

# Discovery of ligands for Frizzled and their promises for the diagnosis and treatment of cardiovascular disease

Citation for published version (APA):

Laeremans, H. (2010). *Discovery of ligands for Frizzled and their promises for the diagnosis and treatment of cardiovascular disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20100519hl>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2010

**DOI:**

[10.26481/dis.20100519hl](https://doi.org/10.26481/dis.20100519hl)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

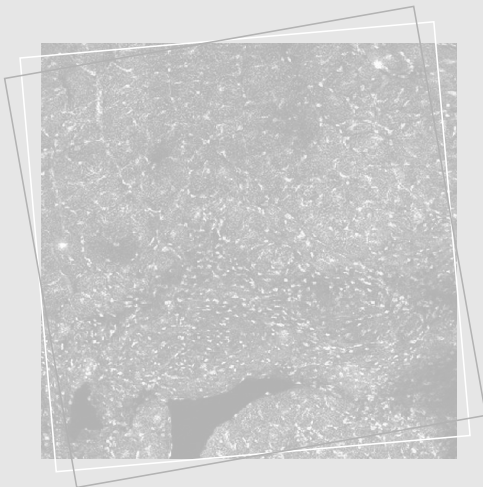
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# 9

## Summary



Myocardial infarction (MI) is a common pathology in Western countries. Most people will survive the acute phase of myocardial infarction and enter the phase of wound healing. Wound healing is a very complex process that, when not proceeding adequately, can lead to a wide range of complications. The body will try to counteract the deteriorating cardiac function by activating compensatory mechanisms. Initially, these compensatory mechanisms will lead to sustained cardiac function, but in long term this can result in heart failure.

Many different signal transduction cascades are involved in wound healing. In this thesis, one of these signal transduction cascades will be highlighted, namely the Wnt/Frizzled (Fzd) signal transduction cascade. This signal transduction cascade caught our interest, because previous experiments in our lab indicated that expression of specifically Fzd-1 and -2, were upregulated after MI.

Although Wnt/Fzd has been examined for a long time, many deficiencies still exist in the knowledge of specific Wnt/Fzd pharmacology. To evaluate this experimentally, we had to search for an appropriate cell line (**Chapter 2**). Our experiments indicate that the human embryonic kidney cells, HEK293, were most suitable. All elements of both the  $\beta$ -catenin dependent and independent signal transduction pathways are present in the HEK cells. Furthermore, the presence of high levels of the different components of the signal transduction cascade, prove the suitability of this cell line. Next step was to examine possible differences between different sources of Wnt proteins. To this end, we compared recombinant proteins, conditioned medium and plasmid constructs containing Wnt sequences. The results were similar, so we decided to use the conditioned medium.

Because studying the interactions between all 19 Wnts and 10 Frizzleds was beyond our capabilities, we focused on Fzd-1 and -2 because these receptors are upregulated in MI. This study led to the conclusion that both Fzd-1 and -2 preferably bind Wnt3a and Wnt5a, whereby Wnt3a can activate both the  $\beta$ -catenin dependent and independent pathway, whereas Wnt5a can only activate the  $\beta$ -catenin independent pathway. Furthermore, Wnt5a can act as a natural antagonist for Wnt3a in  $\beta$ -catenin dependent signaling. No differences could be detected in the activity of Fzd proteins from different species. We also proved that the co-receptors LRP5/6 mainly function to facilitate the binding of Wnt to Fzd and the intracellular part of LRP could enhance the signal. Furthermore, LRP6 seemed more potent than LRP5 (**Chapter 2**).

The next step was to test Wnt-Fzd signaling in a clinically more relevant cell system. To this end, we studied the most important cell type in the heart, namely the fibroblast. A cardiac fibroblast cell line immortalized with telomerase, that we called

CFIT, was developed in our lab. We studied the influences of Wnt/Fzd on CFIT proliferation, differentiation and migration (**Chapter 3**). These experiments showed that proliferation was unaffected by Wnt/Fzd signaling. Migration was delayed by Fzd-1 and -2 alone or in combination with either Wnt3a or Wnt5a, and this could be attributed to non- $\beta$ -catenin mediated signaling. The CFIT differentiation was studied using myofibroblast differentiation markers, where we observed both stimulatory and inhibitory effects of different combinations of Wnts and Fzds. Therefore, we can conclude that Wnt/Fzd signaling is very complex, whereby specific Wnt/Fzd combination and the activated signal transduction pathway play a crucial role.

