abstract:**

HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a tumor suppressor gene located on chromosome 17p13.3, a region frequently hypermethylated or deleted in human neoplasias. In mouse, *Hic1* is essential for embryonic development and exerts an antitumor role in adult animals. Since *Hic1*-deficient mice die perinatally, we generated a conditional *Hic1* null allele by flanking the *Hic1*-coding region by loxP sites. When crossed to animals expressing Cre recombinase in a cell-specific manner, the *Hic1* conditional mice will provide new insights into the function of *Hic1* in developing and mature tissues. Additionally, we used gene targeting to replace sequence-encoding amino acids 186–893 of *Hic1* by citrine fluorescent protein cDNA. We demonstrate that the distribution of *Hic1*-citrine fusion polypeptide corresponds to the expression pattern of wild-type *Hic1*. Consequently, *Hic1*-citrine “reporter” mice can be used to monitor the activity of the *Hic1* locus using citrine fluorescence.

## **Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF4**

Lukas J, Mazna P, Valenta T, Doubravska L, Pospichalova V, Vojtechova M, **Faflek B**, Ivanek R, Plachy J, Novak J, Korinek V. *Nucleic Acids Research*. 2009 May;37(9):3007-20. Epub 2009 Mar 20.

### **Abstract:**

A major outcome of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway is the transcriptional activation of a specific set of target genes. A typical feature of the transcriptional response induced by Wnt signalling is the involvement of Tcf/Lef factors that function in the nucleus as the principal mediators of signalling. Vertebrate Tcf/Lef proteins perform two well-characterized functions: in association with  $\beta$ -catenin they activate gene expression, and in the absence of Wnt ligands they bind TLE/Groucho proteins to act as transcriptional repressors. Although the general characteristics of Tcf/Lef factors are well understood, the mechanisms that control their specific roles in various cellular backgrounds are much less defined. In this report we reveal that the evolutionary conserved Dazap2 protein functions as a TCF-4 interacting partner. We demonstrate that a short region proximal to the TCF-4 HMG box mediates the interaction and that all Tcf/Lef family members associate with Dazap2. Interestingly, knockdown of Dazap2 not only reduced the activity of Wnt signalling as measured by Tcf/ $\beta$ -catenin reporters but additionally altered the expression of Wnt-signalling target genes. Finally, chromatin immunoprecipitation studies indicate that Dazap2 modulates the affinity of TCF-4 for its DNA recognition motif.

## Discussion and conclusions

The thesis presents several diverse ways of the Wnt pathway modulation. One of the modulations described in the first publication is represented by a molecule of TROY, a member of the tumor necrosis factor receptor family. We found *TROY* is a target gene of the Wnt pathway and it is expressed in human colorectal cancer cells and in mouse tumors. Previously, Troy has been detected as a Wnt/ $\beta$ -catenin target gene by microarray profiling but no data suggested TROY role in Wnt signaling regulation<sup>7, 8</sup>. Moreover, we detected Troy transcripts in fast-cycling Lrg5<sup>+</sup> stem cells, whereas originally Troy expression was confined to the adult central nervous system, the developing hair follicle and embryonic skin<sup>9</sup>.

Additionally, we found TROY interacts with LGR5 and inhibits canonical Wnt signaling, although the mechanism of TROY action is uncertain. Recently, LGR-interacting zinc and ring finger (ZNRF) 3 and ring finger (RNF) 43 transmembrane ubiquitin ligases were identified as negative regulators of Wnt signaling<sup>10, 11</sup>. These related proteins decrease the stability of the Wnt receptor Fz through ubiquitin-mediated degradation. TROY has been found to interact with tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF) 6<sup>12, 13</sup>, an E3 ubiquitin ligase otherwise involved in the NF $\kappa$ B signaling<sup>14</sup>. It is thus possible, that mechanism of TROY action involves ubiquitination mediated by TRAF6, although this hypothesis requires further testing.

Strikingly, Troy deficient mice display relatively subtle and survival-compatible phenotype<sup>15, 16</sup> which would argue for Troy redundancy. Partial redundancy between Troy and homologous protein Edar has already been suggested<sup>9</sup>. However, Edar expression was not observed in CBC cells (unpublished data), which rules out the possible Wnt-related role of Edar in the gut. It is thus more likely that lack of Troy, at least in the gut of *Troy*<sup>-/-</sup> mice, is not compensated by a single molecule but rather by some unknown signaling

mechanism. This regulation is probably somehow eliminated in crypts grown outside the intestinal mesenchyme, i.e. in the case of organoid culture. This may explain why Troy deficiency was manifested only in the organoid culture.

The aim of the second study was to define the relationship between post-translational modification and the signaling activities of Wnt proteins. We demonstrated that for Wnt activity in mammalian cells, the acylation is absolutely essential contrary to glycosylation, which is not absolutely required. These results are in concordance with previous observations that Wnt glycosylation is dispensable for its function<sup>17, 18</sup>. Moreover, our data suggest that N-glycosylation precedes and conditions Wnts for efficient acylation because N-glycosylation-deficient Wnts displayed apparently reduced acyl content. Additionally, our experiments revealed differences in autocrine stimulation induced by glycosylation deficient Wnt1 and Wnt3a. Whereas signaling mediated by sugar-deficient Wnt3a was impaired, as compared to wild-type protein, Wnt1 without sugar modification was able to signal as wild-type Wnt1. Because both ligands were tested in the same cell line, Wnt signal was perceived by the same set of receptors. Thus, N-glycosylation may determine the affinity of Wnt ligands for various Fz receptors.

Concerning the function of the cysteine palmitoylation, our observations support recent finding, which suggested that palmitate moiety mediates interaction of Wnt with lipoprotein particles and thus release of Wnt3a to culture media<sup>19</sup>. As for the serine palmitoleoylation, our data demonstrated that this modification is absolutely essential for Wnt signaling activity, which is also in agreement with previous results<sup>20</sup>. Moreover, recently published report revealing crystal structure of *Xenopus* Wnt8 in complex with a Fz CRD firmly confirmed the necessity of this modification for Wnt-Fz interaction<sup>21</sup>. However, the same study also showed that XWnt8 is mono-lipidated. This result disclose obvious dissimilarity between various Wnts, suggesting that knowledge of structure of

one ligand/receptor complex, although highly valuable, cannot fully cover the complexity of Wnt ligands.

The third publication documents generation of two modified alleles of mouse *Hic1*. The work was based on a previous result of our laboratory which revealed a crosstalk of HIC1 and the canonical Wnt signaling pathway<sup>22</sup>. We have found that HIC1 physically interacts with the TCF4/ $\beta$ -catenin complex and restrain these proteins from the Wnt-responsive promoters and thus attenuates Wnt signaling output<sup>22</sup>. Moreover, HIC1 also interacts with some other proteins of the Wnt signaling cascade like APC and likely Dvl3 (unpublished data).

