

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Nikol Baloghová

Charakterizace nádorového supresoru Hypermethylated in cancer 1 (Hic1) a jeho nových
cílových genů v rámci střevního epitelu a rakoviny střeva
Characterization of tumor suppressor gene Hypermethylated in cancer 1 (Hic1) and its novel
target genes in the intestinal epithelium and colorectal cancer

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Lucie Janečková, Ph. D.

Praha, 2016

Prohlášení

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

V Praze, 26. 4. 2016

Nikol Baloghová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila poděkování své školitelce Mgr. Lucii Janečkové, Ph.D. za cenné rady, věnovaný čas a trpělivý přístup při zpracování této práce. Rovněž děkuji RNDr. Vladimíru Kořínkovi, CSc. za možnost vypracování diplomového projektu v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG, stejně jako všem jejím členům za ochotu a milou atmosféru. Dík patří také Mgr. Lukáši Čermákovi, Ph.D. za konstruktivní kritiku této práce. V poslední řadě děkuji své mamince a otčímovi za finanční podporu při studiu a celé své rodině a Michalu Dibusovi za podporu psychickou.

Abstrakt

Kolorektální karcinom je celosvětově jedním z nejčastějších nádorových onemocnění. Nejen genetické, ale i epigenetické změny hrají významnou roli v jeho vzniku a progresi. Jedním z genů, které často podléhají epigenetickému umlčování nebo ztrátě v mnoha typech lidských nádorů, je tumor supresor *Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1)*. Tento gen kóduje transkripční represor, který je schopen regulovat transkripci svých cílových genů přímo, anebo nepřímo. Dodnes bylo identifikováno jen dvanáct genů, jejichž exprese je regulována HIC1. Tyto geny kódují transkripční faktory, regulátory buněčného cyklu a apoptózy, nebo proteiny účastnící se angiogeneze, buněčné migrace a invazivity. Za využití podmíněné delece *Hic1* v myších embryonálních fibroblastech jsme odhalili šest nových genů, jejichž exprese by mohla být potlačována Hic1. Jedním z nich je *Toll-like receptor 2 (Tlr2)*. V této práci se nám podařilo dokázat, že *Tlr2* je jedním z cílových genů Hic1 a že inaktivace *Hic1* ve střevě vede ke zvýšení produkce Tlr2. Zároveň jsme po delecii *Hic1* pozorovali intenzivnější prozánětlivou odpověď ve střevě s chemicky indukovanou kolitidou a zvýšenou tvorbu nádorů u myši *Apc^{Min}*. Expresním profilováním lidských embryonálních fibroblastů po snížení exprese *Hic1* jsme odhalili zvýšenou expresi jiného potenciálně cílového genu, transkripčního faktoru *E2F7*. Tato práce popisuje další vztah mezi nádorovým supresorem HIC1 a rozvojem karcinogeneze.

Klíčová slova: expresní profilování, transkripční represor, myší embryonální fibroblasty (MEF), střevní epitel, kolorektální karcinom, Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1)

Abstract

Colorectal cancer is one of the most common cancer types worldwide. Both genetic and epigenetic alterations play a critical role in its initiation and progression. One of the genes frequently epigenetically silenced or lost in many types of human cancer is tumor suppressor gene *Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1)*. It encodes for transcriptional repressor regulating its target genes directly or indirectly. Twelve genes whose expression is repressed by HIC1 have been identified to date. These genes encode for transcription factors, cell cycle and apoptosis regulators or proteins involved in angiogenesis as well as cell migration and invasiveness. Employing mouse embryonic fibroblasts upon *Hic1*-conditional knockout we have revealed six novel genes potentially repressed by *Hic1* including *Toll-like receptor 2 (Tlr2)*. Here we show that *Tlr2* is one of the *Hic1* target genes and that *Hic1* inactivation in the intestine leads to increased *Tlr2* production. Moreover, enhanced inflammatory response upon chemical-induced colitis as well as increased tumor formation in *Apc^{Min}* mice was observed in *Hic1*-deficient mice. Expression profiling in human fibroblast upon HIC1 knockdown revealed increased expression of another potential target gene, transcription factor *E2F7*. Our study describes a new relationship between HIC1 and tumor formation.

Key words: expression profiling, transcriptional repressor, mouse embryonic fibroblasts (MEFs), intestinal epithelium, colorectal carcinoma, Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1)

Seznam použitých zkratk

ADRB2	β -2 adrenergic receptor
APC	adenomatous polyposis coli
Ascl2	achaete scute-like 2
Atoh1	atonal homologue 1
Axin	axis inhibition protein
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP	bone morphogenetic protein
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BTB/POZ	broad complex, Tramtrack and Bric à brac/POx viruses and zinc finger
CAC	colitis-associated cancer
CBC	crypt base columnar
cDNA	complementary DNA
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	chromosomal instability
CKI	casein kinase I
CRC	colorectal cancer/carcinoma
Cre	cyclization recombination
CRISPR	clustered regulatory interspaced short palindromic repeats
C _T	cycle of threshold
DAB	diaminobenzidine
DAMP	damage-associated molecular pattern
DEPC	diethylpyrocarbonate
Dll1	delta-like 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
DSS	dextran sulphate sodium
EGF	epidermal growth factor
EphB	ephrine type-B receptor
ER	estrogen receptor
FAP	familial adenomatous polyposis
FBS	fetal bovine serum

FGF-BP1	fibroblast growth factor-binding protein 1
Fz	frizzled
GSK	glycogen synthase kinase
HEK	human embryonic kidney
Hes1	hairy and enhancer of split 1
HFF	human foreskin fibroblast
HIC1	hypermethylated in cancer 1
HIER	heat-induced epitope retrieval
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
IBD	inflammatory bowel disease
IL	interleukin
KRAS	kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Krt19	cytokeratin 19
LEF	lymphoid enhancer factor
Lgr5	leucine-rich-repeat G-protein-coupled receptor 5
loxP	locus of X-over P1
LRC	label-retaining cell
LRP	LDL (low density lipoprotein)-receptor-related protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Math1	mouse atonal homologue 1
MEF	mouse embryonic fibroblast
Min	multiple intestinal neoplasia
MMR	mismatch repair
MSI	microsatellite instability
mTert	mouse telomerase reverse transcriptase
MyD88	myeloid differentiation
NFκB	nuclear factor κB
OHT	hydroxytamoxifen
Olfm	Olfactomedin
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate-buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RB	retinoblastoma protein
RLU	relative luminescence unit
siRNA	small interfering RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
TA	transit amplifying
TALEN	transcription activator-like effector nuclease
TBS	tris-buffered saline
TCF	T-cell factor
TGF	transforming growth factor
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
<i>TP53</i>	tumor protein 53
YFP	yellow fluorescent protein

Obsah

1. Úvod	11
1.2 Cíle práce	11
2. Teoretický úvod	12
2.1 Anatomie střeva a stavba střevního epitelu	12
2.1.1 Buňky střevního epitelu	12
2.1.1.1 Kmenové buňky ve střevě	13
2.1.1.2 Diferencované střevní buňky	14
2.1.2 Nika kmenových buněk a faktory rozhodující o osudu buněk	17
2.1.2.1 Signalizace Wnt	17
2.1.2.2 Další signální dráhy ve střevě	19
2.2 Molekulární mechanismy vzniku kolorektálního karcinomu	20
2.2.1 Zánět a rakovina	23
2.3 Nádorový supresor Hypermethylated in cancer 1	24
2.3.1 Cílové geny transkripčního represoru HIC1	27
2.4 Myší kmeny vhodné pro studium funkce genu <i>Hic1</i>	29
3. Materiál a metody	30
3.1 Použité myší kmeny	30
3.1.2 Genotypování myší	30
3.2 Buněčné kultury a jejich kultivace	31
3.2.1 Myší buňky	31
3.2.2 Lidské buňky	32
3.3 Luciferázová reportérová esej	32
3.4 Transfekce pomocí siRNA	34
3.5 Histochemie	35
3.5.1 Barvení hematoxylinem/eosinem	35
3.5.2 Imunohistochemické barvení	35
3.6 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR)	36

3.7	Statistická analýza.....	39
4.	Předběžné výsledky	40
5.	Výsledky	41
5.1	Potvrzení nově identifikovaných cílových genů <i>Hic1</i>	41
5.2	Vztah mezi expresí <i>Hic1</i> a <i>Tlr2</i>	42
5.3	Lokalizace exprese <i>Tlr2</i> ve střevě.....	43
5.4	Vliv zánětu na střevo myši <i>Hic1</i> ^{+/+} a <i>Hic</i> ^{-/-}	44
5.5	Vliv delece <i>Hic1</i> na střevo se zkracující mutací <i>Apc</i>	47
5.6	Potvrzení nově identifikovaných cílových genů u člověka	48
5.7	Vztah mezi expresí <i>HIC1</i> a <i>E2F7</i>	52
6.	Diskuze.....	53
7.	Shrnutí.....	59
8.	Reference	60

1. Úvod

Kolorektální karcinom je celosvětově třetím nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů a druhým nejčastějším u žen (GLOBOCAN, 2012). V České republice je každoročně nově diagnostikován až u 8000 lidí a téměř 4000 pacientů mu každým rokem podlehnou (ÚZIS ČR). Celá řada výzkumů se proto soustředí na molekulární mechanismy, které vedou ke vzniku a rozvoji kolorektálního karcinomu, což by v budoucnu mohlo sloužit jako nástroj pro vývoj cílené protinádorové terapie.

Za příčinou vzniku kolorektálního karcinomu stojí mnoho faktorů. Mohou to být jak genetické predispozice, tak přítomnost chronického zánětu, životní prostředí, nebo faktory životního stylu. To vede k nahromadění genetických a epigenetických změn, jejichž výsledkem je vznik nádoru.

Tato diplomová práce je součástí většího projektu Laboratoře buněčné a vývojové biologie Ústavu molekulární genetiky, jehož cílem bylo charakterizovat funkci nádorového supresoru *Hypermethylated in Cancer 1* ve střevě a roli jeho ztráty v karcinogenezi střeva. Zmiňovaný projekt navazuje na expresní čip, který odhalil šest nových genů potenciálně regulovaných transkripčním represorem *Hic1*.

1.2 Cíle práce

- Ověřit potenciální nově objevené cílové geny tumor supresoru *Hypermethylated in Cancer 1* v myších embryonálních fibroblastech po podmíněné delecii *Hic1* pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase
- Potvrdit zvýšení exprese *Toll-like receptoru 2* v myších embryonálních fibroblastech po podmíněné delecii *Hic1* za využití luciferázové reportérové eseje
- Lokalizovat expresi *Tlr2* ve střevě myši a porovnat ji s expresí *Tlr2* ve střevě myši s podmíněnou delecí *Hic1* za využití imunohistochemického barvení
- Prozkoumat roli *Hic1* v regeneraci střevního epitelu po zánětu
- Zjistit vliv podmíněné delecce obou alel genu *Hic1* na tvorbu nádorů ve střevě myši s abnormálně aktivovanou signální dráhou *Wnt*
- Potvrdit nově identifikované geny, především *TLR2*, v lidských buňkách po snížení exprese *HIC1* za použití RNA interference

2. Teoretický úvod

2.1 Anatomie střeva a stavba střevního epitelu

Střevo je velmi důležitým orgánem trávicí soustavy, jelikož slouží nejen k trávení potravy a vstřebávání živin, ale zároveň funguje i jako bariéra proti průniku patogenních mikroorganismů do těla. Anatomicky i funkčně střevo můžeme dělit na dva odlišné segmenty, a to tenké, dále se dělicí na dvanáctník, lačník a kyčelník, a tlusté. Obě tyto části sdílejí stejnou strukturu, která představuje vnější, střední a vnitřní vrstvu. Vnější vrstva je tvořena hladkým svalstvem propojeným enterickým nervovým systémem, který je zodpovědný za peristaltické pohyby posouvající tráveninu podél trubice. Střední vrstva je pojivovou tkání, kde se nacházejí nervová vlákna a krevní a lymfatické cévy. Vnitřní vrstva je tvořena jednovrstevným epitelem, který svou stavbou představuje základní rozdíl mezi tenkým a tlustým střevem. Vnitřní povrch tenkého střeva je tvořen tak, aby co nejvíce zefektivnil vstřebávání živin, čehož je dosaženo četnými výběžky (klky) a invaginacemi (tzv. Lieberkühnovými kryptami). Hlavní funkcí tlustého střeva je zahuštění stolice. Jeho epitel je organizován pouze do krypt, které jsou na rozdíl od krypt tenkého střeva větší (shrnutí v Barker et al., 2010; van der Flier and Clevers, 2009; Obr. 2.1).

2.1.1 Buňky střevního epitelu

Střevní epitel je neustále vystavován negativnímu působení chemických látek, mikrobiot, ale i mechanickému poškození. Ochrana před těmito vlivy spočívá ve velmi rychlé sebeobnově buněk – střevní epitel patří k nejrychleji se obnovujícím tkání v těle, za což vděčí střevním kmenovým buňkám nacházejícím se na bázi krypt. Tyto kmenové buňky se dělí asymetricky, čímž vzniká jedna kmenová a jedna progenitorová rychle se dělicí buňka (tzv. transit amplifying, TA). TA buňky migrují směrem k vrcholu krypty, během čehož dále proliferují, a nakonec diferencují v jeden z typů buněk střeva. Po dvou dnech se tyto buňky dostávají až na hranici krypty a klku, odkud jejich migrace pokračuje směrem k vrcholu klku. Tam nakonec podléhají programované buněčné smrti a jsou odvrženy do lumen střeva (Potten, 1998). Proces obnovy střevního epitelu trvá 3-5 dní. Výjimku z tohoto systému tvoří diferencované Panethovy buňky, které setrvávají na dně krypt po dobu 6-8 týdnů. Situace v tlustém střevě je obdobná s tím rozdílem, že buňky terminálně diferencují po dosažení dvou třetin délky krypty (shrnutí v Barker et al., 2010; van der Flier and Clevers, 2009).

2.1.1.1 Kmenové buňky ve střevě

Přesné umístění kmenových buněk a popis jejich specifických znaků jsou stále předmětem diskuzí. Historicky koexistovaly dva modely umístění kmenových buněk, a to „+4 model“, kde měly být kmenové buňky umístěny na čtvrté pozici od báze krypty a tvořit tak jakýsi kruh těsně nad Panethovými buňkami (Potten et al. 1974), a model založený na identifikaci tzv. crypt base columnar (CBC) buněk vymezených mezi Panethovy buňky (Cheng and Leblond, 1974; Obr. 2.1).

V roce 2007 byl popsán gen *Lgr5* (*leucine-rich-repeat G-protein-coupled receptor*) jako první specifický znak kmenových buněk ve střevě. *Lgr5* kóduje receptor spřažený s G proteinem, který obsahuje charakteristickou extracelulární doménu bohatou na leucin. Tento gen je cílovým genem signální dráhy Wnt, která představuje jednu z nejdůležitějších drah v řízení obnovy střeva. Exprese genu *Lgr5* je omezena na malý počet buněk vymezených mezi Panethovy buňky v tenkém střevě a na bázi krypt v tlustém střevě. Sledováním původu buněk (tzv. lineage tracing) bylo u buněk exprimujících *Lgr5* ($Lgr5^+$) prokázáno, že jsou schopny sebeobnovy a zajišťují vznik všech buněčných typů střevního epitelu, čímž byly tyto buňky označeny za kmenové, rychle se dělící (Barker et al., 2007). Pozdější výzkum ukázal, že abnormální aktivace signální dráhy Wnt u buněk $Lgr5^+$ vede ke vzniku adenomů ve střevě (Barker et al., 2009). Dnes jsou známy další specifické znaky $Lgr5^+$ kmenových buněk, a to *Olfm4* (Olfactomedin 4) (van der Flier et al., 2009) nebo Troy, čili Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19 (Fafílek et al., 2013).

Objeven byl také specifický znak pro +4 buňky, a to *Bmi1* (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog), který je součástí rodiny proteinů Polycomb, jejichž úkolem je epigenetické umlčování exprese genů. Buňky exprimující *Bmi1* ($Bmi1^+$) se ukázaly jako pluripotentní a schopné sebeobnovy a byly označeny za klidové kmenové buňky (Sangiorgi and Capecchi, 2008). Buňky $Bmi1^+$ jsou při ztrátě nebo poškození buněk $Lgr5^+$ schopny je nahradit a slouží tak jako rezervní populace kmenových buněk ve střevě (Tian et al., 2011). Na základě svých výzkumů Yan a kolegové vyslovili teorii, že buňky $Lgr5^+$ představují hlavní populaci kmenových buněk, důležitou pro udržování střevního epitelu, zatímco buňky $Bmi1^+$ jsou klidové, a to do doby, kdy má nastat regenerace epitelu. Na rozdíl od buněk $Lgr5^+$ nejsou buňky $Bmi1^+$ citlivé na ozáření a výkyvy signalizace Wnt (Yan et al., 2012). Další studie ovšem ukázaly, že specifický znak klidových kmenových buněk *Bmi1* i později identifikovaný *mTert* (mouse telomerase reverse transcriptase) (Montgomery et al., 2011) jsou exprimovány v celých kryptách a u většiny buněk $Lgr5^+$ a nejsou tak jedinečným znakem pro tuto buněčnou populaci (Itzkovitz et al., 2012; Muñoz et al., 2012).

Později byly objeveny další dvě progenitorové populace buněk, které jsou schopny regenerovat střevní epitel při jeho poškození. Mezi ně patří buňky exprimující Dll1 (delta-like 1, buňky Dll1⁺), ligand receptoru Notch. Vyšší exprese Dll1 byla objevena u buněk sídlících na pozici +5, v oblasti nad kompartmentem Panethových a Lgr5⁺ buněk. Tyto buňky byly zároveň morfologicky odlišné od ostatních buněk produkujících Dll1. Buňky Dll1⁺ produkují krátce žijící klony sekretorních buněk. Ačkoli buňky Dll1⁺ vznikají přímo z buněk Lgr5⁺, samy protein Lgr5 postrádají, a při poškození Lgr5⁺ buněk jsou schopny je nahradit (van Es et al., 2012).

Druhou populací zmiňovaných progenitorových buněk jsou tzv. label-retaining cells (LRC), neboli buňky zachovávající si označení. Za účelem zkoumání těchto buněk byl vytvořen model transientní exprese histonu H2B označeného žlutým fluorescenčním proteinem (H2B-YFP), a to ve všech buňkách střevního epitelu kromě buněk Panethových. Po několika týdnech po indukci exprese je označení detekováno u malého počtu buněk v kryptách tenkého střeva. Tyto buňky za normálních okolností diferencují v Panethovy nebo enteroendokrinní buňky, ale při poškození tkáně proliferují a dávají vznik všem typům epiteliálních buněk střeva (Buczacki et al., 2013).

V nedávné době byla na základě přítomnosti cytokeratinu 19 (Krt19) identifikována další populace buněk ve střevě. Krt19 je specifický pro epiteliální buňky a v některých tkáních je exprimován v oblasti kmenových buněk. Ve střevě se buňky exprimující *Krt19* (Krt19⁺) nacházejí v oblasti +4 buněk a jsou odlišné od buněk Lgr5⁺. Buňky Krt19⁺ byly definovány jako dlouho žijící, odolné vůči ozáření, se schopností regenerovat epitel v případě jeho poškození. Díky těmto vlastnostem buňky Krt19⁺ v tlustém střevě pravděpodobně nahrazují funkci klidových buněk Bmi1⁺ a Dll1⁺, které zde zatím nebyly nalezeny (Asfaha et al., 2015).

2.1.1.2 Diferencované střevní buňky

Střevní epitel je tvořen několika buněčnými typy, které jsou odlišně zastoupeny v různých částech střeva. K hlavním buněčným typům střevního epitelu patří absorpční linie enterocytů, a sekretorní linie buněk pohárkových, enteroendokrinních a Panethových (van der Flier and Clevers, 2009; Obr. 2.1).

Nejčtetnějšími buňkami ve střevě jsou enterocyty, které tvoří až 80 % všech buněk epitelu. Nalézají se především v jeho proximální části, zejména dvanáctníku, kde jsou klky

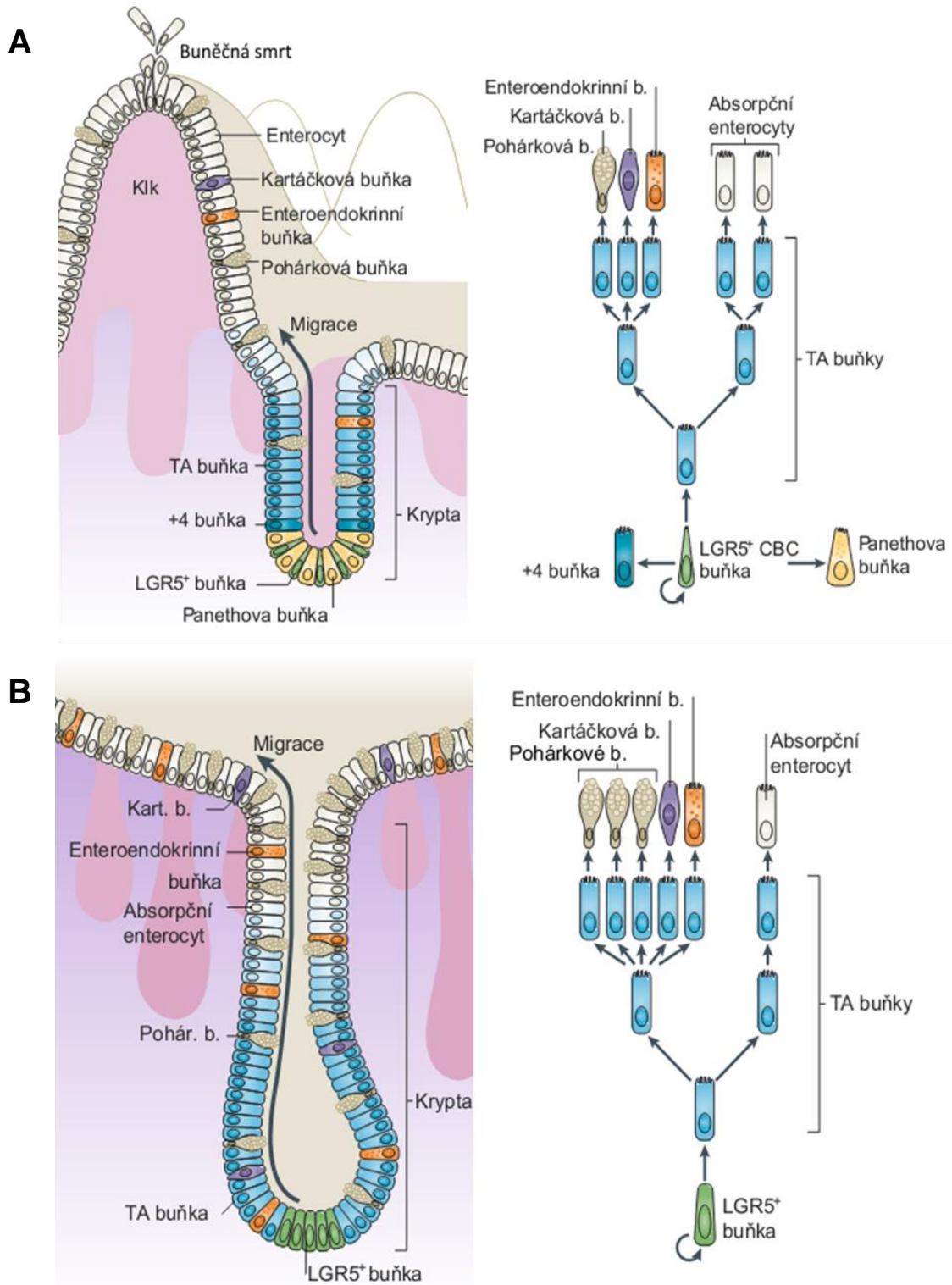
nejdelší. Funkce těchto buněk spočívá v absorpci živin z potravy a sekreci hydrolytických enzymů (Barker et al., 2010; van der Flier and Clevers, 2009).

