

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické programy

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Tereza Müllerová**

Transkripční faktor Tcf4 v obnově střevního epitelu a patologii

Tcf4 transcription factor in the intestinal epithelium renewal and pathology

Bakalářská práce

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

Praha, 2023

### **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, 2.5. 2023

.....

Tereza Müllerová

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Lucii Janečkové, Ph.D. za její neochvějnou podporu při psaní této práce i v laboratoři. Jsem jí moc vděčná za její ochotu ukázat mi něco nového pokaždé, když přijdu. Také bych ráda poděkovala mým kamarádům, příteli a rodině za jejich podporu a pomoc. A nakonec bych chtěla poděkovat mému tátovi, za jeho nekončící technické připomínky, a mé mámě za to, že mě povzbudila vždy když jsem narazila na problém.

## **Abstrakt**

TCF4 (z angl. T-Cell Factor 4, někdy také TCF7L2) je významným efektozem kanonické signální dráhy Wnt. Je produkován v mnoha různých izoformách, jejichž exprese bývá tkáňově specifická a jejichž funkce se mnohdy diametrálně liší. Ve střevě je TCF4 klíčovým faktorem při regeneraci epitelu a udržování homeostázy kmenových buněk. Jeho deplece způsobuje ztrátu proliferujícího kompartmentu krypt a úplný rozpad architektury střevní sliznice. Procesy ve kterých působí jsou tedy stěžejní a musí být silně regulované pomocí signální dráhy Wnt. Poruchy v expresi či alternativním sestřihu TCF4 často vedou k rozsáhlé škále komplexních patologií jako jsou rakovina tlustého střeva, ileální Crohnova choroba a diabetes mellitus 2. typu.

**Klíčová slova:** TCF4, intestinální kmenové buňky, střevní obnova, kolorektální rakovina, Crohnova choroba, diabetes mellitus 2. typu

## **Abstract**

TCF4 (T-Cell Factor 4, sometimes also TCF7L2) is an important effector of the canonical Wnt signalling pathway. The transcription factor is produced in many different isoforms with tissue-specific expression and diametrically opposing functions. In the intestine, TCF4 is a key factor in epithelial regeneration and maintenance of stem cell homeostasis. Its depletion causes loss of the proliferating crypt compartment and complete breakdown of the intestinal mucosal architecture. The processes in which it acts are therefore vital and must be strongly regulated by the Wnt signalling pathway. Disturbances in TCF4 expression or alternative splicing often lead to a wide range of complex pathologies such as colon cancer, ileal Crohn's disease and type 2 diabetes mellitus.

**Keywords:** TCF4, intestinal stem cells, intestinal renewal, colorectal cancer, colorectal cancer, Crohn's disease, type 2 diabetes mellitus

## Seznam použitých zkratek

APC	Adenomatous Polyposis Coli
Axin	Axis inhibition
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
CamKII	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II
CBC	Crypt Base Columnar
C-clamp	Cysteine clamp
CD	Crohn's disease
CK1 $\gamma$	Casein Kinase 1 $\gamma$
CRARF	Sekvence aminokyselin; Cys-Arg-Ala-Arg-Phe
CRALF	Sekvence aminokyselin; Cys-Arg-Ala-Leu-Phe
CRC	Colorectal Cancer Cells
CRD	Cystein Rich Domain
Cre	Cyclization recombination
CtBP	C-terminal Binding Protein
DSC	Deep Crypt Secretory
Dsh	Dishevelled
EEC	Enteroendocrine Cell
EphB	Ephrin type-B
Fz	Frizzled
GC	Goblet Cell
GCG	Glucagon
GIP	Gastrický inhibiční polypeptid
GLP1	Glucagon-like peptide-1
GLP2	Glucagon-like peptide-2

GLP1R	GLP1 rekombinantní
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HECA	Headcase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMG	High Mobility Group
IBD	Inflammatory Bowel Disease
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LoxP	locus of X-over of P1
LRP	Low-density lipoprotein Receptor-related Protein
NLS	Nuclear Localisation Signal
PARP1	Poly (ADP-ribose) Polymerase 1
PCP	Planar Cell Polarity
RH0A	Ras homolog family member A
Rspo1	R-Spondin 1
ROR2	Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
RYK	Receptor-like Tyrosine Kinase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T2DM	Diabetes Mellitus 2. typu
TA	Transit Amplyfying
TCF	T-Cell Factor
UC	Ulcerative colitis
Wg	Wingless
WLS	Wntless (receptor a přenašeč Wnt proteinů v buňce)
WNT	Wingless-related Integration Site

WRE

Wnt response element

$\beta$ -cat

$\beta$  catenin-binding domain

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Anatomie střeva.....	2
2.1. Buněčné typy.....	2
1.1.1. Enterocyty.....	6
1.1.2. Enteroendokrinní buňky.....	6
1.1.3. Pohárkové buňky.....	6
1.1.4. Panethovy buňky.....	6
1.1.5. Tuft buňky.....	7
1.1.6. M-buňky.....	7
1.1.7. Cup buňky.....	7
3. Signální dráha Wnt.....	7
3.1. Wnt proteiny a sekrece.....	8
3.2. Signální kaskáda v buňce odpovídající na Wnt signál.....	10
3.3. $\beta$ -katenin destrukční komplex.....	11
3.4. Genová exprese.....	12
3.4.1. TCF/LEF rodina.....	13
4. Transkripční faktor TCF4.....	15
5. TCF4 v obnově střevního epitelu.....	17
6. TCF4 v patologiích.....	19
6.1. Rakovina tlustého střeva.....	19
6.2. Crohnova choroba.....	20
6.3. Diabetes mellitus 2. typu.....	22
7. Závěr.....	25
8. Seznam použité literatury.....	27