Since *Hic1*<sup>-/-</sup> mice are embryonically lethal, we generated conditional *Hic1* allele to study role of *Hic1* in canonical Wnt signaling *in vivo*. Additionally, to track *Hic1* expressing cells, we generated *Hic1-citrine* ‘reporter’ strain which expresses a reliable surrogate marker of *Hic1* locus activity. Recent publication reporting genetic interaction between *Hic1* and the Wnt pathway in the intestinal tumors later justified our approach<sup>23</sup>. The study describes accelerated formation of the gastrointestinal tumors in *Apc*<sup>+/ $\Delta$ 716</sup>*Hic1*<sup>+/-</sup> double heterozygote mice which carry a truncating mutation ( $\Delta$ 716) in one allele of the *Apc* gene and one null allele of *Hic1*. Additionally, the absence of *Hic1* protein in tumor tissue was accompanied by the increased expression of genes which are directly repressed by *Hic1* and which are known to promote tumorigenesis e.g. *Sirt1* and *Sox9*<sup>23</sup>. With use of these generated mice strains, we confirmed previously published<sup>23</sup> synergistic effect of *Hic1* with *Apc* in prevention of colorectal carcinogenesis (unpublished results). Moreover, *Hic1* deficient intestinal epithelia displayed elevated expression of Wnt target genes *Lgr5*, *Ascl2*, and *Sp5* (unpublished results). These data indicate that *Hic1* may directly attenuate Wnt signaling in the intestinal epithelium and intestinal tumors which potentially confirms the previously obtained *in vitro* data<sup>22</sup>.

In the fourth report, we provided evidence for an association between TCF proteins and a small evolutionary conserved protein Dazap2. Dazap2 was originally identified as a transcript expressed in the mouse inner ear, in the embryonic heart and in both developing and adult mouse brain<sup>24</sup>. However we found Dazap2 to be ubiquitously expressed in various mouse tissues, concordantly with other groups<sup>25, 26</sup>. Ubiquitous expression of Dazap2 together with its highly conserved evolutionary homology suggests general importance of Dazap2 of yet unknown significance.

Dazap2 was identified as a binding partner of many cellular proteins<sup>27</sup> and our data implicate its role in canonical Wnt signaling as well. The function of Dazap2 might be modulation of the TCF affinity for its recognition motifs, as chromatin immunoprecipitation revealed lower amounts of TCF/ $\beta$ -catenin complexes on synthetic TCF promoter after Dazap2 knockdown. Strikingly, the *Dazap2*<sup>-/-</sup> mice lack any obvious phenotype<sup>24</sup>, which might be explained by redundancy with some other genes. Indeed, a sequence database search in the mouse genome revealed a Dazap2 pseudogene localized on chromosome 4 and one gene similar to Dazap2 on chromosome 13. Function of proteins like Dazap2 may be considered important as there are homologous proteins to provide backup of Dazap2-functionality.



## References

1. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
2. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-51.
3. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000;407:535-8.
4. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149:1192-205.
5. Archbold HC, Yang YX, Chen L, et al. How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;204:74-109.
6. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007;449:1003-7.
7. Buttitta L, Tanaka TS, Chen AE, et al. Microarray analysis of somitogenesis reveals novel targets of different WNT signaling pathways in the somitic mesoderm. *Dev Biol* 2003;258:91-104.
8. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011;469:415-8.
9. Kojima T, Morikawa Y, Copeland NG, et al. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:20742-7.
10. Koo BK, Spit M, Jordens I, et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 2012;488:665-9.
11. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 2012;485:195-200.
12. Naito A, Yoshida H, Nishioka E, et al. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8766-71.
13. Ohazama A, Courtney JM, Tucker AS, et al. *Traf6* is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn* 2004;229:131-5.
14. Wu H, Arron JR. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays* 2003;25:1096-105.

15. Hashimoto T, Schlessinger D, Cui CY. Troy binding to lymphotoxin-alpha activates NF kappa B mediated transcription. *Cell cycle* (Georgetown, Tex 2008;7:106-11.
16. Pispas J, Pummila M, Barker PA, et al. Edar and Troy signalling pathways act redundantly to regulate initiation of hair follicle development. *Hum Mol Genet* 2008;17:3380-91.
17. Mason JO, Kitajewski J, Varmus HE. Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line. *Mol Biol Cell* 1992;3:521-33.
18. Komekado H, Yamamoto H, Chiba T, et al. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells* 2007;12:521-34.
19. Neumann S, Coudreuse DY, van der Westhuyzen DR, et al. Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic* 2009;10:334-43.
20. Willert K, Brown JD, Danenberg E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448-52.
21. Janda CY, Waghray D, Levin AM, et al. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 2012;337:59-64.
22. Valenta T, Lukas J, Doubravska L, et al. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *Embo J* 2006;25:2326-37.
23. Mohammad HP, Zhang W, Prevas HS, et al. Loss of a single Hic1 allele accelerates polyp formation in Apc(Delta716) mice. *Oncogene*.
24. Yang W, Mansour SL. Expression and genetic analysis of prtb, a gene that encodes a highly conserved proline-rich protein expressed in the brain. *Dev Dyn* 1999;215:108-16.
25. Shi Y, Luo S, Peng J, et al. The structure, expression and function prediction of DAZAP2, a down-regulated gene in multiple myeloma. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2004;2:47-54.
26. Sommerfeldt DW, Zhi J, Rubin CT, et al. Proline-rich transcript of the brain (prtb) is a serum-responsive gene in osteoblasts and upregulated during adhesion. *J Cell Biochem* 2002;84:301-8.
27. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 2005;437:1173-8.

## Curriculum vitae

**Name and Surname, title:** Bohumil Fafílek, Mgr.

**Birth date and place:** 1982, Moravská Třebová

**Nationality:** Czech

**Work Phone:** +420 241 062 466

**E-mail:** bohumil.fafilek@img.cas.cz

## EDUCATION

- *2006 – 2012* PhD studies in Genetics, Molecular and Cellular Biology; Faculty of Sciences, Charles University in Prague; Dissertation thesis was focused on novel components and target genes of the Wnt signaling pathway, supervisor: RNDr. Vladimír Kořínek, PhD
- *2004 – 2006* M.Sc. in Cell and Developmental Biology; Faculty of Sciences, Charles University in Prague. Diploma thesis: Localization and expression of the Wnt pathway transcription factor Tcf-3, supervisor: RNDr. Vladimír Kořínek, PhD
- *2001 – 2004* Bc. in Biology; Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia  
Bachelor thesis: Distribution of the connexins Cx40, Cx43 and Cx45 in adult mouse heart, supervisor: Doc. RNDr. Josef Berger, CSc.