In **Chapter 4**, we studied the effects of Wnt/Fzd signaling in smooth and skeletal muscles. Wnt/Fzd had no influence on the proliferation. Differentiation, on the other hand, was controlled by Wnt/Fzd in a manner similar to that observed in CFIT. Both Fzd-1 and -2 could influence the differentiation of the muscle cells. Furthermore, these data confirm previous reports in the literature that smooth muscle cells could differentiate into skeletal muscle cells. These data also support the idea of the  $\beta$ -catenin independent pathway as main controller of migration.

The results of this thesis, combined with the literature, suggest that blocking Wnt/Fzd signaling can improve cardiac remodeling after MI. Because Wnts are very large and sticky proteins that usually act as agonist rather than antagonists, they are not suitable for *in vivo* therapy and visualization. This led to the development of peptidergic antagonists, which specifically interact with Fzd-1 and -2 and were derived from their natural ligands Wnt3a and -5a (**Chapter 5**). These peptides were called: UM206, UM207 and UM208. UM206 was easiest to dissolve and had the highest affinity for Fzd-1 and -2,  $IC_{50}$  of  $10^{-9}$ M and  $10^{-11}$ M, respectively. The amino acids Gly, Thr and Asp were shown to be critical, as well as the presence of at least one cysteine. All these peptides displayed a high specificity; no reactivity could be measured with Fzd-4 and -5. UM206 was also tested in CFIT and showed significant inhibition of the effect of Wnt/Fzd on the migration and differentiation. These results indicate that both the  $\beta$ -catenin dependent and independent pathway can be blocked by UM206. Furthermore, these effects were species independent and active on recombinant protein, conditioned medium and constructs.

The *in vitro* data indicate that UM206 is an excellent candidate for *in vivo* testing (**Chapter 5**). Pharmacokinetic experiments showed that UM206 was stable and had a plasma half-life of around 90 min. Because of this favorable pharmacokinetics and high efficacy, UM206 was administered in the mouse MI model for 2 and 5 weeks, starting at the moment of infarction. Infarct area was significantly reduced and infarct wall thickness was increased in UM206-treated animals. The amount of myofibroblasts was also significantly increased. These were all indicators of favor-

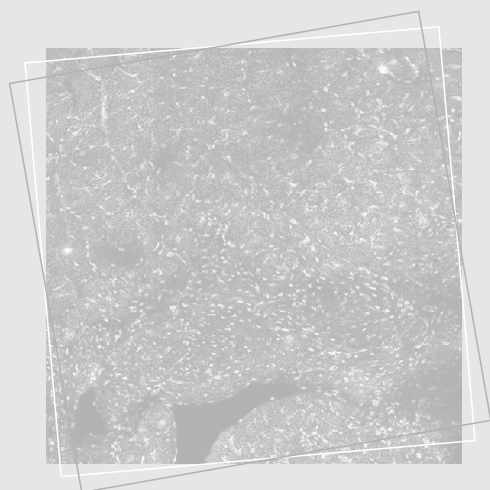
able cardiac remodeling. Moreover, in the 5 week treatment group, the development of heart failure could be prevented completely. In these animals, end diastolic volume was decreased, the ejection fraction was elevated and pump function was improved compared to the untreated mice. Collagen content was however decreased, preventing stiffening of the heart. All these studies indicate that UM206 can prevent heart failure and improve cardiac function after MI; the most likely mechanism of action is a reduced infarct expansion because of an augmented myofibroblast content of the infarct area.

One of the aims of the present project was to test the validity of Fzd-1 and -2 as a marker for the quality of infarct healing. To this end, we developed two different tools, namely rhodamine-labeled UM206 and an Fzd-2 antibody, in our research group (**Chapter 6**). Tests on different cell lines exhibited that the activity and specificity of UM206-rhodamine were preserved after labeling. This substance was tested on paraffin and frozen sections of kidney and small intestine, organs known to contain Fzd-1 and Fzd-2. These results could be confirmed by immunohistochemistry, using the Fzd-2 specific antibody. Moreover, *in vitro* experiments revealed that stimulation with Wnt3a or Wnt5a, activating either the  $\beta$ -catenin dependent or independent pathway, led to internalization of Fzd-1 and -2. Finally, infusion of the Fzd-2 antibody in a mouse was shown to allow visualization of the Fzd-1 and -2 receptors in kidney and small intestine. These results suggest that both UM206-derived imaging compounds and the Fzd-2 antibody can be used for *in vivo* diagnostics, e.g. of the Fzd-1 and/or -2 content of the infarct area as a predictor of excessive dilatation and heart failure development.