Panethovy buňky se nacházejí pouze v tenkém střevě, kde jsou vmezeřeny mezi Lgr5⁺ CBC buňky. Svou funkcí tvoří jedny z nejdůležitějších diferencovaných buněk ve střevě, jelikož produkují mnoho ligandů důležitých pro udržování přilehlých kmenových buněk. Mezi ně patří růstové faktory jako epidermální růstový faktor (epidermal growth factor; EGF), transformující růstový faktor α (transforming growth factor- α ; TGF- α), nebo Wnt3 a Dll4 (Sato et al., 2011). Kromě toho jsou Panethovy buňky hlavními producenty antimikrobiálních peptidů ve střevě, a to především defensinů, které účinkují proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, ale některé z nich vykazují aktivitu i vůči virům nebo prvokům (shrnutí v Bevins and Salzman, 2011).

Pohárkové buňky jsou nejvíce zastoupeny v distální části střeva, a to v kyčelníku a tlustém střevě, jelikož produkují hlen, který má za úkol usnadnit průchod kompaktní stolice směrem k rektu (Schepers and Clevers, 2012). Hlavní složkou tohoto hlenu jsou především muciny, ale také buňky imunitního systému a antimikrobiální peptidy. Jeho funkcí je tudíž kromě ochrany epitelu před mechanickým poškozením také ochrana před průnikem střevních mikrobiot i patogenních organismů (shrnutí v Kim and Khan, 2013). V tlustém střevě se navíc nachází subpopulace pohárkových buněk, které jsou vmezeřeny mezi kmenové Lgr5⁺ buňky a podobně jako Panethovy buňky v tenkém střevě produkují faktory a ligandy důležité pro udržování kmenových buněk (Rothenberg et al., 2012).

Enteroendokrinní buňky jsou, navzdory tomu, že se vyskytují v celém střevě, nejméně zastoupeným buněčným typem z výše zmíněných. Jejich funkcí je sekrece hormonů, např. sekretinu v proximální části střeva, který má za úkol podporovat uvolnění žlučových kyselin nebo trávicích enzymů a tím podporovat trávení (Gribble and Reimann, 2015).

Kromě těchto populací diferencovaných buněk existují ve střevě ještě další, řidčeji zastoupené a často opomíjené typy buněk, a to zejména M (microfold) buňky a kartáčkové buňky. M buňky jsou důležitou součástí imunitního systému střeva, jelikož navozují imunitní odpověď v Peyeroých placích díky schopnosti transportovat antigeny (Mabbott et al., 2013). Kartáčkové buňky produkují opioidy, např. endorfiny, ale jejich další funkce zatím nejsou zcela objasněné (Gerbe et al., 2011).



Obr. 2.1

Organizace a migrace buněk v epitelu tenkého střeva (A, vlevo) a tlustého střeva (B, vlevo). Diferenciace buněk tenkého (A, vpravo) a tlustého střeva (B, vpravo). Převzato a upraveno z (Barker, 2014).

2.1.2 Nika kmenových buněk a faktory rozhodující o osudu buněk

Střevní kmenové buňky sídlí ve specializovaném prostředí, tzv. nice, která je založena na interakci četných signálních drah. Tyto dráhy rozhodují o osudu buněk, což zahrnuje jejich sebeobnovu, ale i diferenciaci a proliferaci. Jakékoliv narušení tohoto systému může vést k onemocněním, zejména pak k těm nádorovým.

2.1.2.1 Signalizace Wnt

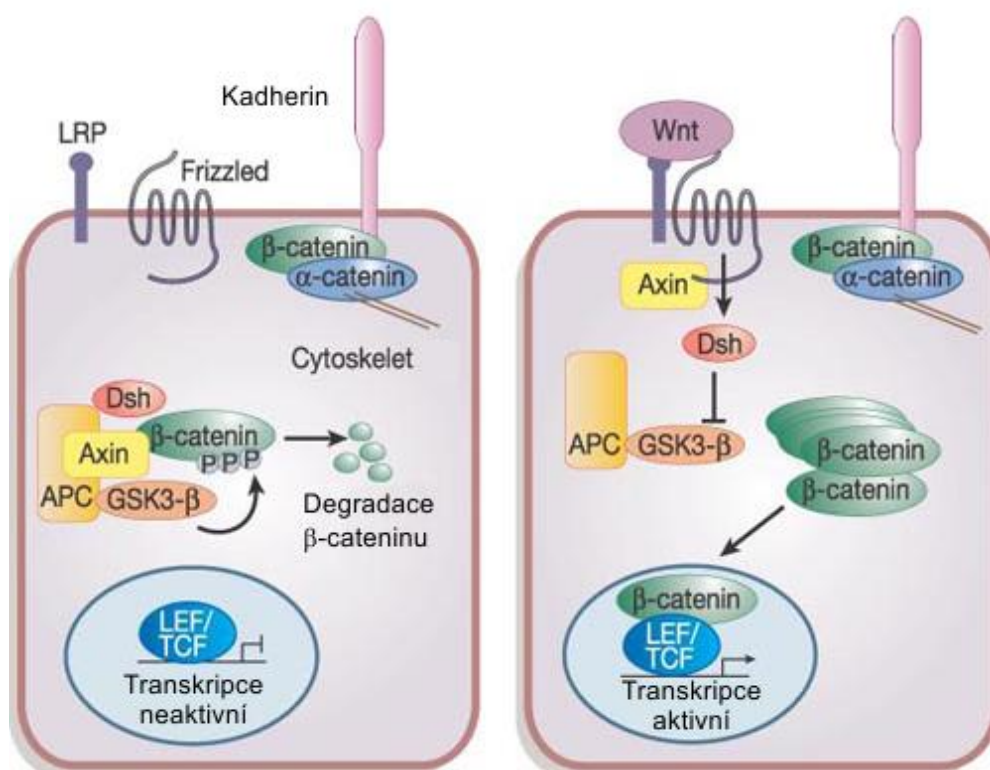
Z hlediska střevních kmenových buněk, pro řízení jejich proliferace a zachování nediferencovaného stavu, je zcela zásadní kanonická signální dráha Wnt. Signalizace Wnt je evolučně konzervovanou dráhou, regulující řadu procesů v embryonálním vývoji a sebeobnovu mnoha typů kmenových buněk v dospělosti (shrnuto v Barker et al., 2008; Logan and Nusse, 2004). Spuštění kaskády je iniciováno navázáním ligandu Wnt na transmembránový receptor rodiny Frizzled (Fz) (Bhanot et al., 1996) a současně na koreceptory rodiny proteinů LDL-receptor-related protein (LRP5/6) (Wehrli et al., 2000). Tento membránový komplex interaguje s proteinem Disheveled, který je zodpovědný za navázání degradačního komplexu β -kateninu k vytvořenému membránovému komplexu. To znemožní degradaci β -kateninu, který se poté hromadí v cytoplasmě a vstupuje do jádra, kde se naváže na transkripční faktory rodiny TCF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer factor). Tím aktivuje transkripci cílových genů, mezi něž patří mj. *c-myc* nebo *cyklin D1*. Degradací komplex β -kateninu je složen z tzv. scaffold proteinů (z angl. scaffold – lešení) Axin (axis inhibition protein) a APC (adenomatous polyposis coli), a serin/treoninových kináz GSK3 β (glykogen syntéza kináza 3 β) a CKI (kasein kináza I). V případě, že signalizace Wnt neprobíhá, je β -katenin fosforylován a nakonec označen E3 ubiquitin ligázou pro degradaci v proteasomu (shrnuto v Krausova and Korinek, 2014; MacDonald et al., 2009; Obr. 2.1.1).

Nezbytnost správné signalizace Wnt pro udržování střevního epitelu dokázala studie, kdy po delecí genu kódujícího Tcf-4, hlavní efektor této dráhy, došlo k zastavení proliferace střevních epiteliálních buněk (Korinek et al., 1998). Naopak delece některých cílových genů signalizace Wnt, např. *Ascl2* (*achaete scute-like 2*) vede k eliminaci kmenových buněk. To potvrzuje, že signalizace Wnt je zcela zásadní pro udržování kmenovosti (van der Flier et al., 2009).

Signalizace Wnt, stejně jako ostatní signální dráhy ve střevě, hraje důležitou roli také při rozhodování o osudu buněk. Další cílové geny této kaskády kódují tyrosinkinázové

receptory EphB2 a EphB3 (ephrine type-B receptor), jež váží ligandy ephriny typu B. Receptory EphB2 jsou nejvíce exprimovány v oblasti proliferujících TA buněk a jejich exprese se směrem k vrcholu krypt snižuje, zatímco EphB3 jsou exprimovány na spodku krypt střeva. Když buňka vstoupí do proliferační oblasti s nižší aktivitou signalizace Wnt, začne exprimovat ephriny B a to způsobí její další posouvání směrem ke klku. Absence ephrinů B a vysoká exprese receptoru EphB3 dovoluje Panethovým buňkám migrovat směrem na spodek krypt. Signalizace Wnt je tedy důležitá také pro správné rozmístění diferencovaných buněk ve střevě (Batlle et al., 2002; Obr. 2.1.2).

Jedním z dalších cílových genů signalizace Wnt je *Sox9* (*sex determining region (SRY)-box 9*), který je potřebný pro diferenciaci Panethových buněk a jeho nepřítomnost vede ke ztrátě těchto buněk (Mori-Akiyama et al., 2007).



Obr. 2.1.1

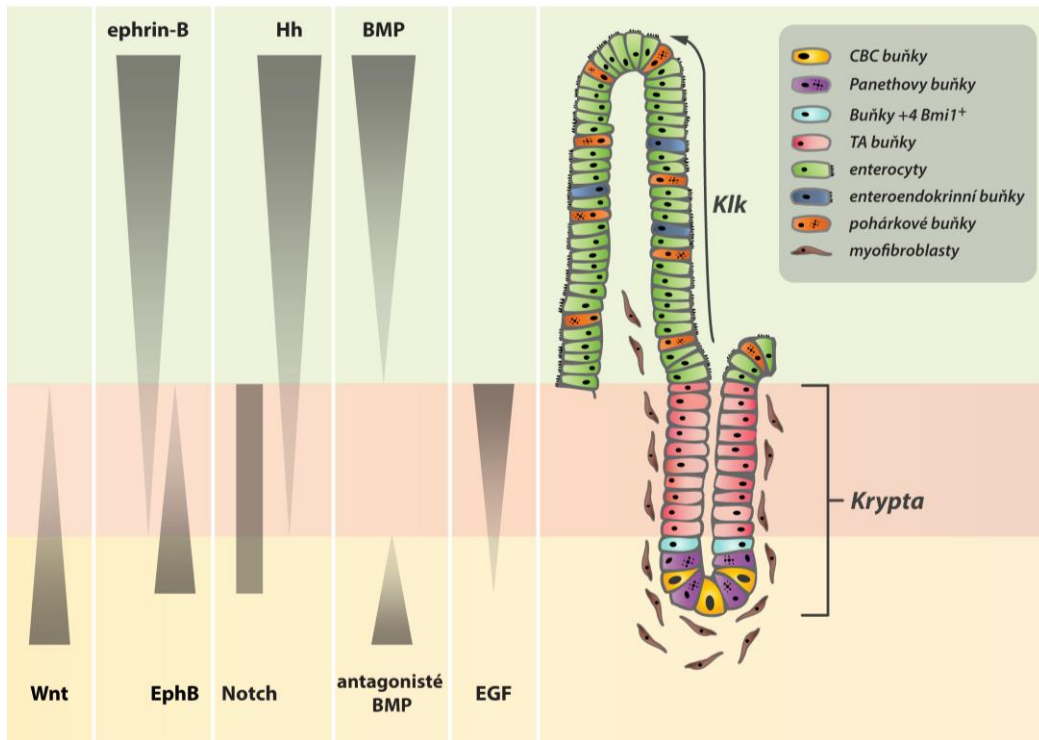
Kanonická signalizace Wnt. V nepřítomnosti ligandu Wnt je β -katenin vázán degradačním komplexem, kde je fosforylován a označen pro degradaci v proteasomu (vlevo). Při aktivaci signalizace navázáním ligandu Wnt na receptory neprobíhá degradace β -kateninu, ten se přemísťuje do jádra, kde se váže na transkripční faktory TCF/LEF, které spouští transkripci svých cílových genů (vpravo). β -katenin existuje také ve formě, kdy je vázán ke kadherinům a reguluje tak mezibuněčné spoje. Převzato a upraveno z (Reya and Clevers, 2005).

2.1.2.2 Další signální dráhy ve střevě

O osudu buněk ve střevě rozhodují další signální dráhy, z nichž nejdůležitější je signalizace Notch, která reguluje diferenciaci jednotlivých typů buněk, přesněji řečeno řídí rozhodnutí mezi sekretorním a absorpčním „osudem“ buňky. Aktivace signalizace Notch indukuje expresi transkripčního faktoru Hes1 (hairy and enhancer of split 1), který potlačuje produkci transkripčního faktoru Atoh1 (atonal homolog 1, nebo také Math1 – mouse atonal homolog 1). Atoh1 je důležitý pro diferenciaci sekretorních linií buněk a jeho ztráta ve střevě způsobí ztrátu Panethových, pohárkových a enteroendokrinních buněk (Fre et al., 2005; shrnuto v Gerbe et al., 2011). Jeden z ligandů signalizace Notch, Dll4, je navíc důležitý pro udržování kmenových buněk (Sato et al., 2011; viz výše).

Podstatnou roli ve střevě hrají také kostní morfogenetické proteiny (bone morphogenetic protein; BMP) patřící do rodiny TGF β . Tyto proteiny jsou ve střevě exprimovány mezenchymálními buňkami zejména v okolí diferencovaných buněk. V okolí krypt jsou naopak buňkami hladkého svalstva a myofibroblasty produkovány antagonisté dráhy BMP. Hlavní rolí této signalizace je negativní regulace sebeobnovy a proliferace buněk a naopak podpora jejich terminální diferenciaci. (He et al., 2004; Kosinski et al., 2007). Proliferace mezenchymálních buněk je zase regulována signalizací Hedgehog (Kosinski et al., 2010).

EGF je ve střevě dalším faktorem nezbytným pro proliferaci a udržování kmenových buněk (Sato et al., 2011, viz výše). EGF svou vazbou na tyrosinkinázové receptory spouští četné signální dráhy zahrnuté v řízení proliferace a diferenciaci, např. signalizaci přes mitogenem aktivovanou protein kinázu (mitogen-activated protein kinase; MAPK) nebo fosfatidylinositol 3-kinázu (phosphoinositide 3-kinase; PI3K)/AKT (shrnuto v Lièvre et al., 2010).



Obr. 2.1.2

Signální dráhy řídící osud buněk ve střevě. Správná funkce a uspořádání střevního epitelu je založeno na interakci signálních drah. Signalizace Wnt je důležitá pro udržování kmenových buněk. Receptory EphB a jejich ligandy ephriny typu B jsou zodpovědné za migraci a správné uspořádání buněk podél krypt a klků. Signalizace Notch rozhoduje o sekretorním nebo absorpčním charakteru buněk. BMP produkované mesenchymálními buňkami podporují diferenciaci buněk, která je v oblasti krypt potlačovaná antagonisty dráhy BMP. Mesenchymální buňky jsou regulovány signalizací Hedgehog. Převzato a upraveno z (Krausova and Korinek, 2012).

2.2 Molekulární mechanismy vzniku kolorektálního karcinomu

Příčinou vzniku kolorektálního karcinomu (CRC) jsou především somatické mutace, které vedou ke vzniku sporadických nádorů, ale za přibližně 5 % všech případů nádorových onemocnění střeva jsou zodpovědné dědičné syndromy. Ty můžeme rozdělit do dvou kategorií, a to na polypózní, z nichž nejznámější je familiární adenomatózní polypóza (FAP), a nepolypózní jako je Lynchův syndrom (shrnutí v Kinzler and Vogelstein, 1996). Dědičné nepolypózní karcinomy kolorekta (hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC) jsou způsobeny mutacemi v genech kódujících proteiny účastníci se „mismatch repair“ (MMR), tedy proteiny opravující chyby vzniklé během replikace (Syngal et al., 1999). FAP je způsobena zárodečnými mutacemi v jedné alele genu *APC* a je tak přímo spojena se signalizací Wnt. U nositele takovéto mutace se v obrovské míře tvoří střevní polypy, které s nahromaděním dalších somatických mutací můžou progredovat v maligní nádory (Lal and Gallinger, 2000).

Vznik sporadických nádorů ve střevě je velmi komplexní proces. Nejčastější a nejvíce objasněnou příčinou vzniku CRC je chromozomální nestabilita (chromosomal instability; CIN) (Lengauer et al., 1998), pro niž jsou charakteristické histopatologické změny ve střevě. V rámci nich dochází ke vzniku hyperproliferující tkáně, která se působením dalších mutací mění v adenom a následný karcinom (Obr. 2.2). Geny podléhající mutacím jsou v tomto případě tumor supresorové geny, kdy je pro vznik nádoru nutná ztráta funkce obou alel, a proto-onkogeny, kdy je dostačující jedna mutace přinášející novou funkci (tzv. gain of function) (Fearon and Vogelstein, 1990). Prvotní genetickou změnou bývá v tomto případě nejčastěji mutace v genu *APC* (Powell et al., 1992). Ve většině případů tyto mutace způsobují zkrácení proteinu, což má za následek nesprávnou funkci degradačního komplexu, stabilizaci β -kateninu a tím způsobenou hyperaktivitu signalizace Wnt (Korinek et al., 1997; Miyaki et al., 1994). Příčinou zvýšené aktivity signalizace Wnt můžou být také mutace v genech kódující další komponenty kaskády Wnt, např. *CTNNB1* kódující β -katenin (Morin et al., 1997). Výsledkem takto abnormálně aktivované signalizace je zvýšená proliferace buněk, zapříčiněná zesílenou expresí genů účastnících se regulace buněčného cyklu, jako je *c-MYC* (He et al., 1998) nebo *CCND1* (kódující cyklin D1) (Tetsu and McCormick, 1999). Podle klasického modelu karcinogeneze je prvotní mutace následována nahromaděním několika dalších mutací, jejichž výsledkem je vznik nádoru (Vogelstein and Kinzler, 1993). Mezi geny nejčastěji mutované při vzniku CRC patří tumor supresor *TP53* (*tumor protein 53*; kódující protein p53, hlavní regulátor buněčného cyklu při poškození DNA), nebo proto-onkogen

KRAS (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), účastníci se MAPK signalizace (Lüchtenborg et al., 2005).

Další příčinou vzniku CRC je nestabilita mikrosatelitů (MSI, microsatellite instability), která nastává, stejně jako v případě vzniku HNPCC, nesprávnou aktivitou MMR aparátu. Mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence, hojně přítomné v celém genomu, u nichž v průběhu replikace často dochází ke zvýšené chybovosti DNA polymerázy. Špatně inkorporované báze jsou však téměř okamžitě rozpoznány proteiny MMR a opraveny. Avšak ztráta exprese zapříčiněná epigenetickým umlčováním genů kódujících proteiny, které jsou součástí MMR, nebo jejich mutace, způsobí nesprávnou funkci opravného mechanismu. To má za následek MSI, která je přítomna až v 15 % případů vzniku CRC (Boland and Goel, 2010; Söreide et al., 2006).

Za vznikem řady malignit také stojí již zmíněné epigenetické umlčování exprese genů, a to zejména abnormální metylace ostrůvků CpG v oblasti promotorů tumor supresorových genů (Toyota et al., 1999). Tento tzv. fenotyp metylovaných ostrůvků CpG (CpG Island Methylator Phenotype; CIMP) je spojován s dalším typem vzniku CRC, a to dráhou přes pilovité neoplázie (*serrated neoplasia pathway*), která je pojmenovaná podle charakteristického tvaru polypů. Pro vznik těchto typů neoplázií je mimo hypermetylace typický výskyt mutací v genu *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), jehož produkt se účastní MAPK signalizace, a vysoký stupeň MSI (Bettington et al., 2013; Jass, 2007).