## INTERNSHIPS

*2002 – 2003* long term Socrates-Erasmus internship at Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, supervised by Pr. Daniel Gros

## WORKING EXPERIENCE

*2004 – now* Laboratory of Cell and Developmental Biology, Institute of Molecular Genetics AS CR, v.v.i.

## LANGUAGE SKILLS

*English:* advanced, CAE

*French:* advanced

*Deutsch:* beginner

## PUBLICATIONS

Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts with Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells, **Fafílek, B**; Krausová, M; Vojtěchová, M; Pospíchalová, V; Tůmová, L; Šloncová, E; Huranová, M; Stančíková, J; Hlavatá, A; Švec, J; Sedláček, R; Lukšan, O; Oliverius, M; Voska, L; Jirsa, M; Pačes, J; Kolář, M; Krivjanská, M; Klimešová, K; Tlaskalová-Hogenová, H; Kořínek, V; *GASTROENTEROLOGY*, **2012**, accepted for publication; IF=11.675

Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling, Doubravská, L; Krausová, M; Gradl, D; Vojtěchová, M; Tůmová, L; Lukáš, J; Valenta, T; Pospíchalová, V; **Fafílek, B**; Plachý, J; Šebesta, O; Kořínek, V; *CELLULAR SIGNALLING*. **2011** May;23(5):837-48. Epub 2011 Jan 16. IF=4.058

Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumor suppressor gene Pospíchalová, V; Turečková, J; **Fafílek, B**; Vojtěchová, M; Krausová, M; Lukáš, J; Šloncová, E; Takáčová, S; Divoký, V; Leprince, D; Plachý, J; Kořínek, V; *GENESIS* **2011** Mar;49(3):142-51. IF=2.527

Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4, Lukas, J; Mazna, P; Valenta, T; Doubravska, L; Pospichalova, V; Vojtechova, M; **Fafílek, B**; Ivanek, R; Plachy, J; Novak, J; Korinek, V; *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*. 37 (9):3007-3020 **2009**; IF=8.026

HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies, Valenta, T; Lukas, J; Doubravska, L; **Fafílek, B**; Korinek, V, *EMBO JOURNAL* **2006**, 25 (11):2326-2337; IF=9.205

## INTERNATIONAL MEETINGS, POSTERS

TROY, marker of the intestinal stem cells and modulator of their Wnt signal input, Fafílek, B; Krausová, M; Vojtěchová, M; Pospíchalová, V; Tůmová, L; Šloncová, E; Huranová, M; Stančíková, J; Hlavatá, A; Švec, J; Sedláček, R; Lukšan, O; Oliverius, M; Voska, L; Jirsa, M; Pačes, J; Kolář, M; Krivjanská, M; Klimešová, K; Tlaskalová-Hogenová, H; Kořínek, V; **30 Years of Wnt signaling**, Egmond aan Zee, Netherlands; 27.6.-1.7.2012

TROY: a putative regulator of intestinal carcinogenesis and homeostasis driven by Wnt signaling pathway; B. Fafílek, P. Mazna, M. Krausová, V. Pospíchalová, L. Doubravská, L. Tůmová, J. Pačes, V. Kořínek., **EMBO Meeting**, 2010 Barcelona, Spain; 4.-7.9.2010.

Tracking the tumours – new prospective biomarkers in the colorectal cancer development, Fafílek B., Mazna P., Krausova M. Pospichalova V., Doubravska L., Paces J. and Korinek V., **EMBO meeting**, 2009 Amsterdam, Netherlands, 29.8.-1.9.2009

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**



Autoreferát disertační práce

**Adjusting Wnt signaling**  
**nové regulační mechanismy signální dráhy Wnt**

**Mgr. Bohumil Fafílek**

Praha, 2012

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární biologie, genetik a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav Molekulární Genetiky, v.v.i.

Autor: Mgr. Bohumil Fafílek

Školitel: RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

# Obsah

Souhrn .....	4
Úvod .....	5
Použité metody .....	7
Výsledky.....	8
Troy, člen rodiny receptorů faktoru nekrotizujících nádory, interaguje s Lgr5 a inhibuje signalizaci Wnt ve střevních kmenových buňkách. ....	8
Modifikace ligandů Wnt1 a Wnt3a zbytkem mastné kyseliny na serinu je nezbytná pro následnou lipidaci cysteinu a pro signalizaci Wnt ligandů.....	10
Příprava dvou myších kmenů s modifikovanými alelami tumor-supresorového genu Hic1 .....	11
Dazap2 moduluje transkripci řízenou nukleárním proteinem signální dráhy Wnt, TCF4.....	12
Diskuse a závěr.....	13
Literatura .....	17
Životopis.....	19

## Seznam zkratk

APC	Adenomatous Polyposis Coli
Axin	Axis Inhibition protein
$\beta$ -TrCP	$\beta$ -Transducin repeat-Containing Protein
CBC	Crypt Base Columnar cell, fast cycling Lgr5 <sup>+</sup> intest. stem cell
CK1	Casein Kinase 1
CRD	Cystein Rich Domain
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Fz	Frizzled
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HMG	High Mobility Group
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LGR	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor
LRP	Low density lipoprotein receptor Related Protein
TCF	T Cell-specific transcription Factor

# Souhrn

Signální dráha zahajovaná proteiny Wnt řídí mnoho buněčných procesů během embryogeneze a v dospělém organismu se podílí na homeostáze a regeneraci tkání. Navíc její nefyziologická aktivace bývá často spojována s vznikem rakoviny, zejména karcinomu tlustého střeva.

Cílem této práce bylo nalezení nových způsobů regulace signální dráhy Wnt, jež by vedly k hlubšímu pochopení její fyziologické i patologické aktivace. Výsledky, jež jsou pokladem této disertace, jsou shrnuty ve čtyřech publikacích.

První článek představuje protein TROY z rodiny receptorů faktoru nekrotizujících nádory. TROY je cílový gen signální dráhy Wnt, který jsme našli, když jsme hledali geny deregulované aberantní Wnt signalizací v buněčných liniích kolorektálního karcinomu. Zvýšenou expresi genu *Troy* jsme detekovali také v nádorech dvou myších modelů střevní rakoviny. Ve zdravé střevní tkáni je gen *Troy* exprimován pouze v rychle se dělících střevních kmenových buňkách, kde negativně reguluje signální dráhu Wnt.