In **Chapter 7**, a pilot experiment on the involvement of Wnt/Fzd signaling in the development of atherosclerosis is described. Using a model in which carotid collars are placed in LDL receptor knockout mice, inhibition of Wnt/Fzd signaling by UM206 led to an increased plaque area with more cholesterol deposits. However, the cap of the plaque was thicker and contained more  $\alpha$ -smooth muscle actin positive cells, suggesting a more stable plaque phenotype. These data show for the first time that blocking Fzd-1 and -2 mediated signaling can modulate the characteristics of an atherosclerotic plaque, and call for a more in-depth analysis of this phenomenon. In conclusion, in this thesis the development of a substance with high affinity and specificity for Fzd-1 and -2 is described, which was tested and validated in *in vitro* standard cell lines and more clinical relevant cells as well as in *in vivo* studies. UM206 is the first low molecular weight ligand that can block the interaction between Wnt proteins and Fzd-1 and -2. This substance may offer a broad range of therapeutic and diagnostic applications in cardiovascular diseases, but also in other conditions where Fzd-1 and -2 signaling plays a role.

# 10

## Samenvatting



Het myocardinfarct (MI) is een frequente aandoening in de Westerse wereld. De meeste mensen overleven de acute fase van een myocardinfarct, waarna wondgenezing van start gaat. Wondgenezing is een erg complex proces wat kan leiden tot diverse complicaties, indien het niet correct verloopt. Het lichaam zal de verslechterde hartfunctie instantaan compenseren. In het begin zullen deze compensatiemechanismen leiden tot een verbeterde hartfunctie, maar op lange termijn resulteert dit echter vaak in hartfalen.

Bij de wondgenezing zijn verschillende signaaltransductiewegen betrokken. In dit proefschrift zal een van de signaaltransductiewegen, namelijk de Wnt/Frizzled (Fzd) signaaltransductieweg, in detail worden bekeken. Deze signaaltransductieweg wordt hier speciaal in het daglicht gesteld omdat uit vorige experimenten, uitgevoerd in ons laboratorium, is gebleken dat Fzd-1 en -2 sterk opgereguleerd zijn na MI.

Hoewel Wnt/Fzd reeds geruime tijd wordt bestudeerd, zijn er echter nog vele lacunes in de kennis over Wnt/Fzd farmacologie. Om een signaaltransductie weg op een natuurgetrouwe wijze te kunnen evalueren, dient er gezocht te worden naar een geschikte cellijn (**Hoofdstuk 2**). Uit onze bevindingen blijkt dat humane embryonale niercellijn HEK293, hiervoor het meest geschikt blijkt. Alle elementen voor de  $\beta$ -catenine afhankelijke en onafhankelijke signalering zijn aanwezig in de HEK cellen. De hoge concentraties van de verschillende componenten van de signaaltransductie weg in vergelijking met andere cellijnen, indiceren tevens de geschiktheid van deze cellijn.

Verder werden de eventuele verschillen tussen diverse bronnen van Wnt eiwitten vergeleken. Uit een vergelijking van recombinante Wnt-eiwitten, geconditioneerd medium en transfectie met plasmides die Wnt genen bevatten, bleek dat er geen verschil is. Daartoe werd voor de verdere experimenten besloten geconditioneerd medium te gebruiken.

Daar het bestuderen van de interacties tussen alle 19 Wnt eiwitten en 10 Frizzleds ons te ver zou voeren, hebben wij ons toegespitst op Fzd-1 and -2, die beiden opgereguleerd zijn in het myocard infarct. Uit deze studie kunnen we concluderen dat zowel Wnt3a en Wnt5a preferabel binden aan Fzd-1 als -2, waarbij Wnt3a de  $\beta$ -catenine afhankelijke en onafhankelijke weg aanstuurt en Wnt5a alleen de onafhankelijke weg. Wnt5a fungeert tevens als natuurlijke antagonist voor Wnt3a voor de  $\beta$ -catenine afhankelijke signaaloverdracht. Verder meer werden er geen verschillen gezien in de eigenschappen van Frizzled eiwitten afkomstig van verschillende species.