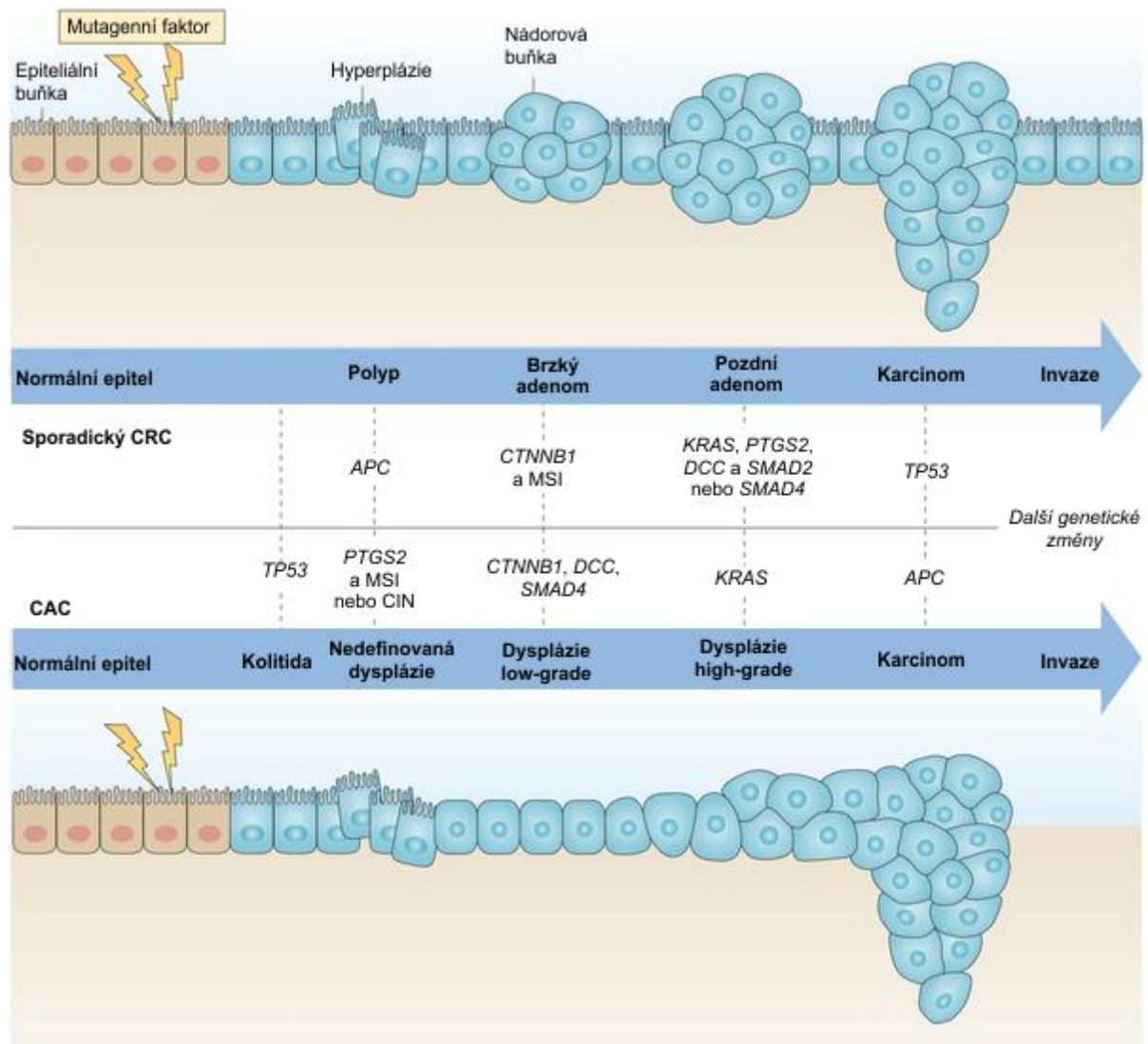
2.2.1 Zánět a rakovina

Přítomnost chronického zánětu je dnes obecně považována za jeden z faktorů vedoucích k rozvoji nádorů (Colotta et al., 2009; Hanahan and Weinberg, 2011). Za přibližně 2 % případů vzniku CRC můžou zánětlivá onemocnění střeva (inflammatory bowel disease; IBD), a to především ulcerózní kolitida a Crohnova choroba (Breynaert et al., 2008). Ulcerózní kolitida je zánětlivé onemocnění, které postihuje především konečník, odkud se v některých případech šíří dál do tlustého střeva. Crohnova choroba oproti tomu může postihnout jakoukoliv část trávicí trubice, nejčastěji však distální část tenkého střeva a proximální část střeva tlustého (Rubin et al., 2012).

Genetické změny spojené s rozvojem sporadických nádorů ve střevě se velmi neliší od těch, které se vyskytují při vzniku nádorů spojených s kolitidou (tzv. colitis-associated cancer; CAC). Stejně jako ve sporadických nádorech se zde objevuje MSI, mutace v *TP53*, *APC*, aktivace *KRAS* apod., ačkoliv se jednotlivé genetické změny objevují v jiném pořadí a s jinou frekvencí. Rozdílná je především histopatologie střeva, kdy pro sporadické CRC je typický rozvoj od polypu po adenokarcinom (viz výše), zatímco u CAC se vyskytují dysplázie lišící se pouze stupněm diferenciací (tzv. low-grade a high-grade), které ve výsledku progredují přímo v karcinom (shrnutí v West et al., 2015; Obr. 2.2).

Přítomnost chronického zánětu při IBD přispívá k rozvoji karcinogeneze zpočátku především díky oxidativnímu stresu. Reaktivní formy kyslíku i dusíku, jejichž produkce je zvýšena u pacientů trpících chronickou kolitidou, poškozují DNA a tím způsobují mutace v tumor supresorových genech a proto-onkogenech. Buňky imunitního systému jsou však přítomny i ve sporadických nádorech a ovlivňují tak buňky nádorové. Buňky specifické imunity, zejména $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocyty a NK-T lymfocyty (natural killer T-cell), přispívají spíše k eliminaci nádorových buněk. Naopak nespecifická imunitní odpověď může podporovat růst nádoru, a to díky produkci cytokinů, chemokinů, růstových faktorů, prostaglandinů, nebo reaktivních forem kyslíku nebo dusíku. Přesný popis všech dodnes známých molekulárních mechanismů, kdy zánět podporuje růst nádoru, je bohužel vysoce nad rámec této práce. Obecně lze říci, že poškozená tkáň, střevní mikrobiota a cytokiny produkované zánětlivým infiltrátem podporují zánět a tím i proliferaci a odolnost vůči apoptóze. Toho je dosaženo především aktivací transkripčních faktorů NF κ B (nuclear factor κ B) a STAT3 (signal transducer and activator of transcription), které zároveň i zvyšují produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, čímž se tvoří jakási signální „smyčka“

(shrnuto v Danese and Mantovani, 2010; Formica et al., 2014; Grivennikov et al., 2010; Terzić et al., 2010; Ullman and Itzkowitz, 2011; West et al., 2015).



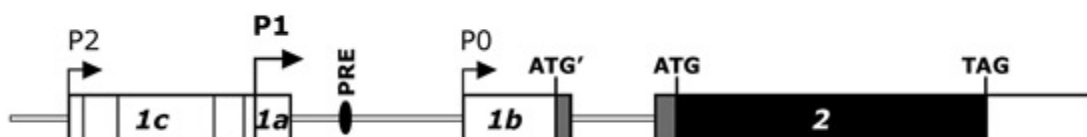
Obr. 2.2

Schéma vzniku a rozvoje sporadických kolorektálních karcinomů (CRC; nahoře) a nádorů spojených s kolitidou (CAC; dole). Pro sporadické CRC jsou typické viditelné morfologické změny od polypu po karcinom. Při rozvoji CAC se objevují dysplázie lišící se stupněm diferenciace, které progredují v karcinom. Jednotlivé genetické změny jsou společné jak pro sporadické CRC, tak pro CAC, ale objevují se zpravidla v jiném pořadí. Převzato a upraveno z (West et al., 2015).

2.3 Nádorový supresor Hypermethylated in cancer 1

Tumor supresorový gen *Hypermethylated in cancer 1 (HIC1)* je jedním z příkladů ztracených, nebo epigeneticky inaktivovaných genů při vzniku mnoha typů nádorů. U člověka je lokalizován v lokusu 17p13.3, v regionu bohatém na ostrůvky CpG, který je telomericky orientován od nádorového supresoru *TP53* (sídlícího v oblasti 17p13.1). V mnoha typech neoplázií dochází ke změnám na chromozomu 17p, které se velmi často shodují s mutacemi v genu kódujícím p53. Navzdory tomu ale v určitých typech nádorů dochází ke ztrátě nebo hypermethylaci až v distální oblasti chromozomu, což v minulosti vedlo k identifikaci genu *HIC1* (Wales et al., 1995).

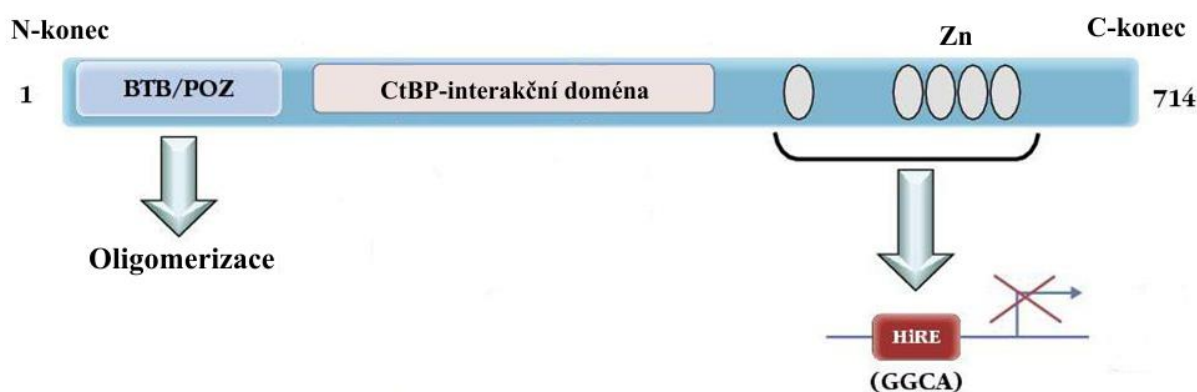
Transkripce genu *HIC1* může být započata ze tří různých promotorů (P0, P1, P2) bohatých na přítomnost G-C, a transkript podléhá alternativním sestřihům, přičemž může vzniknout několik alternativních exonů 1 a všem společný exon 2 (Guerardel et al., 2001; Jenal et al., 2010; Pinte et al., 2004). Mezi promotory P1 a P0 genu *HIC1* je přítomen p53 responzivní element, který váže p53 a je nezbytný pro zahájení transkripce genu *HIC1*. Ta je tak pozitivně regulována nádorovým supresorem p53 (Britschgi et al., 2006; Wales et al., 1995; Obr. 2.3). Jako další pozitivní regulátor transkripce genu *HIC1* byl identifikován faktor E2F1, regulující zejména transkripci genů zahrnutých v regulaci přechodu G1/S fáze buněčného cyklu a regulaci apoptózy, který tak činí přes E2F responzivní elementy (Jenal et al., 2009).



Obr. 2.3

Struktura lidského genu *HIC1*. Transkripce *HIC1* může být započata ze tří různých promotorů (P0, P1, P2). Exony 1a a 1c jsou nekódující, exon 1b je částečně kódující a je spojen s promotorem P0 obsahujícím TATA box. Překládané oblasti jsou označeny šedě a černě. PRE – p53 responzivní element. Převzato z (Jenal et al., 2010).

HIC1 kóduje transkripční faktor, který za normálních podmínek potlačuje transkripci cílových genů. Protein HIC1 se skládá ze tří hlavních strukturních domén, a to BTB/POZ (broad complex, tramtrack and bric à brac/pox viruses and zinc finger) na N-konci, která je zodpovědná za oligomerizaci proteinu a interakci s jinými proteiny (Pinte et al., 2004; Valenta et al., 2006). HIC1 se dále skládá z centrální domény vázající korepresor CtBP (C-terminal binding protein), a C-terminální domény, která obsahuje pět „Krüppel-like“ zinkových prstů, zprostředkujících vazbu na specifické sekvence DNA (tzv. HIC1 responsive elements; HiRE) (Pinte et al., 2004; Obr. 2.3.1).



Obr. 2.3.1

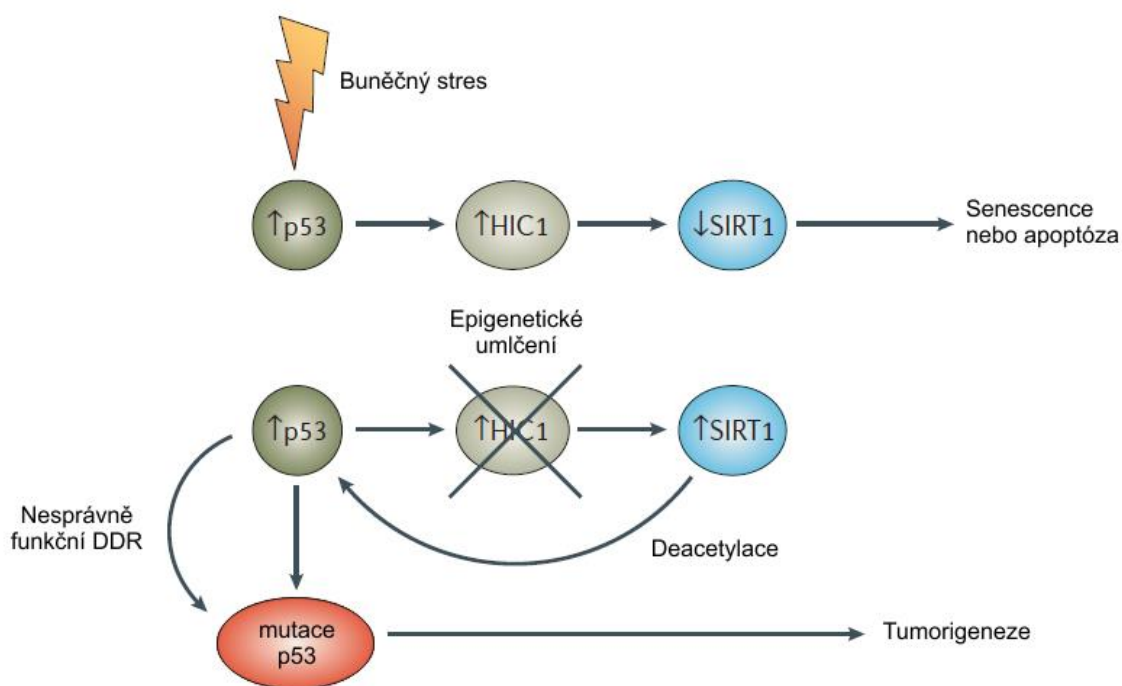
Nejčastější izoforma proteinu HIC1 a jeho funkční domény. Protein HIC1 je dlouhý 714 aminokyselin. Doména BTB/POZ je zodpovědná za oligomerizaci, centrální doména interaguje s CtBP, C-terminální doména obsahuje 5 zinkových prstů a je zodpovědná za vazbu na HiRE – HIC1 responzivní elementy. Převzato z (Dehennaut and Leprince, 2009).

Přítomnost abnormální metylace genu *HIC1* byla nalezena v mnoha typech lidských nádorů, mj. v nádorech prsu, prostaty, v kolorektálním karcinomu, nebo karcinomu žaludku (shrnuto v Rood and Leprince, 2013). *HIC1* kromě toho leží v chromozomálním regionu, jehož delecce se vyskytuje v Miller-Diekerově lisencefalii. Toto onemocnění je charakterizováno mentální retardací, kraniofaciální dysmorfologií a defekty končetin a prstů. Myši s delecí obou alel genu *Hic1* (*Hic1*^{-/-}) vykazují podobné vývojové vady, což dokazuje důležitost jeho role v embryogenezi (Carter et al., 2000; Grimm et al., 1999). Bylo publikováno, že myši s delecí pouze jedné alely genu *Hic1* (*Hic1*^{+/-}) vyvíjejí nádory v závislosti na pohlaví, a to s výskytem epiteliálních nádorů u samců a sarkomů a lymfomů u samic. Analýza těchto nádorů odhalila, že promotor „wild-type“ alely genu *Hic1* podléhal hypermetylací (Chen et al., 2003). Navíc u myši se zkracující mutací v *Apc* a ztrátou jedné alely genu *Hic1* (*Hic1*^{+/-}, *Apc*^{+/ Δ 716}) dochází ke vzniku nádorů v gastrointestinálním traktu ve

zvýšené míře a za kratší dobu, než je tomu u myši jen se zkráceným proteinem Apc (Mohammad et al., 2011).

2.3.1 Cílové geny transkripčního represoru HIC1

Přes nepochybně důležitou roli proteinu HIC1 nejsou zatím známy všechny geny, jejichž exprese je jeho působením potlačovaná. Dosud identifikované cílové geny se účastní mnoha buněčných procesů, jako je regulace buněčného cyklu, diferenciacie buněk, odpověď na poškození DNA (DNA damage response; DDR) nebo metastatická invaze (shrnutí v Rood and Leprince, 2013). Jedním z mechanismů, jak může ztráta správné funkce HIC1 vést k rozvoji tumorigeneze, je zvýšená exprese genu *Sirtuin 1* (*SIRT1*). Protein SIRT1 je histon-deacetyláza III. třídy, která deacetyluje mj. p53. Když je buňka vystavena buněčnému stresu, např. poškození DNA, je aktivován p53, který zvýší transkripci *HIC1*. HIC1 poté potlačí expresi *SIRT1*, což dovolí p53 zůstat v acetylované, tudíž aktivní formě. Inaktivace HIC1 však vede ke zvýšení exprese *SIRT1*, což buňce dovolí díky nesprávně funkčnímu p53 uniknout DDR (Chen et al., 2005; Obr. 2.3.2).



Obr. 2.3.2

Role HIC1 v regulaci odpovědi na poškození DNA (DDR). HIC1 je schopen potlačovat transkripci *SIRT1*, jehož produkt deacetyluje p53. Buněčný stres aktivuje p53, který zvýší transkripci *HIC1*. HIC1 potlačí transkripci *SIRT1* a dovolí tak proteinu p53 zůstat v acetylované, tedy aktivní formě. Nesprávná funkce HIC1 vede ke zvýšení exprese SIRT1 a v důsledku toho k inaktivaci p53, čímž buňka unikne DDR. To buňce umožní proliferovat i s poškozením DNA, což může vést k hromadění dalších mutací, i v samotném p53 a tím k rozvoji nádorů. Převzato a upraveno z (Baylin and Ohm, 2006).

Dalšími cílovými geny transkripčního faktoru HIC1, jejichž produkty se účastní řízení buněčného cyklu, jsou *CCND1*, kódující cyklin D1, důležitý pro přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu, a geny kódující inhibitory cyklin-dependentních kináz – p21 a p57 (kódován *CDKN1C*) (Dehennaut et al., 2013; Van Rechem et al., 2010). HIC1 také reguluje produkci zkrácené formy proteinu p73 – Δ NP73, který je členem stejné rodiny proteinů jako p53 a má proto-onkogenní vlastnosti (Vilgelm et al., 2010).

Nesprávná funkce nebo ztráta HIC1 může vést navíc k deregulaci genů, jejichž produkty se podílejí na migraci. Mezi ně patří gen kódující β -2 adrenergní receptor (ADRB2), jehož aktivace při buněčném stresu podporuje angiogenezi a metastazování (Boulay et al., 2012). Podobnou roli v nádorech může mít i chemokinový receptor CXCR7 (scavenger chemokine receptor 7), který se účastní buněčné migrace a jehož produkce je také regulována tímto represorem (Van Rechem et al., 2009). HIC1 se dále účastní regulace genu *EphA2*, kódujícího tyrosinkinázový receptor, a genu *ephrin-A1*, kódujícího jeho ligand, které jsou zahrnuty mj. v migraci prsních epiteliálních buněk (Foveau et al., 2012; Zhang et al., 2010). Dalším cílovým genem HIC1 je *FGF-BP1* (*fibroblast growth factor-binding protein 1*), jehož produkt podporuje vývoj cév a angiogenezi (Briones et al., 2006).

HIC1 dále potlačuje expresi genů *Atoh1* a *Sox9*, které jsou ve střevě důležité pro sekretorní charakter buněk (viz výše) (Briggs et al., 2008; Mohammad et al., 2011; Van Rechem et al., 2009).

Kromě těchto přímých cílových genů je nádorový supresor HIC1 schopen regulovat transkripci také interakcí s jinými transkripčními faktory a potlačovat tak expresi jejich cílových genů. Tento protein je schopný vazby na TCF4, efektor signalizace Wnt, za tvorby tzv. tělísek HIC1, což vede k zamezení asociace komplexu TCF4/ β -kateninu s promotory cílových genů (Valenta et al., 2006).

2.4 Myší kmeny vhodné pro studium funkce genu *Hic1*

Hic1, myší homolog lidského genu, se nachází na chromozomu 11 a je složen ze dvou exonů, přičemž exon 2 vykazuje na genetické úrovni 88% identitu s lidským *HIC1* (Grimm et al., 1999). *HIC1* je v nižší míře exprimován pravděpodobně ve všech tkáních těla (Wales et al., 1995), což je jeden z důvodů, proč homozygotní myši *Hic1*^{-/-} umírají v embryonálním stádiu a vykazují mnoho vývojových vad (Carter et al., 2000). K umožnění studia genu *Hic1* *in vivo* byly proto v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG vytvořeny dva nové transgenní myší kmeny. Prvním z nich je *Hic1-citrín* – reportérová myš, u které byl exon 2 nahrazen sekvencí pro fluorescenční protein citrín, což umožňuje sledování exprese *Hic1* v organismu. Druhým myším kmenem je *Hic1*^{loxP}, který je pro studium genu *Hic1* *in vivo* zcela zásadní, jelikož řeší problém embryonální letality. U tohoto kmenu je exon 2 ohraničen dvěma *loxP* (locus of X-over P1) sekvencemi (Pospichalova et al., 2011). Sekvence *loxP* jsou rozpoznávány rekombinázou Cre (cyclization recombination), která katalyzuje reciprokou rekombinaci DNA mezi páry *loxP*, čímž je možno dosáhnout zejména delece požadovaného genu. Té se v praxi docílí zkřížením takovéto myši s myší nesoucí tkáňově specificky exprimovanou rekombinázu Cre. V tkáních, kde rekombináza exprimovaná není, tedy nedojde k deleci cílového genu (Sauer, 1998). Rekombinázu Cre je možné modifikovat fúzí s pozměněnou vazebnou doménou estrogenového receptoru (CreER), který má afinitu pouze pro syntetický analog estrogenu, tamoxifen. Ten se po podání váže na estrogenový receptor, čímž způsobí uvolnění CreER z Hsp90 (heat-shock protein) a přemístění rekombinázy z cytoplasmy do jádra, kde zahájí rekombinaci (shrnuto v Cox et al., 2012).