Druhá studie se zaměřuje na post-translační modifikace myších proteinů Wnt1 a Wnt3a. Ligandy Wnt jsou modifikovány jednak cukernými komplexy a jednak dvěma zbytky mastných kyselin. Naše výsledky odhalili, že modifikace konzervovaného serinu zbytkem kyseliny palmitolejové je potřebná pro následnou modifikaci konzervovaného cysteinu zbytkem kyseliny palmitové. Tyto modifikace ligandů Wnt navíc ovlivňují se jejich schopností signalizovat, která souvisí s vlastností ligandů Wnt vázat se na extracelulární matrix.

Třetí publikace popisuje přípravu podmíněně deletované a reportérové alely s proteinem citrine pro gen *Hic1*. *Hic1* je nádorový supresor, který byl již dříve popsán v naší laboratoři jako negativní regulátor signální dráhy Wnt.

Čtvrtá práce popisuje interakci proteinu *Dazap2*, malého evolučně konzervovaného, všudypřítomně exprimovaného genu, s proteiny TCF rodiny. Zjistili jsme, že *Dazap2* moduluje vazbu proteinu TCF4 na DNA a tak zesiluje expresi cílových genů dráhy Wnt.



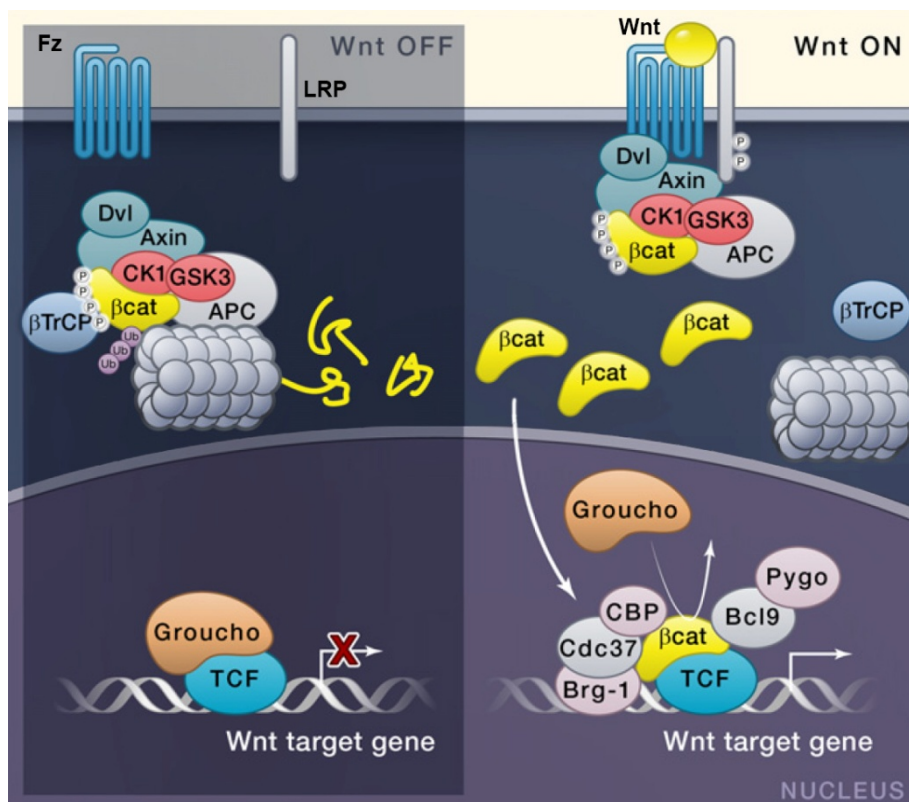
# Úvod

Signální dráha ligandů Wnt je jedna z mála evolučně zachovalých signálních kaskád, jež se ve velké míře podílí na řízení vývoje těla živočichů, od žahavců po savce<sup>1</sup>. Kontroluje různé procesy, jež se účastní vývoje těla živočichů, regenerace tkání, udržování kmenových buněk, synaptické plasticity a přenosu nervových vzruchů, a také vzniku a vývoje rakoviny<sup>2</sup>.

Signalizace proteinů Wnt je zahajována navázáním těchto ligandů na membránový heterodimerní receptor Fz/LRP<sup>3</sup>. Ten potom předává signál dále na komplex složený z proteinů Dishevelled, GSK-3, Axin, APC a  $\beta$ -katenin.  $\beta$ -kateninu je v nestimulované buňce velice málo, protože je kontinuálně odbouráván proteasomovou degradací, jež je řízená výše zmíněným proteinovým komplexem a E3 ubiquitin-ligázou  $\beta$ -TrCP<sup>4</sup>. Navázání ligandu Wnt na receptor zastaví odbourávání  $\beta$ -kateninu,  $\beta$ -katenin se začne hromadit v cytoplazmě a nakonec vstoupí do jádra. V jádře  $\beta$ -katenin vyhledá transkripční faktory TCF rodiny, které do tohoto okamžiku inhibovaly transkripci blízkých genů, aby společně zahájili jejich přepis<sup>5</sup> (Obrázek 1).

Mezi nejvýznamnější cílové geny patří jednak ty, jejichž produkty zpětně inhibují signální dráhu Wnt, jako je Axin2, pak ty jež ovlivňují buněčný cyklus, jako např. c-Myc, a nakonec ty, jejichž produkty značí kmenové buňky jako je např. protein bohatý na leucinové repetice, LGR5<sup>1,6</sup>.

Proteinů, jež přesně regulují úroveň signalizace zahajované ligandy Wnt, je mnoho. Předkládaná disertační práce popisuje čtyři nové nezávislé způsoby korekce signální dráhy ligandů Wnt, zveřejněné ve čtyřech samostatných vědeckých publikacích.



**Obrázek 1:**  
Zjednodušené schéma kanonické signalizace Wnt. Bez stimulace ligandy Wnt dochází v buňkách k permanentní degradaci proteinu  $\beta$ -katenin tzv. destrukčním komplexem, který se skládá z proteinů Axin, APC, Dvl a kináz CK1 a GSK3.

Činností tohoto komplexu je  $\beta$ -katenin fosforylován a následně ubiquitinilován proteiny  $\beta$ -TrCP, což zajistí jeho degradaci v proteazomu. Navázáním ligandu Wnt dojde k fosforylaci proteinu LRP a následné inaktivaci degradačního komplexu. Proteiny Dvl a Axin zprostředkovávají interakci celého degradačního komplexu s fosforylovaným koncem receptoru LRP, čímž dojde k odpojení  $\beta$ -TrCP. Degradační komplex se brzy saturuje fosforylovaným, ale ne ubiquitinilovaným  $\beta$ -kateninem, v důsledku čehož se nově syntetizovaný  $\beta$ -katenin akumuluje v cytoplazmě. Poté  $\beta$ -katenin vstoupí do jádra, kde z transkripčních faktorů TCF vytlačí represory Groucho a s pomocí transkripčních koaktivátorů zahájí transkripci cílových genů signální dráhy Wnt. Upraveno z citace<sup>4</sup>.