Als laatste werd aangetoond dat de co-receptoren LRP5/6 voornamelijk fungeren om de binding van Wnt op Fzd te faciliteren, waarbij het intracellulaire deel van de

coreceptor het signaal kan versterken. Tevens is LRP6 potenter dan LRP5 (**Hoofdstuk 2**).

De volgende stap was het testen van deze signaaltransductie weg in klinisch relevante celsystemen. Hiertoe werden de celcultuur van de belangrijkste celtype in het hart, namelijk de fibroblasten, bestudeerd. We ontwikkelden en karakteriseerden een met telomerase geïmmortaliseerde cardiale fibroblast-cellijn die we CFIT noemen. De proliferatie, migratie en differentiatie werden onderzocht (**Hoofdstuk 3**). Uit deze experimenten blijkt dat de proliferatie niet werd beïnvloed door Wnt/Fzd activatie. De migratie, aan de andere zijde, werd vertraagd door zowel Fzd-1 als -2, die de  $\beta$ -catenine onafhankelijke weg activeerden. Differentiatie van fibroblast in myofibroblasten werd bestudeerd aan de hand van verschillende myofibroblast differentiatie markers. Uit de resultaten bleek dat Wnt/Fzd een grote invloed kan uitoefenen op zowel de differentiatie als de dedifferentiatie van CFIT, afhankelijk van de gebruikte Wnt/Fzd combinatie. Uit deze studie kunnen we dan ook concluderen dat Wnt/Fzd een zeer complexe signaaltransductie weg is, waarbij de specifieke Wnt-Fzd koppels en de geactiveerde signaaltransductie weg een cruciale rol spelen.

In **hoofdstuk 4** worden gladde spiercellen en skeletspieren bestudeerd. Hieruit bleek dat ook in deze cellen de Wnt/Fzd geen invloed heeft op de proliferatie. De differentiatie, aan de andere kant, werd op dezelfde complexe manier beïnvloed als bij CFIT. Activatie van zowel Fzd-1 als -2 kan de differentiatie van de spiercellen beïnvloeden. Bovendien werd de theorie bevestigd dat gladde spiercellen onder bepaalde stimulatie kunnen differentieren tot skeletspieren. De resultaten bevestigen tevens dat de  $\beta$ -catenine onafhankelijke weg de belangrijkste regulator is van de migratie.

De resultaten gepresenteerd in dit proefschrift, samen met literatuur, duiden aan dat het blokkeren van Fzd-1 en -2 een belangrijk therapeutisch doel is voor de behandeling van MI. Daar Wnts zeer grote en plakkerige proteïnen zijn die bovendien meestal agonistische in plaats van antagonistische eigenschappen hebben, vormen zij zeer slechte kandidaten voor *in vivo* therapiën en visualisering. Dit leidde tot de ontwikkeling van peptidische liganden. Dit ligand werd ontwikkeld om specifiek te binden aan Fzd-1 en -2, daartoe werden de sequenties van deze peptiden afgeleid van Wnt3a en 5a, beiden natuurlijke liganden van Fzd-1 en -2 (**Hoofdstuk 5**). Deze drie geïdentificeerde peptide werden UM206, UM207 en UM208 genoemd. Van bovengenoemde bleek UM206 het best oplosbaar en de hoogste affiniteit te vertonen voor Fzd-1 en -2, respectievelijk  $IC_{50}$  van  $10^{-9}$  M en  $10^{-11}$  M. De aanwezigheid van Gly, Thr en Asp en tenminste één Cys bleek kritisch te zijn voor de werkzaamheid. Al deze peptiden vertoonden tevens een hoge specific-



iteit, daar er geen reactie met Fzd-4 en -5 kon worden vastgesteld. Verder was dit species onafhankelijk en werkzaam op recombinant eiwit, geconditioneerd medium en constructen. Deze antagonisten inhibeerden de effecten van Wnt/Fzd op zowel de migratie als de differentiatie van CFIT. Deze resultaten tonen aan dat zowel de  $\beta$ -catenine afhankelijke als onafhankelijke signalering wordt geïnhibeerd door UM206.