Pro studium funkce proteinu *Hic1* ve střevě je možné zkřížit myš genotypu *Hic1*^{loxP/loxP} s myší kmene *Villin1-Cre*, u níž je rekombináza Cre exprimována pod kontrolou promotoru genu *Villin1*, jenž je aktivní ve všech buňkách střevního epitelu. Tímto způsobem je možné docílit specifické delece genu již během embryonálního vývoje a předejít tak embryonální letalitě (El Marjou et al., 2004). Myši kmene *Hic1*^{loxP/loxP} lze také zkřížit s kmenem *ROSA26-CreER*^{T2} a z takto vzniklých embryí izolovat embryonální fibroblasty, u nichž lze podáním 4-hydroxytamoxifenu (aktivní metabolit tamoxifenu; 4-OHT) vyvolat rekombinaci *in vitro* a tím docílit delece obou alel genu *Hic1*. Myši s podmíněnou delecí druhého exonu genu *Hic1* jsou v této práci označeny jako *Hic1*^{delEx2/delEx2}, myši s ohraničeným druhým exonem za užití dvou *loxP* sekvencí jsou označeny jako *Hic1*^{loxP/loxP}.

3. Materiál a metody

3.1 Použité myší kmeny

Myší kmen *Hic1^{loxP/loxP}* byl vytvořen v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG (Pospichalova et al., 2011). Kmeny *Rosa26-CreER^{T2}* a *Apc^{Min}* byly pořízeny z chovného zařízení The Jackson Laboratory. Kmen *Villin1-Cre* byl poskytnut dr. Sylvii Robin (Curie Institut, Paříž). Všechna zvířata byla chována ve Zvěřinci ÚMG.

Embrya myší *Hic1^{loxP/loxP}xRosa26-CreER^{T2}* pro přípravu myších embryonálních fibroblastů (MEF) byla izolována v 13. embryonálním dni. Embrya byla propláchnuta ve fosfátovém solném roztoku (phosphate-buffered saline, PBS) a zbavena vnitřností a hlavičky, z níž byl kousek použit pro genotypizaci.

Střevní kolitida byla indukována u myší *Hic1^{loxP/loxP}xVillin1-Cre⁺* (nebo jejich sourozenců genotypu *Cre⁻*) podáváním dextran sulfátu sodného (DSS; 2% DSS v pitné vodě; $M_w = 36-50$ kDa; MP Biomedicals) po dobu 5 dnů. Tlustá střeva byla izolována 2, 4, 6 a 9 dní po ukončení aplikace, malý kousek tkáně z proximální části tlustého střeva byl fixován v RNA Blue (Top Bio), zbytek byl použit pro účely imunohistochemického barvení.

Tenká střeva myší *Apc^{Min}xHic1^{loxP}xVillin1-Cre* byla izolována jedincům starým 20 týdnů a byla použita pro účely histochemického barvení.

3.1.2 Genotypování myší

Pro genotypování byla použita DNA izolovaná ze špiček ocásků myší (resp. hlaviček u embryí). Tkáň byla štěpena přes noc ve vodní lázni o teplotě 56 °C pomocí 6 μ l Proteinázy K a 300 μ l lyzačního pufru (50mM KCl, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 2,5 mM EDTA; 0,45% NP-40; 0,45% Tween-20; vše Thermo Scientific). Poté byly vzorky stočeny v pokojové teplotě při 20 000x g, 3 min. Ze supernatantu bylo odebráno 100 μ l, ke kterým bylo přidáno 100 μ l isopropanolu. Vzorky byly opět centrifugovány po dobu 20 min. Následovalo promytí pomocí 100 μ l 70% etanolu, vysušení pelety DNA při 68 °C a její rozpuštění ve 300 μ l vody bez RNáz a DNáz.

Genotypování bylo provedeno pomocí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR). Jedna reakce obsahovala 5 μ l 2x DreamTaq Master Mix (DreamTaq DNA polymeráza, pufr, $MgCl_2$ a směs deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs); Thermo Scientific), 3 μ l 2,5M betainu, 1 μ l 10 μ M směsi primerů (Sigma-Aldrich) a 1 μ l DNA.

Primery byly navrženy pomocí webové stránky Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) a jsou uvedeny v tabulce.

Použité primery

Kmen	Sekvence	Směr	Alela
<i>Apc^{Min}</i>	GCCATCCCTTCACGTTAG	Fw	Wt/Tg
	TTCCAACCTTTGGCATAAGGC	Rev	Wt
	TTCTGAGAAAGACAGAAGTTA	Rev	Wt/Tg
<i>Hic1^{loxP/loxP}</i>	CCCCACCTTTCTACACCTCA	Fw	Wt/Tg
	GAGAGGCAGGGTTCTCCTTT	Rev	Wt/Tg
<i>Rosa26-CreER</i>	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	Fw	Wt/Tg
	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	Rev	Wt
	CCTGATCCTGGCAATTCG	Rev	Wt/Tg
<i>Villin1-Cre</i>	AAAATTTGCCTGCATTACCG	Fw	Wt/Tg
	ATTCTCCCACCGTCAGTACG	Rev	Wt/Tg

Fw – forward; Rev – reverse

Wt – „wild-type“; Tg – transgen

Vzorky byly vloženy do termocykléru (Bio-Rad, T100) s následujícím nastavením:

	<i>Apc^{Min}</i>		<i>Hic1^{loxP/loxP}</i>		<i>Rosa26-CreER</i>		<i>Villin1-Cre</i>	
Poč. denaturace	94 °C	3 min	98 °C	3 min	98 °C	3 min	98 °C	3 min
Denaturace	94 °C	30 s	98 °C	30 s	98 °C	30 s	98 °C	30 s
Nasedání primerů	55 °C	30 s	56 °C	20 s	56 °C	30 s	58 °C	30 s
Elongace	72 °C	1 min	72 °C	20 s	72 °C	55 s	72 °C	30 s
Finální extenze	72 °C	2 min	72 °C	2 min	72 °C	2 min	72 °C	2 min
Počet cyklů	36		37		37		35	

3.2 Buněčné kultury a jejich kultivace

Všechny buněčné kultury byly kultivovány při 37 °C v 5% CO₂ v inkubátoru Sanyo. Pro pasážování buněk byl použit roztok trypsinu/EDTA v poměru 1:1 (Sigma-Aldrich). PBS k promývání buněk byl získán z Přípravný médií ÚMG.

3.2.1 Myší buňky

Embrya myši *Hic1^{loxP/loxP}xRosa26-CreER^{T2}* pro přípravu buněk MEF byla po odstranění vnitřních orgánů a hlavičky nastříhána a inkubována v roztoku trypsinu/EDTA (v poměru 1:1, Sigma-Aldrich) ve 37 °C po dobu 15 min. Disociovaná tkáň byla poté vyseta

na 10cm kultivační misky a kultivována v kompletním Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma-Aldrich). K aktivaci rekombinázy Cre byly buňky ošetřeny pomocí 4-OHT v etanolu (Sigma-Aldrich) v konečné koncentraci 2 $\mu\text{mol/l}$. Kontrolní buňky byly ošetřeny stejným množstvím etanolu. RNA z buněk byla izolována 72 h po rekombinaci za použití RNA Blue (Top Bio) dle postupu doporučeného výrobcem (viz níže). Elektroporace buněk proběhla rovněž 72 h po rekombinaci.

Kompletní IMDM:

- 10% fetální hovězí sérum (FBS, Gibco)
- Penicilin, streptomycin, gentamicin (Thermo Scientific)
- 2mM L-glutamin (Gibco)
- 1x neesenciální aminokyseliny (Gibco)

3.2.2 Lidské buňky

Plicní fetální fibroblasty WI38, lidské fibroblasty izolované z předkožky (HFF) a lidské embryonální ledvinové buňky (HEK293) byly zakoupeny z American Type Culture Collection (ATCC). Buňky byly kultivovány v kompletním Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich).

Kompletní DMEM:

- 10% FBS (Gibco)
- Penicilin, streptomycin, gentamicin (Thermo Scientific)

3.3 Luciferázová reportérová esej

Elektroporace buněk

Buňky MEF kmene $Hic1^{loxP/loxP} \times Rosa26-CreER^{T2}$ byly 72 h po rekombinaci (provedené pomocí 4-OHT) trypsinizovány a promyty elektroporačním pufrem. Následně byly buňky stočeny a resuspendovány v elektroporačním pufru. Na jednu elektroporaci bylo z této buněčné suspenze odebráno takové množství, aby konečná konfluence buněk v jedné jamce 24jamkové destičky dosahovala 50 %. K buňkám byl přidán 0,66% polyethylenglykol (PEG) 4000 a dále 0,7 μg reportérového plasmidu pGL4.26 (Promega) se sekvencí pro luciferázovou aktivitu *firefly* (pocházející ze světlušky *Photinus pyralis*) a se

zaklonovaným promotorem genu *Tlr2* (Tlr2-Luc) (Janeckova et al., 2015), a 0,1 µg plasmidu pRL-TK (Promega) se sekvencí pro luciferázovou aktivitu *renilla* (pocházející z renily fialové – *Renilla reniformis*) sloužící pro normalizaci exprese reportéru. Jako kontrola byl použit luciferázový reportérový vektor pGL4.26 bez inzertu. Elektroporace proběhla v elektroporační kyvetě se štěrbinou širokou 4 mm (BTX), v elektroporátoru (ECM 630, BTX) při 240 V po dobu 30 ms. Po elektroporaci bylo k buňkám přidáno médium IMDM a buněčná suspenze byla vyseta na 24jamkovou destičku. Elektroporace byly provedeny v triplikátech jak u buněk *Hic1^{loxP/loxP}*, tak i *Hic1^{delEx2/delEx2}*. Luciferázová reportérová esej byla provedena 24 h po elektroporaci.

Plasmid Tlr2-Luc byl vytvořen v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG dr. Fafilkem. Z myší genomové DNA byla pomocí PCR amplifikována oblast promotoru genu *Tlr2* zahrnující nukleotidy -739 až +52 (kde +1 je místem začátku transkripce). Amplifikát byl zaklonován do luciferázového reportérového vektoru pGL4.26.

Složení elektroporačního pufru:

- 125mM KCl
- 15mM NaCl
- 3mM glukóza
- 25mM HEPES (pH=7,4)
- 1,2mM MgCl₂

Transfekce buněk

Buňky HEK293 byly vysety na 24jamkovou destičku tak, aby jejich konfluence v době transfekce dosahovala 50 %. Před transfekcí byly buňky převedeny do 400 µl bezsérového média Opti-MEM (Thermo-Scientific). Transfekce proběhla pomocí 0,4 µg luciferázového reportérového plasmidu pGL4.26 se zaklonovaným promotorem genu *E2F7* (E2F7-Luc). Buňky byly kotransfekovány vektorem kódujícím HIC1 v množství 0 µg; 0,15 µg; nebo 0,30 µg; společně s 0,05 µg plasmidu pRL-TK (Promega) se sekvencí pro luciferázovou aktivitu *renilla*. Celkové množství DNA bylo doplněno do 0,8 µg na jamku použitím prázdného vektoru pcDNA3. DNA byla rozpuštěna v 50 µl Opti-MEM. Transfekční činidlo Lipofectamine2000 (Thermo-Scientific) o objemu 2 µl bylo rovněž rozpuštěno v 50 µl Opti-MEM. Oba roztoky byly po 5 min smíchány a inkubovány po dobu 20 min. Poté byly

buňky transfekovány a uloženy do inkubátoru na dobu 6 h, kdy jim bylo vyměněno médium. Jako kontrola byl použit luciferázový reportérový vektor pGL4.26 bez inzertu. Luciferázová reportérová esej byla provedena 24 h po transfekci.

Plasmid E2F7-Luc byl vytvořen v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG. Z genomové DNA lidských buněk byla pomocí PCR amplifikovaná oblast promotoru genu E2F7 zahrnující nukleotidy -978 až +20 (kde +1 je místem začátku transkripce). Amplifikát byl zaklonován do luciferázového reportérového vektoru pGL4.26.

Luciferázová reportérová esej

Luciferázová reportérová esej byla provedena za využití Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega). Buňky byly lyzovány pomocí 30 μ l pufru z kitu a homogenizovány. Měření luciferázové aktivity (jak *firefly*, tak *renilla*) bylo provedeno pomocí substrátů ze stejného kitu na luminometru Glomax 20/20 (Promega). Změřená aktivita je vynesena jako průměr měření daného vzorku vzhledem k aktivitě luciferázy *renilla* v relativních luminiscenčních jednotkách za sekundu (RLU/s).

3.4 Transfekce pomocí siRNA

Snížení exprese (tzv. knockdown) genu *HIC1* u buněk HFF a WI38 byl proveden reverzní transfekcí pomocí komerčně dostupných malých interferujících (small interfering RNA; siRNA). Na jednu jamku 6jamkové destičky bylo použito 50 nmol siRNA, které byly smíchány se 125 μ l bezsérového média Opti-MEM (Thermo Scientific), a 5 μ l transfekčního činidla Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Scientific), které bylo rovněž smícháno se 125 μ l Opti-MEM. Média s siRNA a činidlem Lipofectamine byly po 5 min smíchány dohromady a poté inkubovány 20 min. Pasážované buňky byly do jednotlivých jamek obsahujících transfekční činidlo s odpovídající siRNA přeneseny tak, aby jejich konečná konfluence dosahovala 50 %. Oba typy buněk byly transfekovány vždy dvěma siRNA proti mRNA genu *HIC1* a jednou kontrolní necílicí siRNA (v tabulce). Destičky byly uloženy v inkubátoru na 4,5 h, po čemž následovala výměna média za kompletní DMEM. Totální RNA byla z buněk izolována 48 a 72 h po transfekci.

siRNA	Kat. č.	Výrobce
HIC1 Pre-Designed Silencer	AM16708	Ambion
HIC1 siGENOME SMARTPool	M-006532-01	Dharmacon
siGENOME Non-Targeting siRNA Pool č. 1	D-001206-13	Dharmacon

3.5 Histochemie

3.5.1 Barvení hematoxylinem/eosinem

Střeva myši byla izolována, zbavena zbytků stolice a propláchnuta PBS. Poté byly orgány vloženy do kazetek, fixovány v 4% formaldehydu v PBS a po 24 h převedeny do 70% etanolu. Vzorky byly dále převedeny do xylenu/vosku za pomoci automatického tkáňového procesoru (Leica; ASP200 S) a zality do parafínu na zalévací lince (Leica, EG 1150H). Po ztuhnutí byly vzorky řezány na rotačním mikrotomu (Leica; RM 2255) na řezy tlusté 6 μm pomocí žiletek pro sériové řezy (Bamed; Feather R35). Řezy na sklíčku byly zavodněny následující deparafinační řadou:

Xylen I	8 min
Xylen II	8 min
Izopropanol	5 min
100% etanol I	5 min
100% etanol II	5 min
96% etanol	3 min
70% etanol	3 min
Deionizovaná voda	

Poté byly řezy barveny eosinem (Sigma-Aldrich) po dobu 75 s a hematoxylinem (Sigma-Aldrich) po 30 s. Následně byla barviva vymývána pod tekoucí vodou po dobu 5 min. Preparáty byly odvodněny stejnou deparafinační řadou v obráceném pořadí a zamontovány do solakrylu.

3.5.2 Imunohistochemické barvení

Řezy byly připraveny stejným způsobem, jako je uveden výše. Po deparafinaci bylo na řezech provedeno teplem indukované odmaskování epitopů (heat-induced epitope retrieval, HIER) povařením skel po dobu 20 min v citrátovém pufru (10mM citrát sodný; pH 6). Řezy byly po zchlazení dvakrát promyty v tris pufrovaném solném roztoku (tris-buffered saline,

TBS; 50mM Tris, 150mM NaCl; pH 7,6), následně byly na řezech blokovány endogenní peroxidázy pomocí 0,3% H₂O₂ v metanolu po dobu 25 min při pokojové teplotě. Poté byly řezy čtyřikrát promyty v TBS. Následně byly pomocí 5% séra s 1% hovězím sérovým albuminem (bovine serum albumin, BSA) v TBS blokovány endogenní imunoglobuliny inkubací ve vlhké komůrce po dobu 1 h. Na řezy byl aplikován roztok primární protilátky ředěné do 5% séra s 1% BSA v TBS a skla byla ve vlhké komůrce uložena do 4 °C na 24 h. Následovalo promytí 0,01% TritonemX-100 v TBS a čtyři promytí pomocí TBS. Poté byla primární protilátka detekována biotinylovanou sekundární protilátkou v koncentraci 1:750 v 5% séru v TBS po dobu 1 h, po čemž následovalo promytí 0,01% TritonemX-100 v TBS a další čtyři promytí pomocí TBS. Signál byl po dobu 30 min zesilován pomocí avidin-biotinového komplexu za použití kitu (Vectastain ABC kit, PK-4000) obsahujícího avidin a biotinylovanou křenovou peroxidázu. Následovalo promytí jako v předchozích dvou krocích. Pro vizualizaci antigenu byl použit 3,3' diaminobenzidin (DAB), a to 30 mg DAB v 90 ml 50mM Tris (pH 7,6) s 0,02% H₂O₂ při 37 °C, 3 min. Reakce byla zastavena oplachem v deionizované vodě. Následovalo barvení jader pomocí hematoxylinu po dobu 30 s, odbarvování pod tekoucí vodou 5 min, odvodnění a zamontování řezů do solakrylu. Použité protilátky, ředění a séra jsou uvedeny v tabulce.

Protilátka	Původ	Ředění	Použité sérum	Sekundární protilátka
Ki67 (Diagnostic BioSys.)	myš	50x	kozí	Goat anti-mouse, IgG (Thermo Scientific)
Tlr2 (sc-16237), Santa Cruz	koza	200x	koňské	Horse anti-goat, IgG (Vector Laboratories)

Preparáty byly pozorovány a snímány pomocí mikroskopu Leica DM 2000, nebo binolupy Olympus SZX10 s originálním softwarem. Počet a velikost neoplázií byly kvantifikovány za použití softwaru Ellipse (ViDiTo).

3.6 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR)

Izolace RNA

Buňky na 6jamkové destičce byly lyzovány pomocí 1 ml RNA Blue (Top Bio). Odstrihnutá střevní tkáň byla homogenizována pomocí homogenizátoru rovněž v 1 ml RNA

Blue. Do zkumavek se suspenzí bylo přidáno 200 μ l chloroformu, vzorky byly protřepány, 5 min inkubovány v pokojové teplotě a centrifugovány při 12 000x g a 4 °C, 10 min. K vrchní fázi bylo přidáno 500 μ l isopropylalkoholu a vzorky byly centrifugovány 20 min. Peleta RNA byla dvakrát promyta 500 μ l 75% etanolu ve vodě ošetřené diethylpyrokarbonátem (DEPC). Po vysušení byla RNA rozpuštěna ve 30 μ l PCR Ultra H₂O. Koncentrace a čistota RNA byla změřena na přístroji Nanodrop (ND 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

Příprava komplementární DNA (cDNA)

Pro reverzní transkripci bylo použito 1,5 μ g RNA, ke které bylo přidáno 250 ng náhodných hexamerních primerů (Thermo Scientific), a objem reakce byl doplněn vodou do 13,5 μ l. Vzorky byly inkubovány při 70 °C po dobu 5 min. Poté byly ke vzorkům přidány 4 μ l 5x RT pufru (250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂; Thermo Scientific), 1 μ l 10mM směsi dNTPs (Thermo Scientific) a 0,5 μ l inhibitoru ribonukleáz (RiboLock RNase, 20 U; Thermo Scientific). Vzorky byly inkubovány při 25 °C po dobu 5 min a poté k nim byl přidán 1 μ l reverzní transkriptázy (M-MLV, 200 U; Thermo Scientific). Ke každému vzorku byla vytvořena negativní kontrola, kde byla namísto reverzní transkriptázy použita voda. Vzorky byly vloženy do termocykléru (Bio-Rad; T100) s tímto nastavením:

25 °C 10 min

42 °C 70 min

70 °C 10 min

12 °C udržování.

Výsledná cDNA byla 20x zředěna vodou bez RNáz a DNáz a uložena do -20 °C.

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

qRT-PCR byla provedena v triplicátech s jednou negativní kontrolou. Na každou jamku 384jamkové destičky (Roche) byly použity 2 μ l připravené cDNA (resp. RNA pro negativní kontrolu), 2,5 μ l 2x LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (FastStart Taq DNA polymeráza, SYBR Green I fluorescenční barvivo, směs dNTPs, MgCl₂; Roche) a 0,5 μ l 10 μ M směsi primerů (Sigma-Aldrich). Použité primery byly navrženy pomocí webové stránky Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) a jsou uvedeny v tabulce.

Destička byla krátce stočena a reakce proběhla v přístroji LightCycler 480 II (Roche).

Cyklus prahu detekce fluorescence (cycle of treshold, C_T) byl vyhodnocen softwarem LightCycler 480 II. Pro standardizaci byly použity tři referenční tzv. housekeeping geny, a to *Ubiquitin B*, β -*Actin* a *GAPDH*.