# Použité metody

příprava plasmidů s rekombinantními proteiny

infekce retroviru/lentiviru

kultivace buněk, transfekce a příprava stabilních buněčných linií

izolace rekombinantních proteinů, koimunoprecipitace

Southernův blot a western blot,

imunocytochemické barvení, konfokální mikroskopie, FRET, FACS

imunohistochemické barvení, *in situ* hybridizace

značení DNA/proteinů radioaktivitou, měření buněčné proliferace

metoda zdvojení tělní osy v embryích drápatky (*X. laevis*)

izolace RNA, syntéza cDNA and qRT PCR

gradientová ultracentrifugace a izolace extracelulární matrix

měření aktivity reportérových genů, siRNA transfekce

kvasinkový dvojhybridní systém

příprava antigenu, izolace a přečištění protilátek

chromatinová imunoprecipitace

expresní profilování s použitím mikročipů

příprava transgenních myších kmenů, gene targeting, analýza reportérových myší

bisulfitové sekvencování

izolace a kultivace organoidů (struktur střevního epitelu)

# Výsledky

**Troy, člen rodiny receptorů faktoru nekrotizujících nádory, interaguje s Lgr5 a inhibuje signalizaci Wnt ve střevních kmenových buňkách.**

**Fafílek B**, Krausová M, Vojtěchová M, Pospíchalová V, Tůmová L, Šloncová E, Huranová M, Stančíková J, Hlavatá A, Švec J, Sedláček R, Lukšan O, Oliverius M, Voska L, Jirsa M, Pačes J, Kolář M, Krivjanská M, Klimešová K, Tlaskalová-Hogenová H, Kořínek V.  
*Gastroenterology*. 2012, přijato do tisku

## Abstrakt:

**Cíle:** Signální dráha Wnt je nezbytná pro udržení střevního epitelu, protože zablokování této dráhy ve střevních kmenových buňkách snižuje jejich schopnost proliferace. Avšak neřízená aktivace dráhy Wnt podněcuje vznik rakoviny střeva. Zkoumali jsme úlohu dráhy ligandů Wnt v střevní homeostáze a nádorové transformaci lidských buněk a myšího střeva.

**Metody:** S pomocí chromatinové imunoprecipitace spojené s analýzou DNA mikročipů (ChIP-on-chip) jsme našli geny regulované signalizací Wnt v buněčných liniích kolorektálního karcinomu Colo320, DLD1, LS174T a SW480. V myších kmene C57BL/6J jsme indukovali střevní nádory azoxymethanem a dextran-sulfátem. Střevní tkáň těchto myší,  $Apc^{+/Min}$  a  $Apc^{CKO/CKO}/Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2$  myší byla analyzována imunohistochemickým barvením a metodou *in-situ* hybridizace.

**Výsledky:** Analýzou chromatinových precipitátů ze čtyř kolorektálních linií jsme našli 960 genů, do jejichž promotorové oblasti se vázal nukleární efektor signální dráhy Wnt, transkripční faktor TCF4; 18 z těchto genů bylo společných

pro všechny čtyři linie. Signalizace Wnt zvyšovala expresi genu TROY, jež kóduje protein z rodiny receptorů faktoru nekrotizujících nádory. Zvýšené množství mRNA pro TROY bylo detekováno v buněčných kulturách s deficiencí genu způsobující adenomatózní polypózu (APC) a v buňkách které byly stimulovány ligandem Wnt3a. Exprese genu *Troy* byla rovněž zesílená v nádorech myšího střeva. Značení dceřiných buněk (lineage-tracing) odhalilo, že *Troy* je produkován specificky v rychle se dělících střevních kmenových buňkách. TROY interagoval s proteinem produkovaným unikátně v těchto buňkách, receptorem asociovaným s G proteiny a bohatým na leuciny; LGR5. V kultuře organoidů střevních krypt TROY inhiboval signalizaci agonisty Wnt ligandů, proteinu R-spondin.

**Závěr:** Exprese genu TROY je zvýšená v lidských kolorektálních liniích a myších střevních nádorech. TROY funguje jako negativní regulátor signální dráhy Wnt v LGR5-pozitivních buňkách.

## **Modifikace ligandů Wnt1 a Wnt3a zbytkem mastné kyseliny na serinu je nezbytná pro následnou lipidaci cysteinu a pro signalizaci Wnt ligandů**

Doubravská L, Krausová M, Gradl D, Vojtěchová M, Tůmová L, Lukáš J, Valenta T, Pospíchalová V, **Fafílek B**, Plachý J, Šebesta O, Kořínek V. *Cellular signalling*. 2011 May;23(5):837-48. Epub 2011 Jan 16.

### **Abstrakt:**

Rodina proteinů Wnt představuje skupinu mimobuněčných signálních molekul, jež regulují vývoj buněk během ontogeneze i v dospělém organismu. Předpokládá se, že všech 19 savčích ligandů Wnt je poznamenáno dvěma typy posttranslačních modifikací: připojením mastné kyseliny na dvě různé pozice polypeptidového řetězce kovalentní vazbou, a N-glykosylací několika asparaginů. Zjišťovali jsme, jak tyto modifikace přispívají k sekreci, pohybu mezi buňkami a signální aktivitě myších proteinů Wnt1 a Wnt3a. Objevili jsme, že lipidace serinu, je nezbytná pro následnou modifikaci cysteinu zbytkem kyseliny palmitové. Proteiny Wnt, které mutací ztratili serin, tedy nebyly modifikovány žádným zbytkem mastné kyseliny. Je zajímavé, že i když je modifikace proteinu Wnt1 dvěma zbytky mastných kyselin nepostradatelná pro jeho signalizační funkci v savčích buňkách, mutantní Wnt1 bez lipidovatelného serinu měl schopnost aktivovat dráhu Wnt v embryích drápatky *X. Laevis*. V případě ligandu Wnt3a nebyla funkce lipidových modifikací tak jednoznačná, neboť i molekuly, jež nebyly modifikovány zbytkem kyseliny palmitové, byly stále schopny aktivovat dráhu Wnt, a to v různých typech buněk. Avšak v obou případech, Wnt1 i Wn3a, je schopnost signalizovat spojená s asociací ligandů Wnt k extracelulární matrix.

## **Příprava dvou myších kmenů s modifikovanými alelami tumor-supresorového genu Hic1**

Pospichalová V, Turečková J, **Fafílek B**, Vojtěchová M, Krausová M, Lukáš J, Šloncová E, Takáčová S, Divoký V, Leprince D, Plachý J, Kořínek V. *Genesis*. 2011 Mar;49(3):142-51.