De *in vitro* data tonen aan dat UM206 een uitstekende kandidaat voor *in vivo* testen is (**Hoofdstuk 5**). Farmacokinetische experimenten toonden aan dat UM206 stabiel was met een plasma halfwaardetijd van 90 minuten. Door de gunstige farmacokinetiek en hoge efficacy van UM206 werd de stof toegediend in het muis infarctmodel gedurende 2 resp. 5 weken, beginnende op het moment van infarctering. Het infarctgebied was significant verkleind en de wanddikte was toegenomen. Verder meer waren het aantal myofibroblasten sterk verhoogd. Dit alles waren indicatoren voor een verbeterde cardiale remodelering. Bovendien kon UM206 behandeling in de 5-weekse groep het ontstaan van hartfalen volledig voorkomen. In deze dieren was het eind diastolische volume minder toegenomen en de ejectionfracctie verhoogd, ook de pompfunctie was significant verbeterd. Het collageen gehalte was echter gedaald, zodat stijfheid van het hart kon worden verminderd. Al deze studies toonden echter aan dat UM206 hartfalen kan voorkomen en de functie van het hart kan verbeteren; het meest waarschijnlijke mechanisme is een verminderde expansie van het infarctgebied door een sterke toename van het aantal myofibroblasten.

Een van de doelen van ons onderzoek was om na te gaan of Fzd-1 en -2 kan worden gebruikt als marker voor de kwaliteit van infarcthealing. Hiervoor werden binnen onze onderzoeksgroep twee verschillende hulpmiddelen parallel ontwikkeld, namelijk rhodamine-gelabeld UM206 en een Fzd-2 antilichaam (**Hoofdstuk 6**). Testen op verschillende cellijnen toonden aan dat de activiteit en de specificiteit van UM206 na labeling werden behouden. Verder werd deze stof uitvoerig getest op vriessecties van nier en dunne darm, organen die rijk zijn aan Fzd-1 en -2. De resultaten konden worden bevestigd met het Fzd-2 antilichaam. Uit *in vitro* studies bleek tevens dat stimulatie met ofwel Wnt3a of Wnt5a, leidde tot een internalisatie van de receptor. Middels infusie van het Fzd-2 antilichaam in de muis konden de Fzd-1 en -2 in nier en dunne darm zichtbaar worden gemaakt. Deze resultaten suggereren dat UM206 en het Fzd-2 antilichaam gebruikt kunnen worden voor *in vivo* diagnostiek, bij voorbeeld voor het bepalen van het Fzd-1 en -2 gehalte van het infarctgebied als voorspeller van excessieve dilatatie die leidt tot hartfalen.

In **Hoofdstuk 7** wordt een pilot experiment over de rol van Wnt/Fzd in atherosclerose beschreven. Hiervoor werden LDR receptor knockout muizen gebruikt waarin een kraag (collar) rond de carotiden werd geplaatst. Inhibitie van Wnt/Fzd signalering met UM206 leidde tot een grotere plaques met meer cholesterol. De kap bleek echter ook dikker met meer gladde spiercellen-actieve positieve cellen, kenmerkend

voor een stabielere plaque fenotype. Deze studie laat voor het eerst zien dat interventie op het niveau van Fzd-1 en -2 de karakteristieken van atherosclerotische plaques kan beïnvloeden. Dit fenomeen vraagt om een intensievere bestudering.

In conclusie kunnen we stellen dat in dit boekje een stof werd ontwikkeld met een hoge affiniteit en specificiteit voor Fzd-1 en -2, die werd getest en gevalideerd in standaard cellijnen. De resultaten konden ook worden bevestigd in meer klinisch relevante cellen en *in vivo* studies. UM206 is het eerste laag moleculaire ligand dat de interactie tussen Wnt eiwitten en Fzd-1 en -2 kan blokkeren. Deze stof biedt vele therapeutische en diagnostische mogelijkheden binnen het cardiovasculaire gebied, maar ook in andere aandoeningen waarbij Fzd-1 en -2 signalering een rol speelt.