Myší primery

Název genu	Zkratka	Sekvence	Směr
<i>angiopoietin-like 7</i>	<i>Angptl7</i>	GCACAGCTCCGAAAAGGTGGCT	Fw
		GGCTTGAAGGCTTCTGGGCGG	Rev
β - <i>actin</i>	β - <i>Act</i>	GATCTGGCACCACACCTTCT	Fw
		GGGGTGTTGAAGGTCTCAA	Rev
<i>carbonyl reductase 2</i>	<i>Cbr2</i>	AGGGCCACACAAGATCCGGG	Fw
		CCTCAGTGGGTGGCGCTCCT	Rev
<i>death-associated protein kinase 2</i>	<i>Dapk2</i>	CAGCGCAGCCTTTCGCCGAT	Fw
		TGCATACTCCAGCCCCGTGC	Rev
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>Gapdh</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	Fw
		ATCCACAGTCTTCTGGGTGG	Rev
<i>hypermethylated in cancer 1</i>	<i>Hic1</i>	GAGGCTGCTGAGGTGGCTGC	Fw
		CTCTTGTCGCAGGACGCGCA	Rev
<i>HSP α-crystallin-related, B6</i>	<i>Hspb6</i>	GCCCCAGTGTGGCGTTACC	Fw
		CCTCGTGCCGAGCATGGACC	Rev
<i>interleukin 1 α</i>	<i>IL1α</i>	TTGGTTAAATGACCTGCAACA	Fw
		CAACTGTTCGTGAGCGCTC	Rev
<i>interleukin 6</i>	<i>IL6</i>	GATGGATGCTACCAAAGTGA	Fw
		GGAAATTGGGGTAGGAAGGA	Rev
<i>toll-like receptor 2</i>	<i>Tlr2</i>	GTTCATCTCTGGAGCATCCG	Fw
		ACTCCTGAGCAGAACAGCGT	Rev
<i>tumor necrosis factor α</i>	<i>Tnfa</i>	TCGTAGCAAACCACCAAGTG	Fw
		AGATAGCAAATCGGCTGACG	Rev
<i>ubiquitin B</i>	<i>Ubb</i>	ATGTGAAGGCCAAGATCCAG	Fw
		TAATAGCCACCCCTCAGACG	Rev
<i>WAP four-disulfide core domain 2</i>	<i>Wfdc2</i>	TGGACCGAGCGAAGGAGAGC	Fw
		GGGGCAGGTGCCCTGCTTTT	Rev

Lidské primery

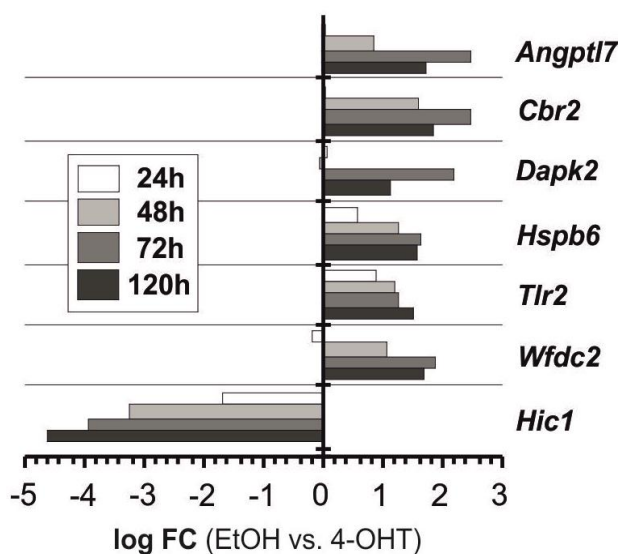
Název genu	Zkratka	Sekvence	Směr
<i>angiopoietin-Like 7</i>	<i>ANGPTL7</i>	CACAGACGGTCACTCAGACC	Fw
		CCATGTCACAGAACACCTCCA	Rev
<i>anexxin A1</i>	<i>ANXA1</i>	TAAGGGTGACCGATCTGAGG	Fw
		CCTTTCAACTCCAGGTCCAG	Rev
<i>β-actin</i>	<i>β-ACT</i>	GGCATCCTCACCTGAAGTA	Fw
		AGGTGTGGTGCCAGATTTTC	Rev
<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like</i>	<i>BNIP3L</i>	CGGCGGACTCGGCTTGTTGT	Fw
		GCTCCACCCAGGAAGTGTGAGG	Rev
<i>Cyclin G1</i>	<i>CCNG1</i>	GCCTCTCTCCTCTTGCCTAC	Fw
		TGTCAGTACCTCTATCATCTTGAC	Rev
<i>death-associated protein kinase 2</i>	<i>DAPK2</i>	CTCCCGCCGATTGTATGTTC	Fw
		TTCATAGACGTCGTGCAGC	Rev
<i>E2F transcription factor 7</i>	<i>E2F7</i>	GCCTCGCTCTCCCTTCCCGA	Fw
		TAGTCTGGGCTGCCTGGGGC	Rev
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>GAPDH</i>	CACCACACTGAATCTCCCT	Fw
		CCCCTCTTCAAGGGGTCTAC	Rev
<i>hypermethylated in cancer 1</i>	<i>HIC1</i>	CGACGACTACAAGAGCAGCA	Fw
		TGCACACGTACAGGTTGTCA	Rev
<i>HSP α-crystallin-related, B6</i>	<i>HSPB6</i>	GGAGGGAGGTGTTTCAGGAT	Fw
		AGGCACAGGGATCTCCATC	Rev
<i>kynureninase</i>	<i>KYNU</i>	TGTAGAGGAGCGGGGGTGCC	Fw
		TGGATTCCGCTTGTCAAAACCA	Rev
<i>toll-like receptor 2</i>	<i>TLR2</i>	CCCATTCATTCGTTCCATTC	Fw
		ACCCACACCATCCACAAAGT	Rev
<i>transmembrane and coiled-coil domains 1</i>	<i>TMCO1</i>	ACTCGGTGGTGGCGGAGTCT	Fw
		CGAGCAGAGCCGTGCACACA	Rev
<i>ubiquitin B</i>	<i>UBB</i>	GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT	Fw
		TCACGAAGATCTGCATTTTGA	Rev
<i>WD repeat and FYVE domain containing 1</i>	<i>WDFY1</i>	CGGGTGTCTGCGATTATCTT	Fw
		AGCTTCAGCAGGGTGATCTG	Rev
<i>WAP four-disulfide core domain 2</i>	<i>WFDC2</i>	ATAGCACCATGCCTGCTTGT	Fw
		CTGCAGCACTTGAGGTTGTC	Rev

3.7 Statistická analýza

Statistická signifikance byla ověřena Studentovým t-testem. Za signifikantní byly považovány hodnoty: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku průměru normalizovaných hodnot ze všech měření.

4. Předběžné výsledky

Tato práce je součástí většího projektu, který navazuje na výsledky analýzy genové exprese pomocí DNA čipu. Záměrem tohoto experimentu, který byl dříve proveden dr. Pospíchalovou v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG, bylo odhalit nové cílové geny nádorového supresoru *Hic1*. Pro expresní profilování byla použita mRNA izolovaná z myších embryonálních fibroblastů (MEF). Embrya vzniklá křížením myši *Hic1^{loxP/loxP}* s myší *Rosa26-CreER^{T2}* byla izolována ve 14. embryonálním dni. Izolované buňky MEF byly ošetřeny pomocí 4-hydroxytamoxifenu (4-OHT) pro aktivaci rekombinázy Cre. Kontrolním buňkám bylo podáno stejné množství etanolu, který byl použit také jako rozpouštědlo pro 4-OHT. RNA byla poté izolována ve čtyřech časových úsecích po rekombinaci, a to 24, 48, 72 a 120 h. Následně byla provedena expresní čipová analýza pomocí MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip (Illumina). Po vyhodnocení analýzy bylo objeveno šest genů, jejichž exprese byla v buňkách s delecí *Hic1* zvýšena více než dvakrát – relativní genová exprese vynesená ve formě logaritmu ($\log_2 FC$; fold change) byla větší než 1 ($\log_2 FC \geq 1$) alespoň ve dvou časových úsecích.



Obr. 4.1

Expresní profil myších embryonálních fibroblastů *Hic1^{delEx2/delEx2}*, u nichž byla delece vyvolána použitím 4-OHT, vzhledem k MEF buňkám *Hic1^{loxP/loxP}*, kterým byl podán etanol. RNA byla izolována v uvedených časových intervalech a hybridizována na expresní čip MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip (Illumina). Hodnoty jsou vyjádřeny formou binárního logaritmu. Delece genu *Hic1* odhalila signifikantní zvýšení exprese šesti genů ($q < 0,05$; $\log_2 FC \geq 1$) alespoň ve dvou intervalech.

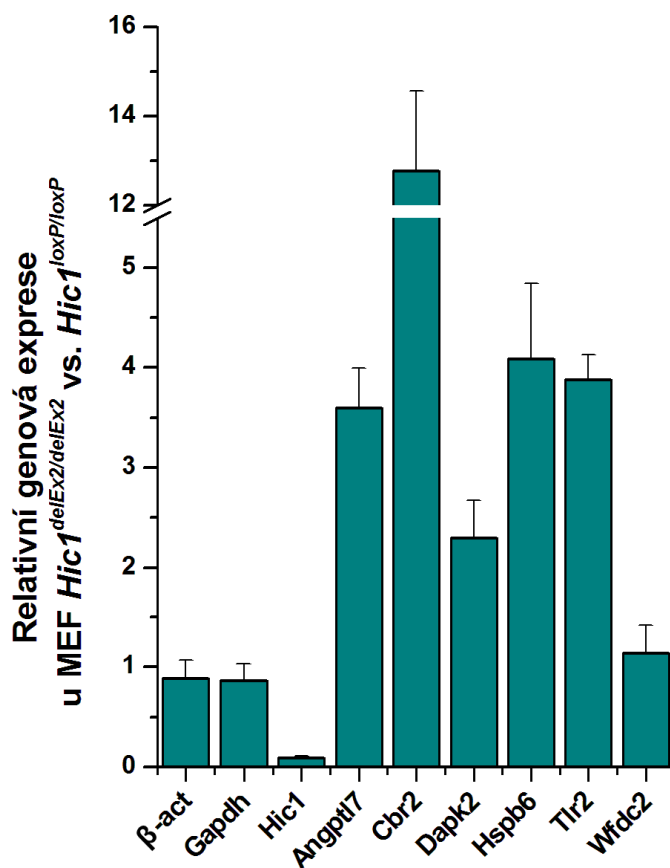
Úspěšnost rekombinace dokazuje výrazné snížení exprese genu *Hic1*.

<i>Anptl7</i>	<i>angiopoietin-like 7</i>
<i>Cbr2</i>	<i>carbonyl reductase 2</i>
<i>Dapk2</i>	<i>death-associated protein kinase 2</i>
<i>Hspb6</i>	<i>HSP α-crystallin-related, B6</i>
<i>Tlr2</i>	<i>toll-like receptor 2</i>
<i>Wfdc2</i>	<i>WAP four-disulfide core domain 2</i>

5. Výsledky

5.1 Potvrzení nově identifikovaných cílových genů *Hic1*

Na základě předběžných výsledků jsme pomocí qRT-PCR ověřili vliv delece genu *Hic1* na expresi jeho šesti nově identifikovaných cílových genů. Myší embryonální fibroblasty genotypu *Hic1*^{loxP/loxP}*xRosa26-CreER*^{T2} jsme ošetřili 4-OHT, čímž jsme *in vitro* vyvolali vyštěpení druhého exonu genu *Hic1* ohraničeného dvěma *loxP* sekvencemi. Jako kontrola byl použit etanol, rozpouštědlo 4-OHT. Po 72 h od indukce rekombinace jsme izolovali totální RNA. Analýza pomocí qRT-PCR potvrdila zvýšenou expresi všech nových možných cílových genů *Hic1*, kromě *Wfdc2*, jehož exprese v tomto experimentu nebyla výrazně změněná, u buněk *Hic1*^{delEx2/delEx2} oproti buňkám *Hic1*^{loxP/loxP}.



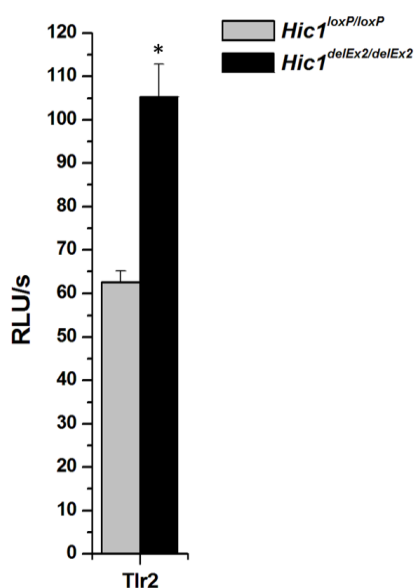
Obr. 5.1

Relativní genová exprese možných cílových genů *Hic1* analyzovaná pomocí qRT-PCR. Totální RNA byla izolovaná z buněk MEF *Hic1*^{loxP/loxP}*xRosa26-CreER*^{T2} kultivovaných s 4-OHT, nebo etanolem jako kontrolou po dobu 72 h. Hladina exprese genů v buňkách kultivovaných s etanolem byla nastavena na hodnotu 1. Hodnoty byly normalizovány na hladinu exprese *Ubb*, a vyneseny v závislosti k expresi genů v buňkách kultivovaných s etanolem (fold change). V grafu je rovněž zobrazená relativní exprese dalších dvou referenčních genů – β -act a *Gapdh*. Úspěšnost rekombinace potvrzuje výrazně snížená relativní exprese *Hic1*. Analýza byla vyhodnocena ze dvou experimentů provedených v triplicátech.

5.2 Vztah mezi expresí *Hic1* a *Tlr2*

V následující části projektu jsme se zaměřili na jeden z identifikovaných genů – *Toll-like receptor 2 (Tlr2)*. TLR2 je důležitým efektozem imunitního systému. Patří do rodiny Toll-like receptorů, které hrají nezastupitelnou roli při obraně proti mikroorganismům. TLR2 rozpoznávají především „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), ale zároveň mohou být stimulovány také endogenními ligandy uvolňovanými poškozenou tkání, neboli „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs). Signalizační kaskáda započatá interakcí TLR2 s příslušným ligandem probíhá přes adaptorový protein MyD88 (myeloid differentiation 88), což vyústí v aktivaci transkripčních faktorů, zejména pak NFκB, který reguluje expresi mnoha genů, mj. prozánětlivých cytokinů (shrnuto v Midwood and Piccinini, 2010; viz výše). Signalizace přes TLR2 může navíc podporovat proliferaci buněk a potlačovat apoptózu a přispívat tak ke vzniku karcinogeneze (Tye et al., 2012).

Pro potvrzení vztahu mezi funkcí proteinu *Hic1* a expresí *Tlr2* jsme využili luciferázovou reportérovou esej. Promotor myšího genu *Tlr2* jsme zaklonovali do reportérového vektoru pGL4.26 se sekvencí pro luciferázu *firefly*. Tento reportér jsme společně s vektorem produkujícím luciferázu *renilla* vnesli do myších embryonálních fibroblastů pomocí elektroporace. Jako cílové buňky jsme použili MEF *Hic1^{loxP/loxP}xRosa26-CreERT2* ošetřené stejně jako v předchozím experimentu (*Hic1^{delEx2/delEx2}*, u kterých jsme indukovali rekombinaci použitím 4-OHT, a *Hic1^{loxP/loxP}* za použití etanolu). Aktivitu luciferázy jsme měřili 24 h po elektroporaci a hodnoty jsme normalizovali pomocí exprese luciferázy *renilla*. Měření potvrdilo zvýšenou luciferázovou aktivitu *Tlr2* reportéru u buněk, kde byl deletován *Hic1*.



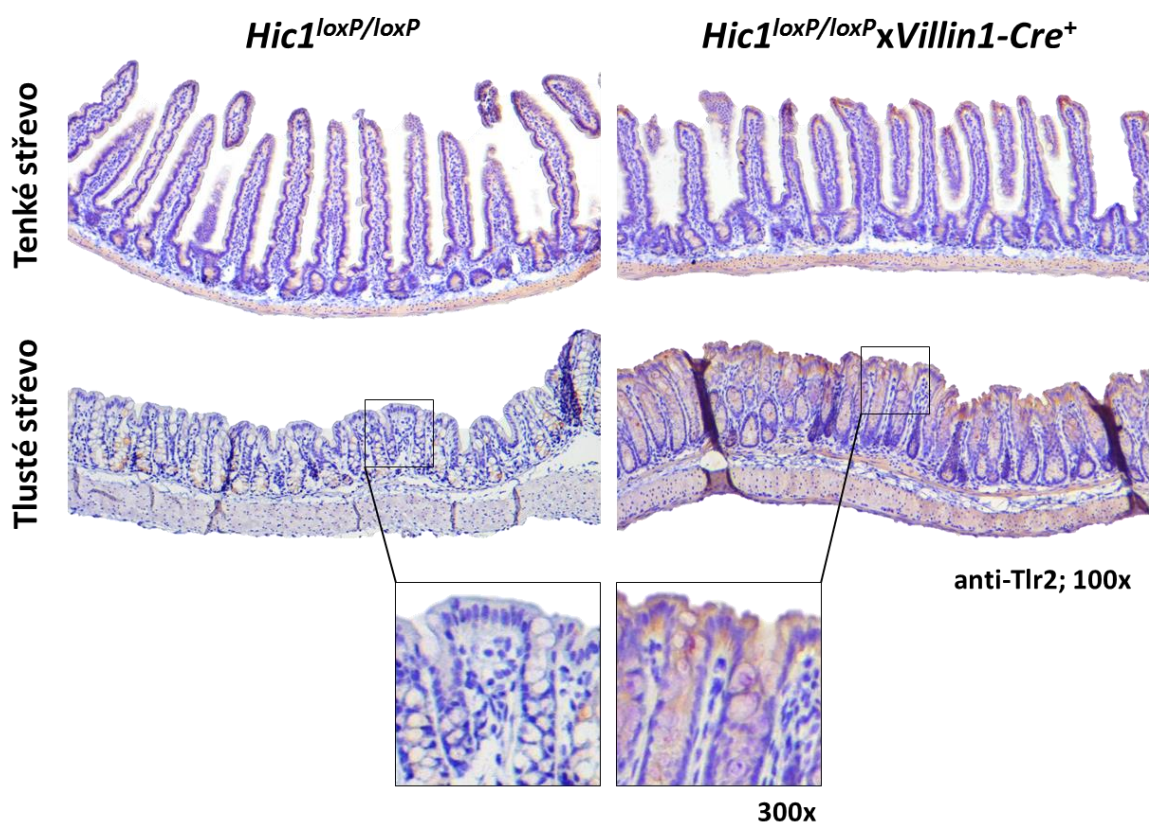
Obr. 5.2

Luciferázová reportérová esej buněk MEF elektroporovaných reportérovým vektorem s promotorem genu *Tlr2* (Tlr2-Luc). Před elektroporací byly buňky kultivovány po dobu 72 h za použití 4-OHT, nebo etanolu jako kontrolou. Aktivita luciferázy byla měřena 24 h po elektroporaci. Naměřené hodnoty byly normalizovány na signál luciferázy *renilla* a jsou vyneseny jako průměrné luminiscenční jednotky za sekundu (RLU/s). Hodnoty byly získány ze dvou nezávislých experimentů provedených v triplicátech. Histogram zobrazuje průměrné hodnoty z jednoho měření. Statistická signifikance: * $p < 0,05$

5.3 Lokalizace exprese Tlr2 ve střevě

Výsledky získané *in vitro* jsme ověřovali ve střevním epitelu za využití imunohistochemického barvení, kdy jsme porovnávali změnu produkce Tlr2 ve střevě myší exprimujících *Hic1* a myší s delecí druhého exonu genu *Hic1*. Endogenní exprese proteinu Hic1 ve střevním epitelu již v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG byla potvrzená, a to díky vytvoření myšího modelu, ve kterém byla část genu *Hic1* nahrazena sekvencí pro fluorescenční protein citrín (Pospichalova et al., 2011; viz výše). Tento model ukázal, že Hic1 je ve střevě produkován všemi buňkami, ale nejvíce diferencovanými epiteliálními buňkami v horních částech klků tenkého střeva a v horních částech krypt tlustého střeva.

Imunohistochemické barvení pomocí protilátky proti Tlr2 bylo provedeno na řezech střev myší *Hic1^{loxP/loxP}*, kde je druhý exon genu *Hic1* ohraničen dvěma *loxP* sekvencemi, a na myších *Hic1^{loxP/loxP} x Villin1-Cre⁺*, u nichž dochází k jeho tkáňově specifické delecí, a to v epiteliálních buňkách střeva. Správná účinnost použité protilátky byla ověřena řadou výzkumných skupin (např. Zhong et al., 2008). Barvení prokázalo zvýšenou pozitivitu Tlr2 ve střevě myší *Hic1^{delEx2/delEx2}* oproti myším *Hic1^{loxP/loxP}*, a to zejména v diferencovaných buňkách. Střevní epitel neprokazoval žádné významné histopatologické změny.



Obr. 5.3

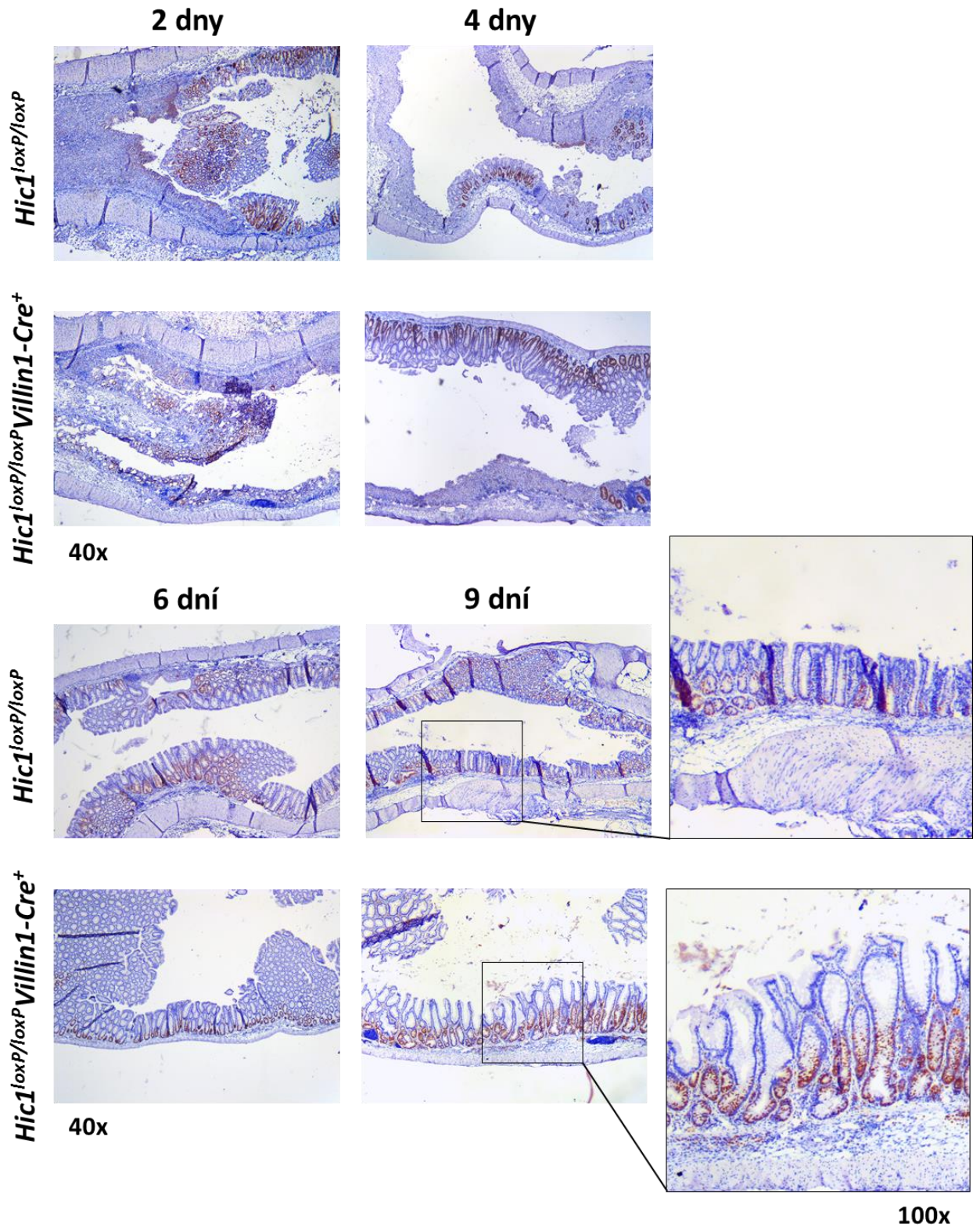
Imunohistochemické barvení protilátkou proti Tlr2. Barvení bylo provedeno ve střevě myší *Hic1^{loxP/loxP}*, nebo *Hic1^{loxP/loxP} x Villin1-Cre⁺*. Tlr2 je vizualizován pomocí DAB, má hnědou barvu. Modře jsou zbarvena buněčná jádra.