### **Abstrakt:**

HIC1 (hypermethylated in cancer 1) je tumor-supresorový gen nacházející se v oblasti chromozomu 17p13.3, místě, které je v nádorech často zasažené hypermetylací či delecí. U myši se Hic1 podílí na embryonálním vývoji a u dospělců má protinádorovou funkci. Protože myši, jimž chybí Hic1, umírají již před narozením, připravili jsme kondiciovanou alelu genu Hic1, v níž je kódující oblast tohoto genu obklopena loxP místy. Když se takováto myš zkříží s jedincem, jenž produkuje v určitých typech buněk Cre rekombinázu, dostaneme potomstvo, na němž budeme moci studovat úlohu genu Hic1 ve vyvíjejících se i dospělých tkáních. Navíc jsme ještě připravili reportérovou myš, v níž jsme kódující oblast genu Hic, odpovídající aminokyselinám 186-893, naradili cDNA fluorescenčního proteinu citrine. Dokázali jsme, že fúzní protein Hic1-citrine je produkován stejným způsobem jako původní bílkovina Hic1 a tedy, že je možno využívat fluorescence proteinu citrine v těchto reportérových myších ke sledování aktivity lokusu Hic1.

## **Dazap2 moduluje transkripci řízenou nukleárním proteinem signální dráhy Wnt, TCF4**

Lukáš J, Mazna P, Valenta T, Doubravská L, Pospíchalová V, Vojtěchová M, **Fafílek B**, Ivánek R, Plachý J, Novák J, Kořínek V. *Nucleic Acids Research*. 2009 May;37(9):3007-20. Epub 2009 Mar 20.

### **Abstrakt:**

Hlavním výstupem kanonické signalizace dráhy Wnt/ $\beta$ -katenin je aktivace transkripce specifické skupiny genů. Typickým znakem této transkripční odpovědi na stimulaci ligandy Wnt je zapojení nukleárních proteinů Tcf/Lef rodiny, jež fungují jako hlavní zprostředkovatelé transkripční odpovědi. Proteiny Tcf/Lef mají u savců dvě dobře popsání úlohy: ve spojení s  $\beta$ -kateninem aktivují genovou expresi, a pokud buňka není stimulována ligandy Wnt, tak vážou faktory TLE/Groucho a fungují naopak jako transkripční represory. Přestože obecné funkce Tcf/Lef proteinů jsou dobře známy, přesné mechanismy, které kontrolují jejich specifickou úlohu v jednotlivých buněčných typech, nejsou tak zřejmé. V této publikaci odhalujeme roli evolučně konzervovaného proteinu Dazap2 jako interakčního partnera proteinu TCF-4. Ukazujeme, že krátký polypeptidový úsek v blízkosti HMG boxu protein TCF-4 zprostředkovává vazbu molekuly Dazap2 a že takto interagují s proteinem Dazap2 všichni členové proteinové Lef/Tcf rodiny. Je pozoruhodné, že vyřazení bílkoviny Dazap2 z funkce metodou siRNA nejen snížilo odpověď buněk na stimulaci ligandy Wnt, ale i změnilo expresi cílových genů signální dráhy Wnt. A konečně, pomocí chromatinové imunoprecipitace jsme dokázali, že Dazap2 upravuje vazbu proteinu TCF-4 na DNA.



## Diskuse a závěr

Disertační práce představuje několik způsobů regulace signální dráhy ligandů Wnt. První z nich je zastoupen molekulou proteinu TROY, člena rodiny receptorů faktoru nekrotizujícího nádory. Zjistili jsme, že *TROY* je cílovým genem signální dráhy Wnt a že je tedy exprimován v lidských a myších střevních nádorech. Troy byl již dříve označen za cílový gen signální dráhy Wnt, ale dosud mu nikdo nepřikládal úlohu v regulaci Wnt dráhy<sup>7, 8</sup>. Navíc jsme zjistili, že Troy je produkován v rychle se dělících střevních kmenových buňkách značených proteinem Lgr5. Dříve byla totiž exprese genu Troy detekována jenom v centrální nervové soustavě, vyvíjejících se vlasových folikulech a kůži myších embryí<sup>9</sup>. Největším přínosem této publikace pak bylo zjištění, že Troy s proteinem Lgr5 interaguje a neznámým mechanismem inhibuje kanonickou signalizaci Wnt. Nedávno byly objeveny dva homologní transmembránové proteiny ZNRF3 a RNF43, jež fungují jako E3 ubiquitinové ligázy a negativní regulátory signální dráhy Wnt<sup>10, 11</sup>. Jejich aktivitou je z membrány odbouráván protein Fz. Bylo popsáno, že TROY interaguje s proteinem TRAF6, E3 ubiquitinovou ligázou, která se podílí na NFκB signalizaci<sup>12-14</sup>. Možná, že TROY v komplexu s TRAF6 funguje podobným způsobem jako proteiny RNF43/ZNRF3. Tato hypotéza ale musí být testována dalšími experimenty.

*Troy*<sup>-/-</sup> myši překvapivě nevykazují žádný výrazně abnormální fenotyp<sup>15, 16</sup>, což naznačuje postradatelnost genu *Troy*. Částečná redundance genu *Troy* s homologním genem *Edar*, již byla navržena<sup>9</sup>. Avšak *Edar* není produkován v střevních kmenových CBC buňkách (nepublikované výsledky), takže jeho zapojení do signální dráhy ligandů Wnt můžeme v tomto systému vyloučit. Spíše to vypadá, že nedostatek proteinu Troy je kompenzován nějakým jiným, dosud neznámým, mechanismem. Ten je zjevně vyřazen z provozu v kryptách,

jež rostou mimo střevní mesenchym, jako je systém střevních organoidů. Jedině tak si lze vysvětlit, že rozdíl mezi *Troy*<sup>-/-</sup> a normálními myši se projevil až při kultivaci střevních organoidů derivovaných z těchto myší.

Cílem druhé práce bylo objasnit vztah posttranslačních modifikací ligandů Wnt k jejich schopnosti signalizovat. Zjistili jsme, že na rozdíl od glykosylací, je modifikace zbytky mastných kyselin naprosto zásadní pro signální aktivitu savčích ligandů Wnt. Tyto naše výsledky potvrzují již dříve publikované závěry, že glykosylace ligandů Wnt není pro jejich funkci nezbytná<sup>17, 18</sup>. Avšak navíc naše data naznačují, že glykosylace proteinů Wnt předchází a podmiňuje jejich lipidaci, protože Wnt ligandy s mutovanými glykosylačními místy vykazovali sníženou míru modifikace zbytky mastných kyselin. Rovněž jsme zjistili, že neglykosylovaný Wnt3a nebyl schopen parakrinní signalizace, zatímco Wnt1 bez cukerných modifikací signalizoval jako nemutovaný Wnt1. Protože oba ligandy byly testovány v jedné buněčné linii, jejich signál byl přijímán stejnou sestavou receptorů. N-glykosylace tak může určovat afinitu jednotlivých Wnt ligandů k různým Fz receptorům.