5.4 Vliv zánětu na střevo myši *Hic1*^{+/+} a *Hic1*^{-/-}

Exprese *TLR2* se zvyšuje ve střevě pacientů s ulcerózní kolitidou (Frolova et al., 2008), a proto jsme analyzovali vliv chemicky indukovaného zánětu ve střevě myši po delecí genu *Hic1*.

Obdobně jako v předchozích experimentech jsme využili normální myši a myši se ztrátou genu *Hic1*, u nichž jsme použitím dextran sulfátu sodného (DSS) vyvolali akutní zánět střevního epitelu (kolitidu). DSS je toxický především pro epiteliální buňky tlustého střeva a jeho použitím lze v závislosti na koncentraci DSS a délce podání vyvolat akutní nebo chronický zánět (Wirtz et al., 2007).

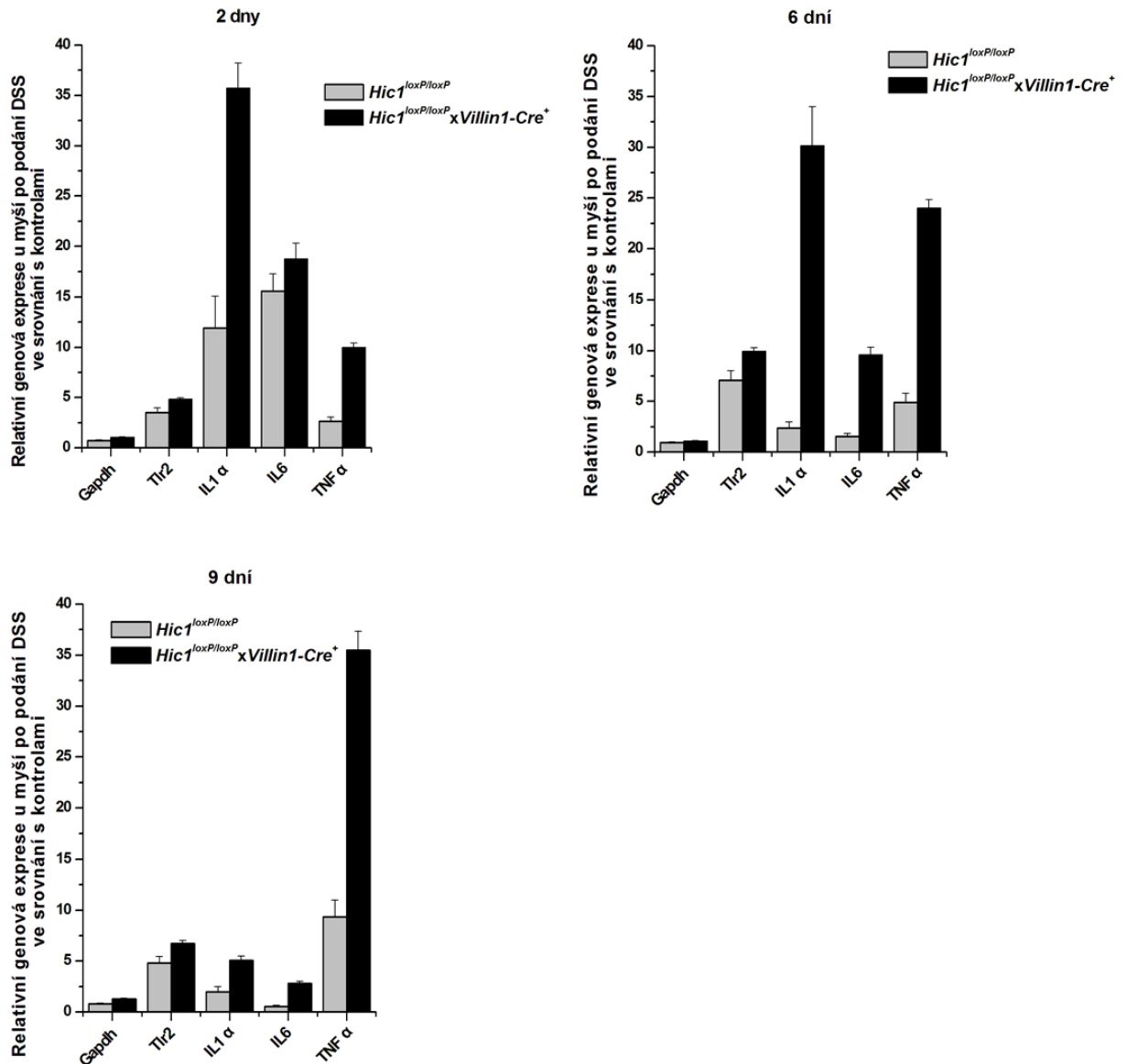
Podáváním 2% DSS v pitné vodě po dobu 5 dní jsme u myši genotypu *Hic1*^{loxP/loxP} a *Hic1*^{loxP/loxP}*xVillin1-Cre*⁺ vyvolali kolitidu a střeva poté izolovali v průběhu dalších 2-9 dní po navrácení pitné vody. Akutní zánět je v tomto případě následován fází regenerace epitelu, která nastává cca šest dní po skončení podávání DSS. Malý kus tkáně proximální části tlustého střeva byl odebrán na analýzu qRT-PCR, zbytek střeva jsme fixovali pro účely histochemického barvení. Střeva myši *Hic1*^{loxP/loxP} a *Hic1*^{loxP/loxP}*xVillin1-Cre*⁺ jsme barvili imunohistochemicky protilátkou proti Ki67, který je přítomný v proliferujících buňkách. Analýza histologických řezů neprokázala velké rozdíly v poškození střevního epitelu myši, ovšem ve fázi regenerace jsme mohli pozorovat mírné navýšení proliferace u myši *Hic1*^{loxP/loxP}*xVillin1-Cre*⁺.



Obr. 5.4

Imunohistochemické barvení tlustého střeva myši *Hic1^{loxP/loxP}*, nebo *Hic1^{loxP/loxP} x Villin1-Cre⁺* po chemicky indukované kolitidě. Myšim byl podáván 2% DSS po dobu 5 dní, střeva byla izolována 2, 4, 6 a 9 dní po skončení podávání. Střeva byla barvena protilátkou proti Ki67, který je označen hnědě pomocí DAB. Jádra jsou značena modře pomocí hematoxylinu.

Analýza exprese prozánětlivých cytokinů ve střevní tkáni po chemické kolitidě prokázala navýšení ve střevech myši *Hic1^{loxP/loxP}xVillin1-Cre⁺* oproti kontrole. Expres genů ve střevech myši 4 dny po skončení procedury není zobrazena z důvodu velkých rozdílů mezi jednotlivými zvířaty. Tyto myši před usmrcením navíc prokazovaly nejhorší zdravotní stav ze všech zkoumaných.



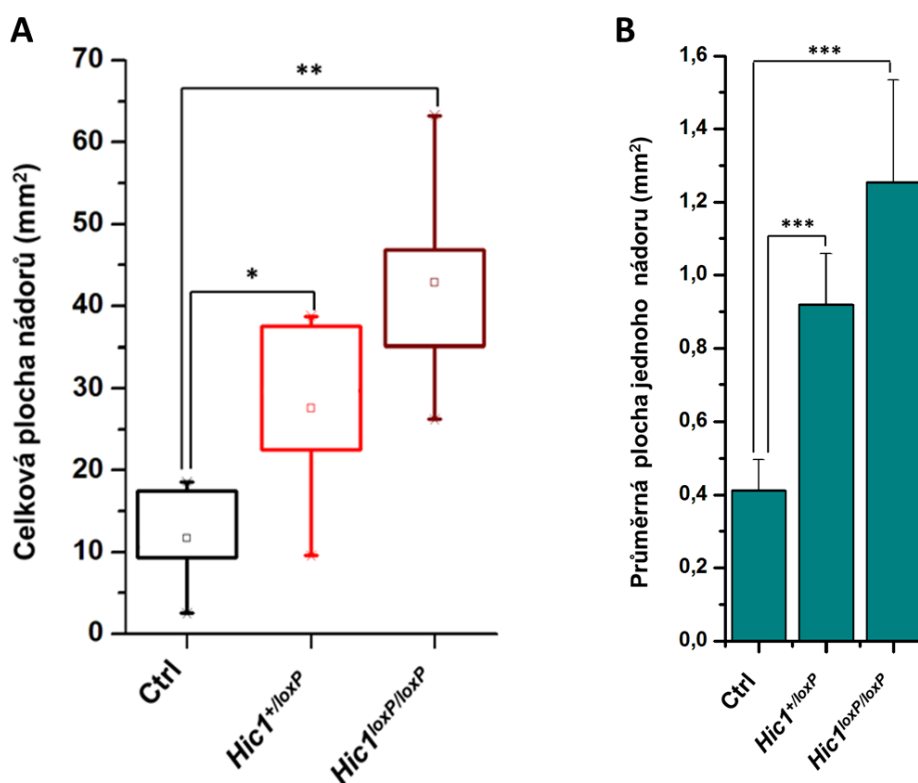
Obr. 5.4.1

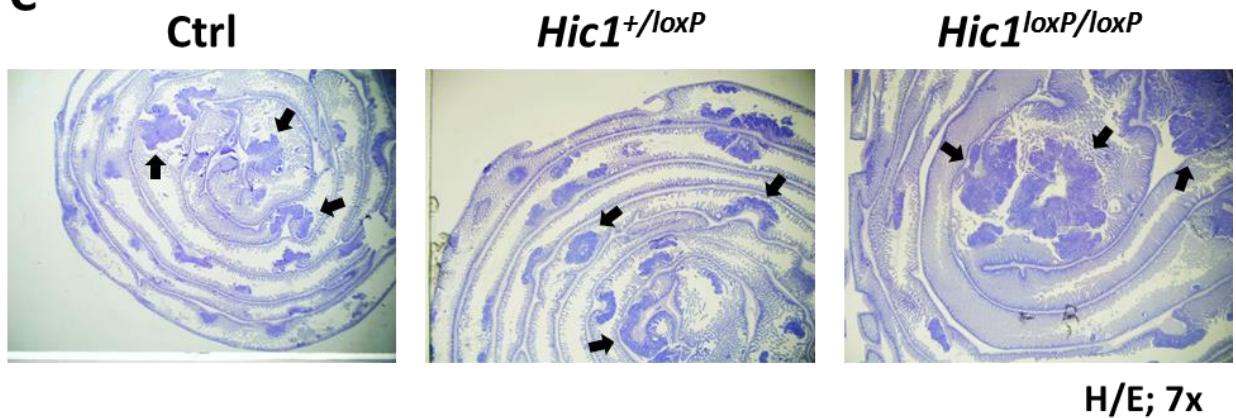
Relativní genová exprese prozánětlivých cytokinů *Il1a*, *Il6* a *Tnfa* a *Tlr2* ve střevech myši *Hic1^{loxP/loxP}* a *Hic1^{loxP/loxP}xVillin1-Cre⁺* po chemicky indukované střevní kolitidě ve srovnání s kontrolami. Myši pily 2% DSS po dobu 5 dní, totální RNA byla izolována 2, 6 a 9 dní po skončení podávání DSS a expresní hladina byla vyhodnocena pomocí qRT-PCR. Hodnoty byly normalizovány na hladinu exprese *Ubb*. V grafu je rovněž zobrazena hladina exprese dalšího referenčního genu *Gapdh*. Hladina exprese genů kontrolních střev bez kolitidy byla nastavena na hodnotu 1. Analyzována byla vždy čtyři zvířata obou genotypů ve všech časových intervalech.

5.5 Vliv delece *Hic1* na střevo se zkracující mutací *Apc*

V nedávné době byl popsán pozitivní vliv delece genu *Hic1* na tvorbu nádorů u myši se zkráceným a tudíž nesprávně funkčním proteinem Apc (Mohammad et al., 2011; viz výše). Tyto výsledky jsme potvrdili v myším modelu s podmíněnou delecí obou alel genu *Hic1*. Výhodou námi použitého modelu oproti publikovanému je tkáňově specifická delece genu *Hic1* a možnost porovnání heterozygotní i homozygotní ztráty tohoto genu.

Myší kmen *Apc^{Min}*, který má protein Apc zkrácený z 2842 aminokyselin na 850 aminokyselin, se používá jako model familiární adenomatózní polypózy, kde je zvýšená aktivita signalizace Wnt (viz výše). Kmen *Apc^{Min}* jsme zkřížili s kmenem *Hic1^{+loxP}xVillin1-Cre⁺*, nebo *Hic1^{loxP/loxP}xVillin1-Cre⁺*. Tyto kmeny nesou v důsledku tkáňově specifické exprese rekombinázy Cre ve střevě delecí jedné či obou alel genu *Hic1*. Jako kontrola byl použit kmen *Hic1^{loxP/loxP}xVillin1-Cre⁻*. Model *Apc^{Min}* tvoří nádory preferenčně v tenkém střevě, a proto jsme izolovali pouze tenká střeva z jedinců starých 20 týdnů. Analýza histologických řezů potvrdila, že myši se zkráceným Apc a delecí jedné nebo obou alel genu *Hic1* tvoří větší hyperplázie/nádory než myši jen se zkráceným Apc. Ve střevěch myši s homozygotní delecí genu *Hic1* se tvoří větší nádory než u myši s delecí pouze jedné alely.



C**Obr. 5.5**

A: Kvantifikace celkové plochy nádorů v tenkém střevě myši $Apc^{Min}xHic1^{loxP/loxP}xVillin1-Cre^{-}$ (vlevo; Ctrl), $Apc^{Min}xHic1^{+/loxP}xVillin1-Cre^{+}$ (uprostřed) a $Apc^{Min}xHic1^{loxP/loxP}xVillin1-Cre^{+}$ (vpravo). Experiment byl navržen pro celkový počet 15 myší, před jeho ukončením uhynula jedna myš z každé skupiny. Tenká střeva byla izolována z myší ve věku 20 týdnů a byla barvena prostřednictvím hematoxylinu a eosinu. Velikost a počet nádorů byly kvantifikovány pomocí softwaru Ellipse. Boxy představují druhý a třetí kvartil hodnot, čtvereček značí průměr, vousy představují minimum a maximum hodnot.

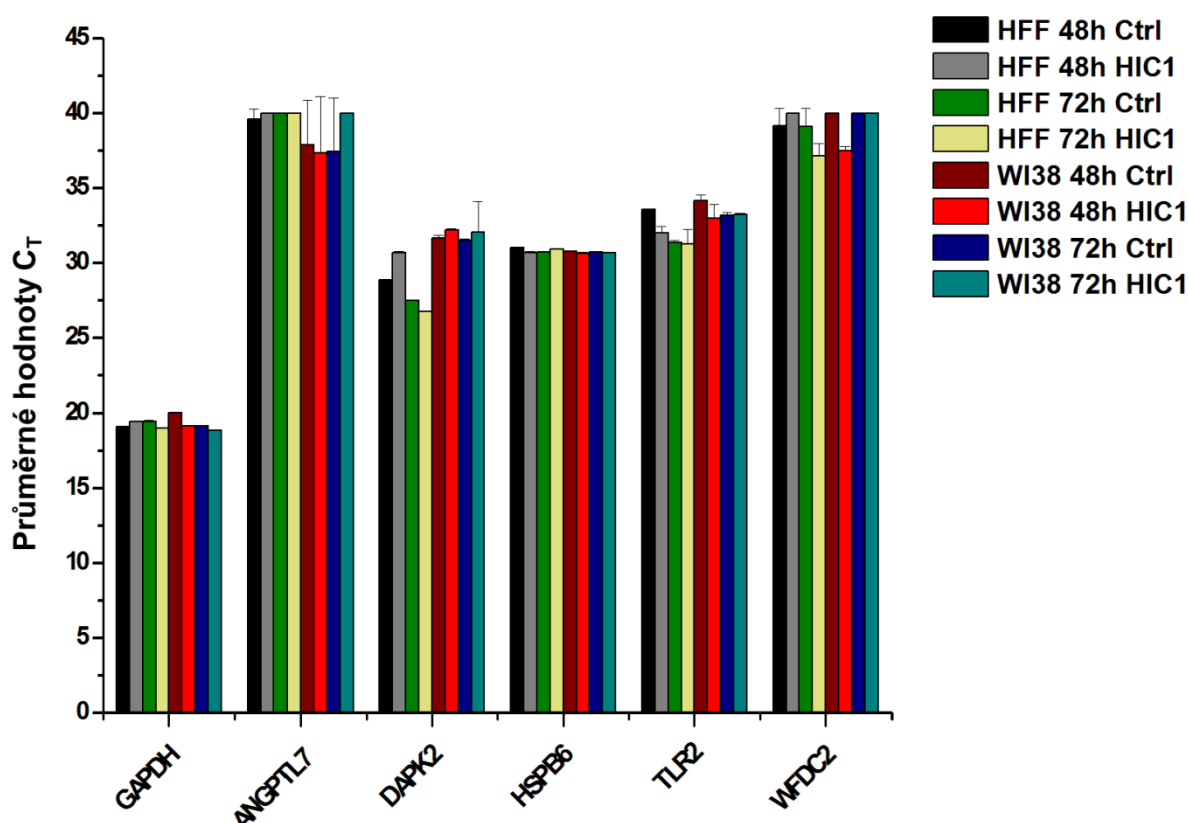
Statistická signifikance: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

B: Kvantifikace průměrné plochy jednoho nádoru u stejných myší jako v A.

C: Reprezentativní obrázky tenkého střeva stejných myší jako v A. Šipky označují reprezentativní adenomy a nádory.

5.6 Potvrzení nově identifikovaných cílových genů u člověka

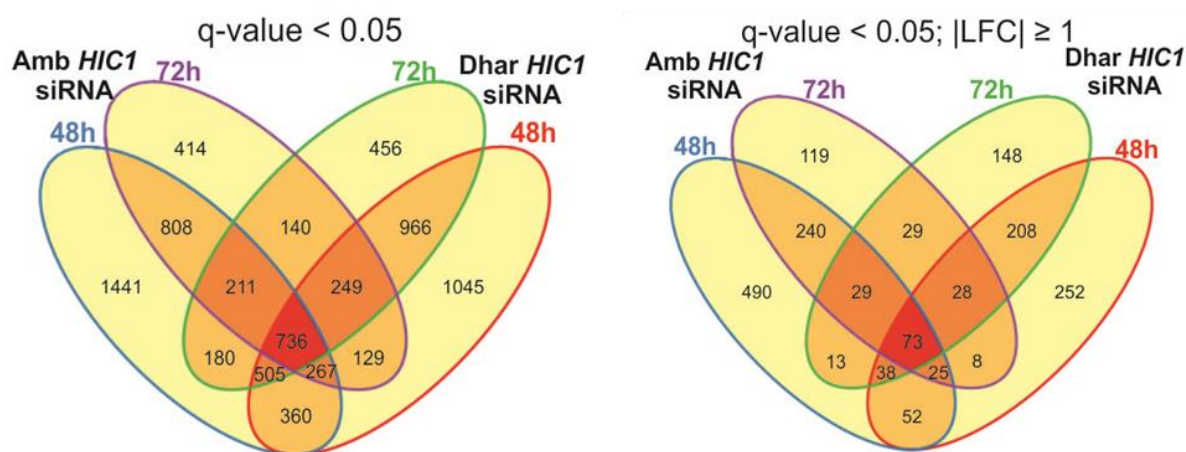
V předběžných výsledcích jsme expresním profilováním myších embryonálních fibroblastů identifikovali šest genů potlačovaných nádorovým supresorem *Hic1*. Pro ověření těchto nově odhalených cílových genů na lidských buňkách jsme využili proces RNA interference. Lidské fetální plicní fibroblasty WI38 a fibroblasty HFF izolované z předkožky jsme transfekovali komerčně dostupnými siRNA proti mRNA *HIC1*, které byly pořízeny od firem Dharmacon a Ambion. Jako kontrolu jsme použili necílicí (non-targeting) siRNA. cDNA jsme připravili z totální RNA izolované z buněk 48 a 72 hodin po knockdownu. Analýzu změny exprese potenciálních cílových genů jsme provedli pomocí qRT-PCR. Expresce cílových genů identifikovaných dříve u myši byla v lidských fibroblastech celkově nízká a neměnila se ani po snížení exprese *HIC1*. Navíc exprese samotná byla u některých genů v buňkách neprůkazná vzhledem k vysokému počtu cyklů.



Obr. 5.6

Analýza exprese možných cílových genů *HIC1* provedená na lidských buňkách. Expresce *HIC1* v buňkách WI38 a HFF byla snížena pomocí komerčně dostupné siRNA proti mRNA *HIC1*. Totální RNA byla izolována 48 a 72 h po transfekci siRNA. qRT-PCR byla provedena v triplicátech ve dvou experimentech, kdy byla exprese *HIC1* snížena prostřednictvím siRNA buď od firmy Ambion, nebo Dharmacon. Histogram představuje reprezentativní výsledky po transfekci pomocí siRNA od firmy Ambion. V grafu jsou vyneseny průměrné cykly prahu detekce fluorescence (C_T) z jednoho experimentu. Zobrazen je také C_T referenčního genu *GAPDH*.

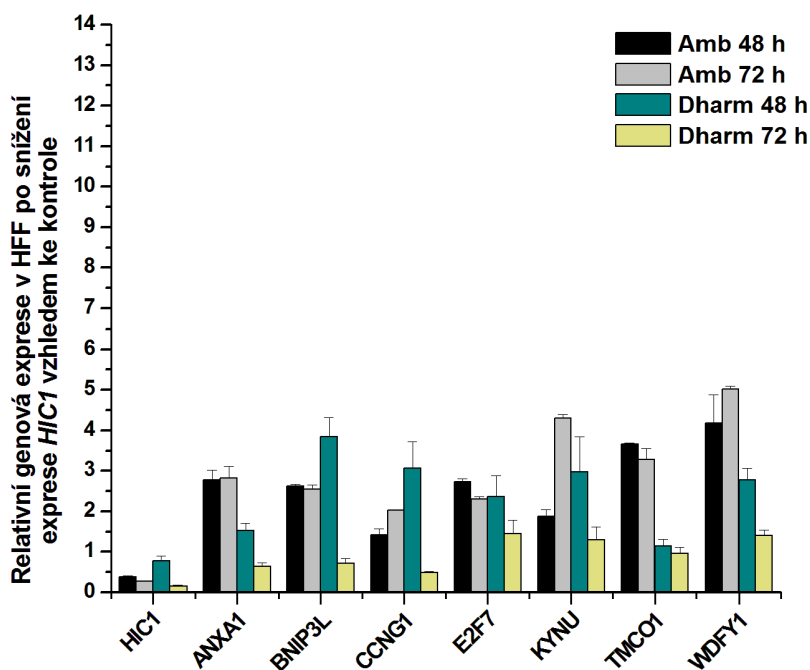
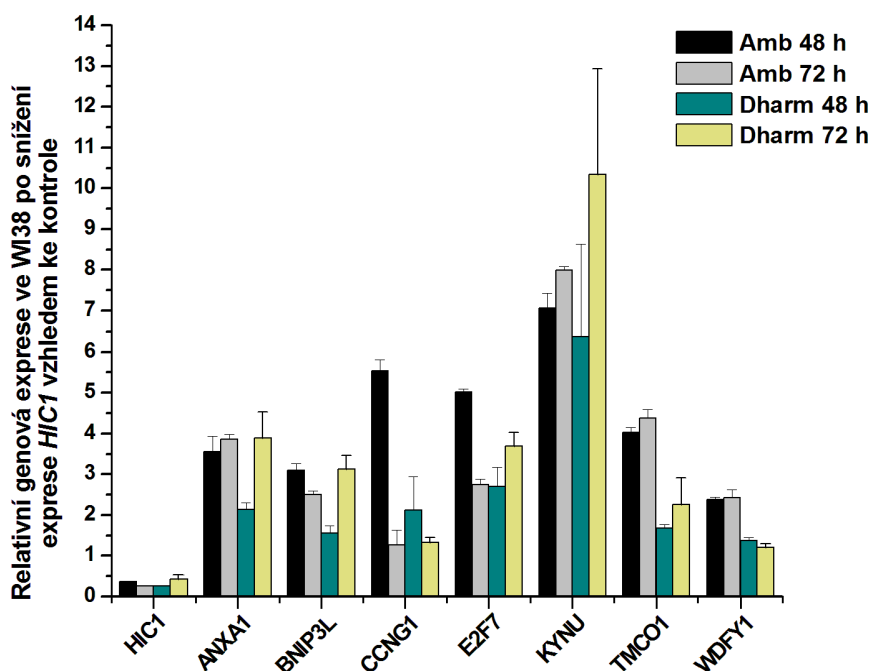
Jelikož analýza qRT-PCR nepotvrdila rozdíly v expresi nově identifikovaných cílových genů v lidských buňkách po knockdownu *HIC1*, provedli jsme expresní profilování buněk WI38. RNA jsme připravili obdobným způsobem jako v předchozím experimentu. Buňky WI38 jsme transfekovali pomocí komerčně dostupných siRNA od firem Ambion a Dharmacon a po 48 a 72 h jsme izolovali RNA. Expresní čip byl proveden dr. Pospíchalovou (nepublikovaná data). Expresní profilování odhalilo signifikantní změnu exprese u 736 genů ($q < 0,05$). U 73 genů byla exprese změněná víc jak dvakrát ($q < 0,05$; $|\log_2FC| \geq 1$).



Obr. 5.6.1

Expresní profil lidských fetálních fibroblastů WI38 a lidských předkožkových fibroblastů HFF po snížení exprese *HIC1*. Snížení exprese bylo provedeno prostřednictvím dvou typů siRNA (Amb – Ambion; Dhar – Dharmacon). Expresí genů byla porovnávána s expresí ve stejných buňkách transfekovaných pomocí necílicí siRNA. RNA byla izolována 48 a 72 h po transfekci. Expresní profilování odhalilo signifikantní změnu exprese u 736 genů. Expresí byla změněná víc jak dvakrát u 73 genů.

Pro potvrzení změny exprese těchto genů po snížení exprese genu *HIC1* jsme provedli analýzu buněk HFF a WI38 pomocí qRT-PCR. Tímto způsobem jsme testovali více než 50 potenciálních cílových genů, které byly identifikovány expresním čipem jako více exprimované v nepřítomnosti mRNA genu *HIC1*. Totální RNA jsme izolovali z buněk WI38 a HFF, které byly ošetřeny stejným způsobem jako v předchozích dvou experimentech (byly transfekovány siRNA proti *HIC1* buď od firmy Ambion, nebo Dharmacon, a RNA byla izolována 48 a 72 h po transfekci; jako kontrola byla použita necílicí siRNA). Analýza odhalila sedm genů, jejichž exprese byla po snížení exprese *HIC1* zvýšena nejméně dvakrát oproti kontrole alespoň ve čtyřech případech z osmi.

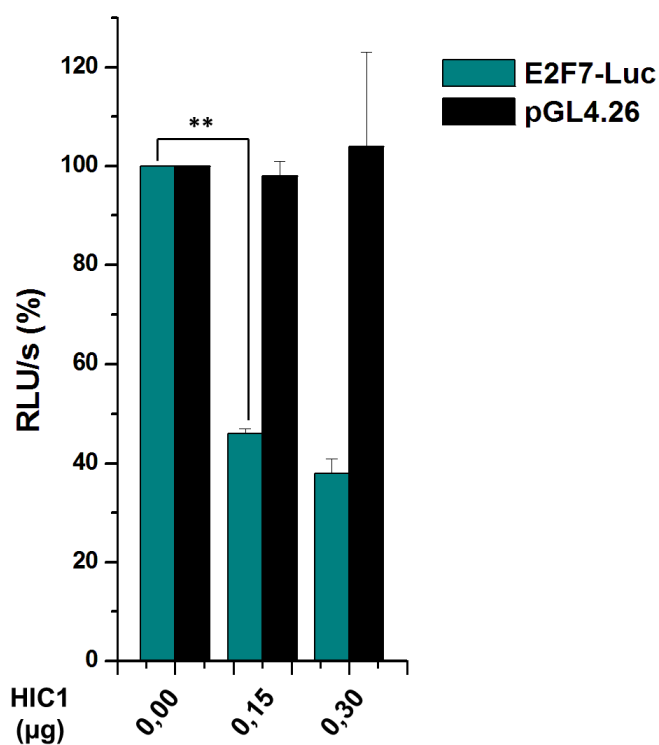


Obr. 5.6.2

Analýza exprese genů, dříve identifikovaných expresním čipem, po snížení exprese *HIC1*, v buňkách WI38 (horní graf) a HFF (spodní graf). Exprese *HIC1* byla snížena pomocí komerčně dostupné siRNA proti mRNA *HIC1* od firmy Ambion, resp. Dharmacon. Totální RNA byla izolována 48 a 72 h po transfekci siRNA. qRT-PCR byla provedena v triplikátech. Histogram reprezentuje relativní změnu genové exprese v buňkách po transfekci pomocí specifické siRNA vzhledem ke kontrole. Úspěšnost knockdownu *HIC1* potvrzuje snížení jeho relativní exprese v buňkách po ošetření specifickou siRNA oproti kontrolním buňkám.

5.7 Vztah mezi expresí *HIC1* a *E2F7*

Pro další studium identifikovaných cílových genů jsme se zaměřili na *E2F7*, jehož exprese byla výrazně zvýšena skoro ve všech případech po knockdownu *HIC1*. *E2F7* patří do rodiny evolučně konzervovaných transkripčních faktorů E2F, které jsou známými regulátory buněčného cyklu (Chen et al. 2009). Pro další potvrzení vztahu mezi proteinem *HIC1* a genem *E2F7* jsme využili luciferázovou reportérovou esej. Promotor genu *E2F7* jsme zaklonovali do reportérového vektoru pGL4.26 se sekvencí pro luciferázu *firefly*. Tento reportér jsme kotransfekovali do buněk HEK293 společně se vzrůstajícím množstvím plasmidu produkujícího protein *HIC1* a s reportérovým vektorem exprimujícím luciferázu *renilla*. Aktivitu luciferázy jsme měřili 24 h po transfekci a hodnoty normalizovali na změřenou aktivitu luciferázy *renilla*. Měření potvrdilo sníženou luciferázovou aktivitu reportéru *E2F7* u buněk, ke kterým byl přidán exogenní *HIC1*.



Obr. 5.7

Luciferázová reportérová esej buněk HEK293 kotransfekovaných vektorem produkujícím luciferázu *firefly* se zaklonovaným promotorem genu *E2F7* (*E2F7*-Luc) společně se zvyšujícím se množstvím plasmidu kódujícího *HIC1*. Naměřené hodnoty byly normalizovány na signál luciferázy *renilla* a jsou vyneseny v relativních luminiscenčních jednotkách za sekundu v procentech (RLU/s), kde jako 100 % byly nastaveny hodnoty získané měřením buněk transfekovaných pomocí *E2F7*-Luc bez tranfekce plasmidem kódujícím *HIC1*. Jako kontrola byl použit luciferázový reportérový vektor pGL4.26 bez inzerty. Histogram reprezentuje hodnoty získané měřením ze tří nezávislých experimentů provedených v duplikátech.

Statistická signifikance: ** $p < 0,01$

6. Diskuze

Tumor supresorový gen *Hypermethylated in cancer 1 (HIC1)* byl poprvé popsán před více než dvaceti lety. Z funkčního hlediska je protein HIC1 transkripčním represorem, který hraje významnou roli v organismu (viz kapitola 2.3), navzdory tomu ale stále nejsou dokonale popsány všechny jeho funkce. Doposud bylo odhaleno dvanáct genů, jejichž exprese je přímo regulována prostřednictvím HIC1. Polovina z těchto genů byla identifikována na základě přítomnosti HIC1 responzivních elementů (HiRE) (Pinte et al., 2004), druhá polovina byla odhalena díky expresnímu profilování (shrnutí v Rood and LePrince, 2013). Některé z dříve publikovaných prací identifikovaly cílové geny HIC1 na základě expresního profilování nádorových linií s přirozenou ztrátou *HIC1*, u kterých byla nuceně vyvolána ektopická exprese *HIC1* (Briggs et al., 2008; Foveau et al., 2012; Van Rechem et al., 2009; Zhang et al., 2010). Exprese takto identifikovaných genů může kolísat v závislosti na individuální buněčné linii. Některé z těchto identifikovaných genů však byly dále ověřeny za využití RNA interference v lidských fibroblastech (Dehennaut et al., 2013; Foveau et al., 2012; Van Rechem et al., 2009).

V Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG se podařilo identifikovat šest nových genů, potenciálně regulovaných transkripčním represorem Hic1. K odhalení nových cílových genů byla využita podmíněná delece *Hic1* v myších embryonálních fibroblastech (MEF). Tento použitý systém je unikátní v tom, že využívá endogenní inaktivace *Hic1*. Nevýhodou je, že v myších buňkách může Hic1 regulovat set genů odlišný od genů regulovaných proteinem HIC1 v lidských buňkách. Rovnocennou alternativní metodou takového systému v lidských buňkách by bylo využití editace genomu pomocí systému TALEN (transcription activator-like effector nuclease) nebo CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats). Takové metody ve výzkumu funkce genu *HIC1* zatím nebyly použity, přestože by v efektivnosti mnohonásobně nahradily používané snížení exprese pomocí RNA interference, které není trvalé a zároveň může mít řadu nepředvídatelných cílů.

Z genů, které jsme identifikovali expresním profilováním a kontrolní analýzou qRT-PCR (Obr. 5.1), jsme se zaměřili na *Toll-like receptor 2 (Tlr2)*. TLR2 patří do rodiny transmembránových receptorů, které jsou důležité v imunitním systému. Tyto receptory rozpoznávají struktury typické pro mikroorganismy, ligandy uvolňované poškozenou tkání i mediátory zánětu produkované imunitními buňkami. Rozpoznání ligandu Toll-like receptorem 2 spouští signalizační kaskádu přes adaptorový protein MyD88, což vyústí v aktivaci transkripčních faktorů, zejména pak NFκB. Ten aktivuje transkripci cílových genů,

jejichž produkty se účastní prozánětlivé odpovědi. Chronický zánět je považován za jeden z rizikových faktorů při vzniku nádorových onemocnění včetně kolorektálního karcinomu. Abnormální aktivace transkripčního faktoru NFκB v některých typech solidních nádorů podporuje karcinogenezi, zejména zvyšováním produkce prozánětlivých cytokinů, anti-apoptických a růstových faktorů, nebo reaktivních forem kyslíku, které poškozují DNA (shrnutí v Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009; viz kap. 2.2.1).

Pomocí luciferázové reportérové eseje jsme ukázali, že delece *Hic1* v buňkách MEF způsobuje zvýšenou expresi *Tlr2*, což potvrzuje, že *Hic1* může potlačovat transkripci *Tlr2* (Obr. 5.2). V Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG byl nezávisle proveden experiment v lidských buňkách, kdy byly buňky HEK293 transfekovány *Tlr2* reportérem společně se vzrůstajícím množstvím plasmidu produkujícího *HIC1*. Vyšší exprese *HIC1* vedla ke snížení aktivity reportéru, což inverzně potvrzuje vztah mezi *HIC1* a *Tlr2* (Janeckova et al., 2015).

Lokalizovat expresi *TLR2* ve střevě komplikuje přítomnost mnoha typů buněk imunitního systému, např. makrofágů, dendritických buněk nebo T a B lymfocytů, které exprimují *TLR2*. Některé studie dokazují, že exprese *TLR2*, ačkoliv poměrně nízká, je zajišťována buňkami na spodku krypt tlustého střeva a směrem k vrcholu se snižuje (Furrie et al., 2005). U myši byla pozorována nízká exprese *Tlr2* u epiteliálních buněk *Lgr5*⁺ (Scheeren et al., 2014). V námi provedeném experimentu jsme za použití imunohistochemického barvení ve střevech nemutovaných myší pozorovali velmi nízký signál *Tlr2*. Ve střevě myší, u kterých došlo k podmíněné deleci *Hic1*, jsme ale pozorovali zvýšenou pozitivitu signálu *Tlr2* oproti střevu kontrolních myší (Obr. 5.3). To potvrzuje, že ve zdravé tkáni, může být hladina exprese *Tlr2* negativně regulována transkripčním faktorem *Hic1*. Zajímavé bylo, že nejsilnější pozitivitu *Tlr2* vykazovaly diferencované buňky, což se neshoduje s dříve publikovanými výsledky. Vzhledem k tomu, že exprese *Hic1* ve střevě je zajišťována zejména diferencovanými buňkami epitelu (Janeckova et al., 2015), potvrzuje toto zjištění dále vztah mezi *Hic1* a *Tlr2*. Mezi cílové geny *Hic1* patří mj. *Atoh1* a *Sox9*, které jsou ve střevě důležité pro diferenciaci sekretorních linií buněk (viz kapitoly 2.1.2.1, 2.1.2.2, 2.3). V Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG bylo potvrzeno, že ztráta *Hic1* ve střevě vede k mírnému zvýšení počtu Panethových, pohárkových a enteroendokrinních buněk (Janeckova et al., 2015). Analýza histologických řezů střeva myší po deleci *Hic1* neprokázala žádné

histopatologické změny (Obr. 5.3), což dokazuje, že samotná ztráta *Hic1* ve zdravém střevě nemá na jeho epitel velký vliv.

Dosud publikovaná pozorování naznačují, že během zánětlivých onemocnění dochází ke zvýšení hladiny TLR2 ve střevě, a to především v *lamina propria* a makrofázích (Hausmann et al., 2002). Další studie prokázala zvýšenou expresi *TLR2* i v epiteliálních buňkách střeva pacientů s ulcerózní kolitidou (Frolova et al., 2008). Naše výsledky jsou v souladu s těmito daty. K vyvolání kolitidy u myší jsme použili dextran sulfát sodný (DSS), který byl myším podáván po dobu 5 dní. DSS poškozuje buňky epitelu tlustého střeva a tím zároveň umožňuje bakteriím běžně přítomným v lumen střeva proniknout do *lamina propria*, což vede k akutní imunitní odpovědi (Nakanishi et al., 2014). Střeva myší s indukovanou kolitidou prokázala ve třech časových úsecích po skončení podávání DSS (2, 6, 9 dní) zvýšenou expresi *Tlr2* ve srovnání s kontrolami bez kolitidy, nejvíc však ve fázi, kdy epitel již regeneroval (Obr. 5.4.1). Střeva myší, u kterých došlo k podmíněné deleci genu *Hic1* a zároveň u nich byla vyvolána kolitida, prokazovala vyšší expresi *Tlr2* než střeva nemutovaných myší. Zároveň se oproti myším *Hic1*^{+/+} zvýšila i exprese prozánětlivých cytokinů – *Il1α*, *Il6*, *Tnfα* (Obr. 5.4.1). Navíc bylo v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG dokázáno, že ztráta *Hic1* způsobí zvýšení aktivity NFκB v myších i lidských buňkách (Janeckova et al., 2015).

Imunohistochemické barvení ukázalo, že ve fázi regenerace epitelu, je u myší s delecí *Hic1* přítomno více proliferujících buněk, než u myší „wild-type“ (Obr. 5.4, 9 dní). To může souviset s nedávno publikovanými výsledky, ve kterých bylo dokázáno, že myši se ztrátou *MyD88* prokazovaly sníženou schopnost regenerace při chemicky indukované kolitidě, než myši *MyD88*^{+/+} (Scheeren et al., 2014).

Laboratoř buněčné a vývojové biologie ÚMG se v budoucnosti bude dále soustředit na odhalení příčin zvýšené prozánětlivé signalizace *Tlr2*-NFκB po ztrátě *Hic1* ve střevě.

Chronický zánět je jedním z rizikových faktorů při vzniku i rozvoji karcinogenze. Mnoho prací ale prokázalo souvislost mezi signalizací *Tlr2* a rozvojem karcinogeneze nezávisle na přítomnosti zánětu. Rakoff-Nahoum a Medzhitov zkoumali vliv ztráty *MyD88* na tvorbu nádorů ve střevě. Homozygotní delece *MyD88* v myším kmenu *Apc*^{Min} měla pozitivní vliv na velikost a počet nádorů ve střevě ve srovnání s myšmi *Apc*^{Min}. U těchto myší byla navíc snížena exprese některých faktorů podporujících růst nádorů (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). Tato pozorování byla podpořena nedávno publikovanými daty, kdy myši

Apc^{Min} s homozygotní delecí *Tlr2* vykazovaly sníženou tvorbu nádorů a sníženou mortalitu ve srovnání s myši *Apc^{Min}* (Scheeren et al., 2014). Další studie prokázaly, že TLR2 produkovaný buňkami epitelu může podporovat proliferaci epiteliálních buněk, přežití i migraci, a to nezávisle na přítomnosti zánětu, prozánětlivých cytokinů, nebo imunitních buněk (Shaykhiev et al., 2008). Stejným způsobem může také podporovat proliferaci buněk karcinomu žaludku (Tye et al., 2012).

V této práci jsme porovnávali vliv heterozygotní a homozygotní ztráty *Hic1* na tvorbu nádorů střeva myši *Apc^{Min}*. Ukázaly jsme, že ztráta i jedné alely genu *Hic1* může u myši se zkráceným proteinem Apc podporovat růst nádorů. Navíc, ztráta obou alel *Hic1* zapříčiní tvorbu větších nádorů, než je tomu u myši jen se ztrátou jedné alely (Obr. 5.5). Vzhledem k dříve publikovaným výsledkům uvedeným výše je možné, že jedním z mnoha faktorů vedoucích ke zvýšené tvorbě nádorů u takto mutovaných myši může být právě zvýšená exprese *Tlr2* po ztrátě *Hic1*.

V další části práce jsme expresi cílových genů nově identifikovaných v myších buňkách testovali na lidských fibroblastech WI38, které mají přirozenou expresi *HIC1*. Za tím účelem jsme využili metodu RNA interference. Snížení exprese *HIC1* pomocí siRNA bohužel nepotvrdilo změnu exprese *TLR2* (ani ostatních genů), kterou jsme zaznamenali u myši (Obr. 5.6). To může být způsobeno zejména celkově nízkou expresí *TLR2* v buňkách WI38. V Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG bylo však dokázáno, že exprese *TLR2* je v závislosti na nepřítomnosti *HIC1* v lidských buňkách zvýšena, a to v buňkách BJ-Tert (imortalizovaných fibroblastech izolovaných z předkožky), které byly transfekovány pomocí siRNA proti mRNA genu *HIC1*. Chromatinová imunoprecipitace protilátkou proti *HIC1* provedená na chromatinu buněk BJ-Tert a následná digital droplet PCR potvrdily, že exprese *TLR2* je přímo potlačována *HIC1* (Janeckova et al., 2015). Buňky WI38 byly v našem experimentu (ale i v experimentech skupin, které dříve identifikovaly další cílové geny *HIC1*) použity z toho důvodu, že mají v porovnání s jinými nenádorovými buněčnými typy poměrně vysokou expresi *HIC1*.

K odhalení dalších cílových genů v buňkách WI38 byl v Laboratoři buněčné a vývojové biologie ÚMG proveden expresní čip za využití snížení exprese *HIC1* pomocí siRNA (Obr. 5.6.1). Mezi geny, jejichž exprese byla zvýšena po snížení exprese *HIC1*, byly přítomné i některé ostatními skupinami dříve identifikované. Vzhledem k tomu, že tyto geny nesplňovaly námi určené podmínky signifikance (nepublikovaná data), zabývali jsme se dále

jen geny, jejichž exprese byla změněna významně. Dalším ověřením vybraných genů identifikovaných pomocí expresního čipu jsme pomocí qRT-PCR odhalili 7 genů, jejichž transkripce by mohla být řízena represorem HIC1 (Obr. 5.6.2). Některé z těchto genů jsou přímo spojeny s řízením buněčného cyklu, nebo apoptózy, např. *BNIP3L* kóduje protein, který je součástí rodiny proteinů Bcl-2; *CCNG1* kóduje cyklin G1; E2F7 je součástí rodiny transkripčních faktorů E2F. Z těchto genů jsme se více zaměřili na *E2F7*, jehož exprese byla v našem experimentu zvýšena konzistentně. Luciferázová reportérová esej ukázala, že vyšší produkce HIC1 vede ke snížení exprese *E2F7*, což by potvrzovalo, že může být jedním z dalších cílových genů HIC1.