Naše závěry týkající se funkce zbytku kyseliny palmitové na cysteinu podporují nedávno publikované výsledky, tedy že palmitát zprostředkovává vazbu Wnt3a ligandu s lipoproteiny a tak zajišťuje jeho uvolňování do média<sup>19</sup>. Naše výsledky také ukazují, že modifikace konzervovaného serinu zbytkem kyseliny palmitolejové je naprosto nezbytná pro signalizaci Wnt ligandů, což je ve shodě s dříve publikovanými výsledky<sup>20</sup>. Letošní publikace krystalové struktury Wnt8 žáby drápatky (*X. Laevis*) v komplexu s CRD doménou receptoru Fz ukazuje, že se zbytek kyseliny palmitolejové, připojený k tomuto konzervovanému serinu, podílí na vazbě Wnt ligandu k receptoru Fz, což dokazuje potřebnost této modifikace pro signální schopnost ligandů Wnt<sup>21</sup>. Stejná publikace ale také ukazuje, že XWnt8 je modifikovaný jenom jedním

zbytkem mastné kyseliny, na rozdíl od proteinů Wnt3a a Wnt1. Přestože je odhalení krystalické struktury Wnt ligandu velkým krokem kupředu, tak znalost jenom krystalické struktury jednoho proteinu Wnt nemůže pokrýt komplexnost celé rodiny ligandů Wnt.

Třetí práce popisuje přípravu dvou modifikovaných myších alel genu *Hic1*. Vychází z předchozích výsledků naší laboratoře, které odhalili vztah mezi proteinem Hic1 a kanonickou signalizací Wnt<sup>22</sup>. Zjistili jsme, že HIC1 fyzicky interaguje s komplexem TCF4/β-katenin, vyvazuje ho z promotorů cílových genů signální dráhy Wnt a tak oslabuje působení signalizace Wnt. Navíc HIC1 interaguje s dalšími proteiny signální dráhy Wnt jako je APC a Dvl3 (nepublikované výsledky).

Protože *Hic1*<sup>-/-</sup> myši jsou embryonálně letální, připravili jsme alelu myšího genu *Hic1*, kde je větší část kódující sekvence genu *Hic1* ohraničena loxP místy. Takto může být sekvence DNA mezi loxP místy v určených buňkách odstraněna Cre rekombinázou, což nám umožní studovat úlohu genu *Hic1* v těchto buňkách *in vivo*. Navíc, abychom mohli sledovat buňky, které exprimují Hic1, jsme připravili i druhý myší kmen, kde je větší část kódující sekvence genu *Hic1* nahrazena reportérovým genem pro fluorescenční protein citrine. Nedávná publikace nám potvrdila, že bylo správné spojovat signalizaci Wnt s genem *Hic1*<sup>23</sup>. Její autoři popisují zvýšenou tvorbu nádorů gastrointestinálního traktu u *Apc*<sup>+/ $\Delta$ 716</sup>*Hic1*<sup>+/-</sup> myši, tedy zvířat, která mají jednu alelu pro zkrácený ( $\Delta$ 716), tj. nefunkční, protein Apc a postrádají jednu alelu genu *Hic1*. Navíc byla u nádorů těchto myši pozorována zvýšená exprese genů *Sirt1* a *Sox9*, jež jsou ve zdravé buňce reprimovány proteinem Hic1, ale v zasažené buňce podporují kancerogenezi. S použitím myši s podmíněně deletovanou alelou genu *Hic1* jsme potvrdili synergistické působení genů *Hic1* a *Apc* v prevenci vzniku střevních nádorů (nepublikované výsledky). Z našich dat navíc vyplývá, že

střevní epitel s deletovaným genem *Hic1* vykazuje zvýšenou expresi cílových genů signální dráhy Wnt, *Lgr5*, *Ascl2* a *Sp5* (nepublikované výsledky) což potvrzuje naši předchozí tezi získanou *in vitro*, že *Hic1* zeslabuje působení signální dráhy Wnt.

Ve čtvrtém článku představujeme interakci mezi TCF proteiny a malým evolučně konzervovaným proteinem *Dazap2*. Ačkoliv byl *Dazap2* původně popsán jako gen exprimovaný v myším vnitřním uchu, mozku a embryonálním srdci a mozku<sup>24</sup>, my jsme společně s dalšími skupinami detekovali expresi genu *Dazap2* prakticky ve všech tkáních<sup>25, 26</sup>. To, že *Dazap2* je evolučně vysoce konzervován, a že je exprimován v mnoha různých tkáních, naznačuje, že se jedná o důležitý protein, dosud neznámého významu.

*Dazap2* byl popsán jako vazebný partner mnoha buněčných proteinů<sup>27</sup> a naše data naznačují jeho roli také v signalizaci Wnt. Jeho funkce bude pravděpodobně spočívat v modulaci vazby TCF proteinů na DNA, protože jsme detekovali menší množství TCF/ $\beta$ -katenin komplexu na syntetickém Wnt-responsivním promotoru v experimentu kde bylo sníženo množství *Dazap2* transkriptu metodou RNAi.

*Dazap2*<sup>-/-</sup> myši nemají žádný závažný fenotyp<sup>24</sup>, což naznačuje, že jeho funkce může být nahrazena nějakým homologním proteinem. V databázi myšího genomu se nacházejí dva lokusy s podobnou sekvencí jako *Dazap2*; jeden pseudogen na chromozómu 4 a jeden homologní gen na chromozómu 13. Tyto homologní sekvence mohou poskytovat zálohu funkčnosti proteinů typu *Dazap2* což potvrzuje jejich důležitost.

# Literatura

1. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
2. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-51.
3. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000;407:535-8.
4. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149:1192-205.
5. Archbold HC, Yang YX, Chen L, et al. How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;204:74-109.
6. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007;449:1003-7.
7. Buttitta L, Tanaka TS, Chen AE, et al. Microarray analysis of somitogenesis reveals novel targets of different WNT signaling pathways in the somitic mesoderm. *Dev Biol* 2003;258:91-104.
8. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011;469:415-8.
9. Kojima T, Morikawa Y, Copeland NG, et al. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:20742-7.
10. Koo BK, Spit M, Jordens I, et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 2012;488:665-9.
11. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 2012;485:195-200.
12. Naito A, Yoshida H, Nishioka E, et al. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8766-71.
13. Ohazama A, Courtney JM, Tucker AS, et al. Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn* 2004;229:131-5.