E2F7 patří do rodiny transkripčních faktorů E2F, které jsou známými regulátory buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy. Zajímavé je, že *HIC1* je přímým cílovým genem jednoho ze členů této rodiny – E2F1 (Jenal et al., 2009). Dodnes bylo objeveno osm genů kódujících proteiny, které se svou strukturou a funkcí dělí na aktivátory a represory transkripce. Toto rozdělení ale závisí spíše na buněčném kontextu, kde byla funkce proteinů zkoumána (shrnuto v Chen et al., 2009). E2F7 je transkripčním represorem, který se spolu s E2F8 odlišuje od ostatních proteinů této rodiny svou strukturou a schopností vázat DNA nezávisle na interakčním dimerizačním partnerovi a potlačovat tak transkripci genů (Logan et al., 2004). Úloha E2F7 v rozvoji karcinogeneze je poměrně kontroverzní. Vzhledem k tomu, že se jedná o represor zahrnutý v negativní regulaci genů spojených s proliferací (De Bruin et al., 2003), dalo by se očekávat, že zvýšení jeho exprese by nemuselo vést ke vzniku nádorů. Bylo dokázáno, že *E2F7* je stejně jako *HIC1* (Wales et al., 1995) cílovým genem p53 a dokáže zastoupit nefunkční protein RB (retinoblastom) v regulaci genů spojených s buněčným cyklem a mitózou, což dokazuje jeho tumor supresorovou funkci (Aksoy et al., 2012). Dále bylo publikováno, že zvýšená exprese E2F7 je spojena s delším přežitím pacientek s nádory vaječníku (Reimer et al., 2007). Některé studie ale ukazují, že v určitých podmínkách má zvýšená produkce E2F7 spíše opačný vliv. V regenerujících jaterních buňkách byla vyšší exprese E2F7 zodpovědná za vyšší aktivaci genu *hTERT* (telomerase reverse transcriptase), jehož produkt má schopnost prodlužovat telomery, což je zároveň jeden ze znaků karcinogeneze (Sirma et al., 2011). Jiná studie ukázala, že E2f7 je spolu s E2f8 zodpovědný za aktivaci transkripce genů spojených s angiogenezí během embryonálního vývoje (Weijts et al., 2012).

Bez ohledu na funkci transkripčního faktoru E2F7 je nutno zmínit, že HIC1 není represorem pouze aktivátorů buněčného cyklu jako je *CCND1*, kódujícího cyklin D1 (Van Rechem et al., 2010), ale mezi jeho cílové geny patří i geny kódující inhibitory cyklin

dependentních kináz p57 (Van Rechem et al., 2010) a p21 (Dehennaut et al., 2013). To může působit rozporuplně. Účast proteinu HIC1 v regulaci buněčného cyklu však není striktně vázána na jednotlivé fáze buněčného cyklu, ale přispívá spíše k jejich vzájemnému sladění.

Bylo by jistě zajímavé v budoucnu ještě rozšířit znalosti o funkci E2F7. Laboratoř buněčné a vývojové biologie ÚMG se v současnosti zabývá otázkou, zda je transkripce *E2F7* skutečně regulována nádorovým supresorem HIC1 a jak tento vztah ovlivňuje buněčný cyklus a odpověď na poškození DNA. Zároveň bychom chtěli rozvinout naši hypotézu, že epigenetické umlčování exprese *HIC1* nebo jeho ztráta může vést k rozvoji nádorů ve střevě mimo jiné díky deregulaci exprese *TLR2* a s tím spojené pro-nádorové signalizaci.

Odhalení dalších genů regulovaných nádorovým supresorem HIC1 a definování jejich role v procesech spojených s karcinogenezí by vedlo k lepšímu porozumění molekulárních mechanismů, které jsou příčinou vzniku a rozvoje nádorových onemocnění. Tyto znalosti by zároveň mohly být využity pro užití epigenetické protinádorové terapie.

7. Shrnutí

Na základě výsledků získaných v rámci této práce jsme učinili následující závěry:

- *Toll-like receptor 2* je přímým cílovým genem nádorového supresoru Hypermethylated in cancer 1.
- Exprese proteinu Tlr2 je po inaktivaci *Hic1* ve střevě zvýšena a je přítomna zejména v diferencovaných buňkách.
- Ztráta *Hic1* ve střevě pozitivně ovlivňuje regeneraci epitelu po chemicky indukované kolitidě.
- Delece obou alel genu *Hic1* má pozitivní vliv na růst nádorů ve střevě s abnormálně aktivovanou signální dráhou Wnt.
- Cílové geny a změna jejich exprese se mohou lišit v závislosti na buněčném typu.
- Snížení exprese HIC1 v lidských fibroblastech WI38 zvyšuje expresi transkripčního faktoru *E2F7*, naopak vyšší produkce HIC1 vede ke snížení exprese *E2F7*.

8. Reference

- Aksoy, O., Chicas, A., Zeng, T., Zhao, Z., McCurrach, M., Wang, X., & Lowe, S. W. (2012). The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes Dev.*, *26*(14), 1546–57.
- Asfaha, S., Hayakawa, Y., Muley, A., Stokes, S., Graham, T. A., Ericksen, R. E., Westphalen, C. B., von Burstin, J., ... Wang, T. C. (2015). Krt19(+)/Lgr5(-) Cells Are Radioresistant Cancer-Initiating Stem Cells in the Colon and Intestine. *Cell Stem Cell*, *16*(6), 627–38.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, *15*(1), 19–33.
- Barker, N., Bartfeld, S., & Clevers, H. (2010). Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, *7*(6), 656–70.
- Barker, N., Ridgway, R. a, van Es, J. H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A. R., ... Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, *457*(7229), 608–11.
- Barker, N., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev.*, *22*(14), 1856–64.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., ... Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, *449*(25), 1003–7.
- Battle, E., Henderson, J., & Begthel, H. (2002). β -Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, *111*(2), 251–63.
- Baylin, S. B., & Ohm, J. E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, *6*(2), 107–16.
- Bettington, M., Walker, N., Clouston, A., Brown, I., Leggett, B., & Whitehall, V. (2013). The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*, *62*(3), 367–86.
- Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology*, *9*(5), 356–68.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C., Hsieh, J., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J., & Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*, *382*(6588), 225–30.
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2073–87.
- Boulay, G., Malaquin, N., Loison, I., Foveau, B., Van Rechem, C., Rood, B. R., Pourtier, A., & Leprince, D. (2012). Loss of Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1) in breast cancer cells contributes to stress-induced migration and invasion through β -2 adrenergic receptor (ADRB2) misregulation. *J Biol Chem*, *287*(8), 5379–89.
- Breynaert, C., Vermeire, S., Rutgeerts, P., & Van Assche, G. (2008). Dysplasia and colorectal cancer in inflammatory bowel disease: a result of inflammation or an intrinsic risk? *Acta Gastroenterol Belg*, *71*(4), 367–72.
- Briggs, K. J., Corcoran-Schwartz, I. M., Zhang, W., Harcke, T., Devereux, W. L., Baylin, S. B., Eberhart, C. G., & Watkins, D. N. (2008). Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev.*, *22*(6), 770–85.
- Briones, V. R., Chen, S., Riegel, A. T., & Lechleider, R. J. (2006). Mechanism of fibroblast growth factor-binding protein 1 repression by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun*, *345*(2), 595–601.

- Britschgi, C., Rizzi, M., Grob, T. J., Tschan, M. P., Hügli, B., Reddy, V. a, Andres, A.-C., Torbett, B. E., ... Fey, M. F. (2006). Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1. *Oncogene*, *25*(14), 2030–9.
- Buczacki, S. J. A., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., & Winton, D. J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*, *495*(7439), 65–9.
- Carter, M. G., Johns, M. A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M. C., Mankowski, J. L., Donovan, D. M., & Baylin, S. B. (2000). Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene Hic1 exhibit developmental defects of structures affected in the Miller–Dieker syndrome. *Hum Mol Genet*, *9*(3), 413–9.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, *30*(7), 1073–81.
- Cox, B. C., Liu, Z., Lagarde, M. M. M., & Zuo, J. (2012). Conditional Gene Expression in the Mouse Inner Ear Using Cre-loxP. *J Assoc Res Otolaryngol*, *13*(3), 295–322.
- Danese, S., & Mantovani, A. (2010). Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene*, *29*(23), 3313–23.
- De Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., & Leone, G. (2003). Identification and Characterization of E2F7, a Novel Mammalian E2F Family Member Capable of Blocking Cellular Proliferation. *J Biol Chem*, *278*(43), 42041–9.
- Dehennaut, V., & Leprince, D. (2009). Implication of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) in the DNA damage response. *Bull Cancer*, *96*(11), E66–72.
- Dehennaut, V., Loison, I., Boulay, G., Van Rechem, C., & Leprince, D. (2013). Identification of p21 (CIP1/WAF1) as a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochem Biophys Res Commun*, *430*(1), 49–53.
- el Marjou, F., Janssen, K.-P., Chang, B. H.-J., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., ... Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*, *39*(3), 186–93.
- Fafilek, B., Krausova, M., Vojtechova, M., Pospichalova, V., Tumova, L., Sloncova, E., Huranova, M., Stancikova, J., ... Korinek, V. (2013). Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with Lgr5 to inhibit Wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology*, *144*(2), 381–91.
- Fearon, E., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759–67.
- Flier, L. G. van der, Clevers, H., van der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*, *71*, 241–60.
- Formica, V., Cereda, V., Nardecchia, A., Tesauro, M., & Roselli, M. (2014). Immune reaction and colorectal cancer: Friends or foes? *World J Gastroenterol*, *20*(35), 12407–19.
- Foveau, B., Boulay, G., Pinte, S., Van Rechem, C., Rood, B. R., & Leprince, D. (2012). The receptor tyrosine kinase EphA2 is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (HIC1). *J Biol Chem*, *287*(8), 5366–78.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, *435*(7044), 964–8.
- Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., & Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem*, *56*(3), 267–74.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., & Macfarlane, G. T. (2005). Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, *115*(4), 565–74.

- Gerbe, F., van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N. F., ... Jay, P. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*, *192*(5), 767–80.
- Gribble, F. M., & Reimann, F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol*, *78*, 277–99.
- Grimm, C., Spörle, R., Schmid, T., Adler, I., Adamski, J., Schughart, K., & Graw, J. (1999). Isolation and embryonic expression of the novel mouse gene *Hic1*, the homologue of HIC1, a candidate gene for the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet*, *8*(4), 697–710.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, *140*(6), 883–99.
- Guerardel, C., Deltour, S., Pinte, S., Monte, D., Begue, A., Godwin, K., & Leprince, D. (2001). Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J Biol Chem*, *276*(5), 3078–89.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–74.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spottl, T., Andus, T., Scholmerich, J., Herfarth, H., ... Rogler, G. (2002). Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*, *122*(7), 1987–2000.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawal, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, *281*(5392), 1509–12.
- He, X. C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D. H., Tian, Q., Zeng, X., ... Li, L. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nat Genet*, *36*(10), 1117–21.
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., & Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*, *9*(11), 785–97.
- Chen, W. Y., Wang, D. H., Yen, R. C., Luo, J., Gu, W., & Baylin, S. B. (2005). Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell*, *123*(3), 437–48.
- Chen, W. Y., Zeng, X., Carter, M. G., Morrell, C. N., Chiu Yen, R.-W., Esteller, M., Watkins, D. N., Herman, J. G., ... Baylin, S. B. (2003). Heterozygous disruption of *Hic1* predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet*, *33*(2), 197–202.
- Cheng, H., & Leblond, C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat*, *141*(4), 461–79.
- Izkovitz, S., Lyubimova, A., Blat, I. C., Maynard, M., van Es, J., Lees, J., Jacks, T., Clevers, H., & van Oudenaarden, A. (2012). Single-molecule transcript counting of stem-cell markers in the mouse intestine. *Nat Cell Biol*, *14*(1), 106–14.
- Janeckova, L., Pospichalova, V., Fafilek, B., Vojtechova, M., Tureckova, J., Dobes, J., Dubuissez, M., Leprince, D., ... Korinek, V. (2015). HIC1 Tumor Suppressor Loss Potentiates TLR2/NF- κ B Signaling and Promotes Tissue Damage-associated Tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, *13*(7), 1139–48.
- Jass, J. R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, *50*(1), 113–30.
- Jenal, M., Britschgi, C., Fey, M. F., & Tschan, M. P. (2010). Inactivation of the hypermethylated in cancer 1 tumour suppressor - not just a question of promoter hypermethylation? *Swiss Med Wkly*, *140*(November), 1–7.
- Jenal, M., Trinh, E., Britschgi, C., Britschgi, A., Roh, V., Vorburger, S. a, Tobler, A., Leprince, D., ... Tschan, M. P. (2009). The tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1 is transcriptionally regulated by E2F1. *Mol Cancer Res*, *7*(6), 916–22.

- Kim, J. J., & Khan, W. I. (2013). Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections. *Pathogens*, 2(1), 55–70.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159–70.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., & Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*, 19(4), 379–83.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*, 275(5307), 1784–7.
- Kosinski, C., Li, V. S. W., Chan, A. S. Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., Chan, T. L., Mifflin, R. C., ... Chen, X. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(39), 15418–23.
- Kosinski, C., Stange, D. E., Xu, C., Chan, A. S., Ho, C., Yuen, S. T., Mifflin, R. C., Powell, D. W., ... Chen, X. (2010). Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development. *Gastroenterology*, 139(3), 893–903.
- Krausova, M., & Korinek, V. (2012). Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue. *Neoplasma*, 59(6), 708–18.
- Krausova, M., & Korinek, V. (2014). Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal*, 26(3), 570–9.
- Lal, G., & Gallinger, S. (2000). Familial adenomatous polyposis. *Semin Surg Oncol*, 18(4), 314–23.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–9.
- Lièvre, A., Blons, H., & Laurent-Puig, P. (2010). Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene*, 29(21), 3033–43.
- Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781–810.
- Logan, N., Delavaine, L., Graham, A., Reilly, C., Wilson, J., Brummelkamp, T. R., Hijmans, E. M., Bernards, R., & La Thangue, N. B. (2004). E2F-7: a distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene*, 23(30), 5138–50.
- Lüchtenborg, M., Weijenberg, M. P., Wark, P. a, Saritas, A. M., Roemen, G. M. J. M., van Muijen, G. N. P., de Bruïne, A. P., van den Brandt, P. A., & de Goeij, A. F. P. M. (2005). Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, 5(160).
- Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., & Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol*, 6(4), 666–77.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17(1), 9–26.
- Midwood, K. S., & Piccinini, A. M. (2010). DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*, 2010.
- Miyaki, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Enomoto, M., Igari, T., Tanaka, K., Muraoka, M., Takahashi, H., ... Fukayama, M. (1994). Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res*, 54(11), 3011–20.
- Mohammad, H. P., Zhang, W., Prevas, H. S., Leadem, B. R., Zhang, M., Herman, J. G., Hooker, C. M., Watkins, D. N., ... Baylin, S. B. (2011). Loss of a single Hic1 allele accelerates polyp formation in Apc(Δ 716) mice. *Oncogene*, 30(23), 2659–69.

- Montgomery, R. K., Carlone, D. L., Richmond, C. A., Farilla, L., Kranendonk, M. E. G., Henderson, D. E., Baffour-Awuah, N. Y., Ambruzs, D. M., ... Breault, D. T. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, *108*(1), 179–84.
- Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J. H., Hamilton, S. R., Adams, H. P., Zhang, J., Clevers, H., & de Crombrughe, B. (2007). SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology*, *133*(2), 539–46.
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997). Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC. *Science*, *275*(5307), 1787–90.
- Muñoz, J., Stange, D. E., Schepers, A. G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K. S., ... Clevers, H. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent “+4” cell markers. *EMBO J*, *31*(14), 3079–91.
- Nakanishi, Y., Sato, T., & Ohteki, T. (2015). Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunol*, *8*(1), 152–60.
- Pinte, S., Guérardel, C., Deltour-Balerdi, S., Godwin, A. K., & Leprince, D. (2004). Identification of a second G-C-rich promoter conserved in the human, murine and rat tumor suppressor genes HIC1. *Oncogene*, *23*(22), 4023–31.
- Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Rood, B. R., Guérardel, C., & Leprince, D. (2004). 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*, *279*(37), 38313–24.
- Pospichalova, V., Tureckova, J., Fafilek, B., Vojtechova, M., Krausova, M., Lukas, J., Sloncova, E., Takacova, S., ... Korinek, V. (2011). Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumor suppressor gene. *Genesis*, *49*(3), 142–51.
- Potten, C. S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *353*(1370), 821–30.
- Potten, C. S., Kovacs, L., & Hamilton, E. (1974). Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinetics*, *7*, 271–83.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, *359*(6392), 235–7.
- Rakoff-Nahoum, S., & Medzhitov, R. (2007). Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science*, *317*(5834), 124–7.
- Rakoff-Nahoum, S., & Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*, *9*(1), 57–63.
- Reimer, D., Sadr, S., Wiedemair, A., Stadlmann, S., Concini, N., Hofstetter, G., Müller-Holzner, E., Marth, C., & Zeimet, A. G. (2007). Clinical relevance of E2F family members in ovarian cancer - an evaluation in a training set of 77 patients. *Clin Cancer Res*, *13*(1), 144–51.
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, *434*(7035), 843–50.
- Rood, B. R., & Leprince, D. (2013). Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets*, *17*(7), 811–27.
- Rothenberg, M. E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J. J., Dalerba, P., Scheeren, F., Lobo, N., Kulkarni, S., ... Clarke, M. F. (2012). Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterology*, *142*(5), 1195–205.
- Rubin, D. C., Shaker, A., & Levin, M. S. (2012). Chronic intestinal inflammation: Inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front Immunol*, *3*(107).

- Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet*, *40*(7), 915–20.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., ... Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, *469*(7330), 415–8.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*, *14*(4), 381–92.
- Shaykhiev, R., Behr, J., & Bals, R. (2008). Microbial patterns signaling via toll-like receptors 2 and 5 contribute to epithelial repair, growth and survival. *PLoS One*, *3*(1).
- Scheeren, F. a, Kuo, A. H., van Weele, L. J., Cai, S., Glykofridis, I., Sikandar, S. S., Zabala, M., Qian, D., ... Clarke, M. F. (2014). A cell-intrinsic role for TLR2-MYD88 in intestinal and breast epithelia and oncogenesis. *Nat Cell Biol*, *16*(12), 1238–48.
- Schepers, A., & Clevers, H. (2012). Wnt Signaling, Stem Cells, and Cancer of the Gastrointestinal Tract. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(4).
- Sirma, H., Kumar, M., Meena, J. K., Witt, B., Weise, J. M., Lechel, A., Ande, S., Sakk, V., ... Gnes, C. (2011). The promoter of human telomerase reverse transcriptase is activated during liver regeneration and hepatocyte proliferation. *Gastroenterology*, *141*(1), 326–37.
- Söreide, K., Janssen, E. a M., Söiland, H., Körner, H., & Baak, J. P. a. (2006). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*, *93*(4), 395–406.
- Syngal, S., Fox, E. A., Li, C., Dovidio, M., Eng, C., Kolodner, R. D., & Garber, J. E. (1999). Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*, *282*(3), 247–53.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2101–14.
- Tetsu, O., & McCormick, F. (1999). β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, *398*(6726), 422–6.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, *478*, 255–9.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J.-P. J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, *96*(15), 8681–6.
- Tye, H., Kennedy, C. L., Najdovska, M., McLeod, L., McCormack, W., Hughes, N., Dev, A., Sievert, W., ... Jenkins, B. J. (2012). STAT3-Driven Upregulation of TLR2 Promotes Gastric Tumorigenesis Independent of Tumor Inflammation. *Cancer Cell*, *22*(4), 466–478.
- Ullman, T. A., & Itzkowitz, S. H. (2011). Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*, *140*(6), 1807–16.
- Valenta, T., Lukas, J., Doubravska, L., Fafulek, B., & Korinek, V. (2006). HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and β -catenin to the nuclear bodies. *EMBO J*, *25*(11), 2326–37.
- van der Flier, L. G., Haegerbarth, A., Stange, D. E., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2009). OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology*, *137*(1), 15–17.
- van der Flier, L. G., van Gijn, M. E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegerbarth, A., Stange, D. E., Begthel, H., van den Born, M., ... Clevers, H. (2009). Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. *Cell*, *136*(5), 903–12.
- van Es, J. H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A. N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., ... Clevers, H. (2012). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol*, *14*(10), 1099–104.

- Van Rechem, C., Boulay, G., Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Guérardel, C., & Leprince, D. (2010). Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Mol Cell Biol*, *30*(16), 4045–59.
- Van Rechem, C., Rood, B. R., Touka, M., Pinte, S., Jenal, M., Guérardel, C., Ramsey, K., Monté, D., ... Leprince, D. (2009). Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *J Biol Chem*, *284*(31), 20927–35.
- Vilgelm, a E., Hong, S.-M., Washington, M. K., Wei, J., Chen, H., El-Rifai, W., & Zaika, A. (2010). Characterization of Δ Np73 expression and regulation in gastric and esophageal tumors. *Oncogene*, *29*(43), 5861–8.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends iGenet*, *9*(4), 138–41.
- Wales, M. M., Biel, M. A., Deiry, W. El, Nelkin, B. D., Issa, J.-P., Cavenee, W. K., Kuerbitz, S. J., & Baylin, S. B. (1995). p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med*, *1*(6), 570–7.
- Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O’Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., & DiNardo, S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, *407*(6803), 527–30.
- Weijts, B. G. M. W., Bakker, W. J., Cornelissen, P. W. A., Liang, K.-H., Schaftenaar, F. H., Westendorp, B., de Wolf, C. A. C. M. T., Paciejewska, M., ... de Bruin, A. (2012). E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J*, *31*(19), 3871–84.
- West, N. R., McCuaig, S., Franchini, F., & Powrie, F. (2015). Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*, *15*(10), 615–29.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., & Neurath, M. F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, *2*(3), 541–6.
- Yan, K., Chia, L., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J. Y., Su, N., Luo, Y., ... Kuo, C. J. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, *109*(2), 466–71.
- Zhang, W., Zeng, X., Briggs, K. J., Beaty, R., Simons, B., Chiu Yen, R.-W., Tyler, M. a, Tsai, H.-C., ... Watkins, D. N. (2010). A potential tumor suppressor role for Hic1 in breast cancer through transcriptional repression of ephrin-A1. *Oncogene*, *29*(17), 2467–76.
- Zhong, B., Ma, H. Y., Yang, Q., Gu, F. R., Yin, G. Q., & Xia, C. M. (2008). Decrease in toll-like receptors 2 and 4 in the spleen of mouse with endotoxic tolerance. *Inflamm Res*, *57*(6), 252–9.