14. Wu H, Arron JR. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays* 2003;25:1096-105.
15. Hashimoto T, Schlessinger D, Cui CY. Troy binding to lymphotoxin-alpha activates NF kappa B mediated transcription. *Cell cycle* (Georgetown, Tex 2008;7:106-11.
16. Pispas J, Pummila M, Barker PA, et al. Edar and Troy signalling pathways act redundantly to regulate initiation of hair follicle development. *Hum Mol Genet* 2008;17:3380-91.
17. Mason JO, Kitajewski J, Varmus HE. Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line. *Mol Biol Cell* 1992;3:521-33.
18. Komekado H, Yamamoto H, Chiba T, et al. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells* 2007;12:521-34.
19. Neumann S, Coudreuse DY, van der Westhuyzen DR, et al. Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic* 2009;10:334-43.
20. Willert K, Brown JD, Danenberg E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448-52.
21. Janda CY, Waghray D, Levin AM, et al. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 2012;337:59-64.
22. Valenta T, Lukas J, Doubravska L, et al. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *Embo J* 2006;25:2326-37.
23. Mohammad HP, Zhang W, Prevas HS, et al. Loss of a single Hic1 allele accelerates polyp formation in Apc(Delta716) mice. *Oncogene*.
24. Yang W, Mansour SL. Expression and genetic analysis of prtb, a gene that encodes a highly conserved proline-rich protein expressed in the brain. *Dev Dyn* 1999;215:108-16.
25. Shi Y, Luo S, Peng J, et al. The structure, expression and function prediction of DAZAP2, a down-regulated gene in multiple myeloma. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2004;2:47-54.
26. Sommerfeldt DW, Zhi J, Rubin CT, et al. Proline-rich transcript of the brain (prtb) is a serum-responsive gene in osteoblasts and upregulated during adhesion. *J Cell Biochem* 2002;84:301-8.
27. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 2005;437:1173-8.

## ŽIVOTOPIS

**Jméno a příjmení, titul:** Bohumil Fafílek, Mgr.

**Rok a místo narození:** 1982, Moravská Třebová

**Státní příslušnost a národnost:** Česká republika, česká

**Telefon:** +420 241 062 466

**E-mail:** bohumil.fafilek@img.cas.cz

## VZDĚLÁNÍ

• *2006 – 2012* Doktorandské studium na Přírodovědecké fakultě UK, obor Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie; Disertační práce zaměřená na jaderné komponenty a cílové geny signální dráhy Wnt, školitel: RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.

*2004 – 2006* Studium na Přírodovědecké fakultě UK, obor Buněčná a vývojová biologie, zaměření Buněčná fyziologie a vývojová biologie, ukončené magisterskou státní zkouškou. Diplomová práce: Lokalizace a exprese Tcf-3, transkripčního faktoru v signální dráze Wnt, školitel: RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.

• *2001 – 2004* Studium na Biologické fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích zakončené bakalářskou státní zkouškou. Bakalářská práce: Distribution of the connexins Cx40, Cx43 and Cx45 in adult mouse heart, školitel: Doc. RNDr. Josef Berger, CSc.

## ZAHRANIČNÍ STÁŽE

*2002 – 2003* Dvanáctiměsíční stáž Sokrates-Erasmus na Université de la Méditerranée Aix-Marseille II pod vedením Pr. D. Grose

## ZAMĚSTNÁNÍ

*2004 – dosud* Laboratoř buněčné a vývojové biologie, Ústav molekulární genetiky AVČR, v.v.i.

## ZNALOST CIZÍCH JAZYKŮ

*Angličtina:* pokročilý, CAE

*Francouzština:* pokročilý

*Němčina:* začátečník

## PUBLIKACE

Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts with Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells, **Fafílek, B**; Krausová, M; Vojtěchová, M; Pospíchalová, V; Tůmová, L; Šloncová, E; Huranová, M; Stančíková, J; Hlavatá, A; Švec, J; Sedláček, R; Lukšan, O; Oliverius, M; Voska, L; Jirsa, M; Pačes, J; Kolář, M; Krivjanská, M; Klimešová, K; Tlaskalová-Hogenová, H; Kořínek, V; *GASTROENTEROLOGY* **2012**, přijato do tisku IF=11,675

Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling, Doubravská, L; Krausová, M; Gradl, D; Vojtěchová, M; Tůmová, L; Lukáš, J; Valenta, T; Pospíchalová, V; **Fafílek, B**; Plachý, J; Šebesta, O; Kořínek, V; *CELLULAR SIGNALLING*. **2011** May;23(5):837-48. Epub 2011 Jan 16. IF=4,058

Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumor suppressor gene Pospichalová, V; Turečková, J; **Fafílek, B**; Vojtěchová, M; Krausová, M; Lukáš, J; Šloncová, E; Takáčová, S; Divoký, V; Leprince, D; Plachý, J; Kořínek, V; *GENESIS*. **2011** Mar;49(3):142-51 IF=2,527

Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4, Lukas, J; Mazna, P; Valenta, T; Doubravska, L; Pospichalova, V; Vojtechova, M; **Fafílek, B**; Ivanek, R; Plachy, J; Novak, J; Korinek, V; *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*. 37 (9):3007-3020 **2009**, IF=8,026

HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies, Valenta, T; Lukas, J; Doubravska, L; **Fafílek, B**; Korinek, V, *EMBO JOURNAL* **2006**, 25 (11):2326-2337 IF=9,205

## PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ NA ZAHRANIČNÍCH KONFERENCÍCH

TROY, marker of the intestinal stem cells and modulator of their Wnt signal input, Fafílek, B; Krausová, M; Vojtěchová, M; Pospíchalová, V; Tůmová, L; Šloncová, E; Huranová, M; Stančíková, J; Hlavatá, A; Švec, J; Sedláček, R; Lukšan, O; Oliverius, M; Voska, L; Jirsa, M; Pačes, J; Kolář, M; Krivjanská, M; Klimešová, K; Tlaskalová-Hogenová, H; Kořínek, V; **30 Years of Wnt signaling**, Egmond aan Zee, Holandsko; 27.6.-1.7.2012

TROY: a putative regulator of intestinal carcinogenesis and homeostasis driven by Wnt signaling pathway; B. Fafílek, P. Mazna, M. Krausová, V. Pospíchalová, L. Doubravská, L. Tůmová<sup>1</sup>, J. Pačes, V. Kořínek., **EMBO Meeting**, 2010 Barcelona, Španělsko; 4.-7.9.2010.

Tracking the tumours – new prospective biomarkers in the colorectal cancer development, Fafílek B., Mazna P., Krausova M. Pospichalova V., Doubravska L., Paces J. and Korinek V., **EMBO meeting**, 2009 Amsterdam, Holandsko, 29.8.-1.9.2009