## 1. Úvod

Střevní epitel je komplexní struktura plnicí mnoho funkcí od absorpce živin po ochranu před patogenní mikroflórou. Jedná se o nejrychleji cyklující tkáň v lidském těle – většina buněk v ní je obnovena do tří až čtyř dní. K zachování stálého vnitřního prostředí je vyžadována delikátní a přísně řízená signalizace. Zde působí vysoce konzervovaná signální dráha Wnt, která hraje důležitou roli v embryonálním vývoji i homeostáze dospělých tkání. Buňky cílových tkání odpovídají na signály Wnt a spouštějí vnitřní sled událostí, který je – v případě kanonické dráhy – zakončen na efektoech z rodiny TCF/LEF (z angl. T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) proteinů. TCF/LEF jsou klíčové k regulaci dráhy Wnt. Váží se na DNA v blízkosti specifických cílových genů a ovlivňují jejich expresi. Skrze tyto geny napomáhají udržovat kmenové buňky pomocí regulace buněčného cyklu, udávají jejich buněčné osudy a určují jejich lokalizaci v tkáních.

TCF4 je transkripčním faktorem z rodiny TCF/LEF, který je nejhojnější ve střevě a stal se tak atraktivním předmětem studia jak v intestinálně-vázaných patologiích, tak ve výzkumu mechanismů střevní regenerace. V uplynulých desetiletích bylo zjištěno, že TCF4 je stěžejní pro udržování proliferačního kompartmentu krypty a kryptové architektury. V jeho nepřítomnosti se komplikované střevní struktury rozpadají a diferencované buněčné typy ztrácejí své buněčné programy a schopnost lokalizace na ose krypta-klk. Vyřazení TCF4 z funkce je z tohoto důvodu neonatálně letální. Naopak při konstitutivní aktivaci TCF4 a jím ovládaných genů dochází ke tvorbě adenomů na střevní sliznici. Nemůže tak být překvapením, že TCF4 má silnou souvislost s etiopatogenezí kolorektálního karcinomu. Ztráty buněčných programů indukované dysfunkcí TCF4, jmenovitě v Panethových a enteroendokrinních buňkách, pak vedou k patologiím jako je ileální Crohnova choroba a diabetes mellitus 2. typu.

Cílem této práce je popsat střevní epitel se zaměřením na jeho proliferační kompartment, představit jeho regenerační schopnosti a shrnout jak jsou ovlivněné transkripčním faktorem TCF4. Dále je práce zaměřena na tři vybrané patologie (kolorektální karcinom, Crohnova choroba, diabetes mellitus 2. typu), které mají silnou asociaci s defekty v regulaci či působení TCF4 a pokusí se vysvětlit, jak může TCF4 ovlivnit vznik a progresi těchto komplexních nemocí.

## 2. Anatomie střeva

Střevo (lat. *intestinum*) je část trávicího systému, která se nachází mezi žaludkem a konečníkem – vede tedy od vrátníku po řitní otvor. Jeho hlavní funkcí je trávení a vstřebávání živin z potravy a vylučování odpadních látek z těla.

Histologicky se trávicí trubice skládá ze čtyř hlavních vrstev; sliznice (*tunica mucosa*), podslizniční vazivo (*tunica submucosa*), svalová vrstva (*tunica muscularis externa*) a povrchová vrstva (*tunica externa*). Sliznice, která odděluje lumen od vnitřního prostředí těla, vykazuje největší variabilitu povrchu v různých oblastech trávicí dutiny. Je dále vnitřně rozdělena na tři vrstvy;

- epiteliální, která slouží jako mechanická ochrana i resorpční vrstva v závislosti na lokaci
- vazivová lamina propria, která obsahuje cévy a žlázy
- vrstva hladkého svalstva, zprostředkující peristaltické pohyby.

Střevo se obecně dělí na tenké (*intestinum tenue*) a tlusté (*intestinum crassum*). Tenké střevo navazuje na vrátník, je delší a tenčí než tlusté střevo. Skládá se ze tří částí; dvanáctník (*duodenum*), lačník (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*), které na sebe navazují ve vypsáném pořadí. Jeho hlavní funkcí je absorpce živin z potravy. Střevo je ke své funkci přizpůsobeno ohromným navýšením svého povrchu kruhovými řasami (*plicae circulares*), klky, kryptami a mikroklyky na apikální straně resorpčních střevních buněk. U člověka tvoří celkový povrch přibližně 4500 m<sup>2</sup>. Shrnuto v; (Kierszenbaum, 2007).

Tlusté střevo je konečný úsek trávicí trubice. Je kratší a širší než tenké střevo a rovněž se skládá ze tří částí; slepého střeva (*intestinum caecum*), tračníku (*colon*) a konečníku (*rectum*). Tračník lze ještě dále dělit na tračník vzestupný (*c. ascendens*), příčný (*c. transversum*), sestupný (*c. descendens*) a esovitou kličku (*c. sigmoideum*). V tlustém střevě dochází k absorpci zbytku živin, které nebyly stráveny v tenkém střevě (hlavně vitamíny a minerály), a vody. Během průchodu je tekutá, kašovitá trávenina (*chymus*) z tenkého střeva zahušťována a její obsah je formován ve stolici. Kruhové řasy a klky zde chybí. Shrnuto v; (Kierszenbaum, 2007).

### 2.1. Buněčné typy

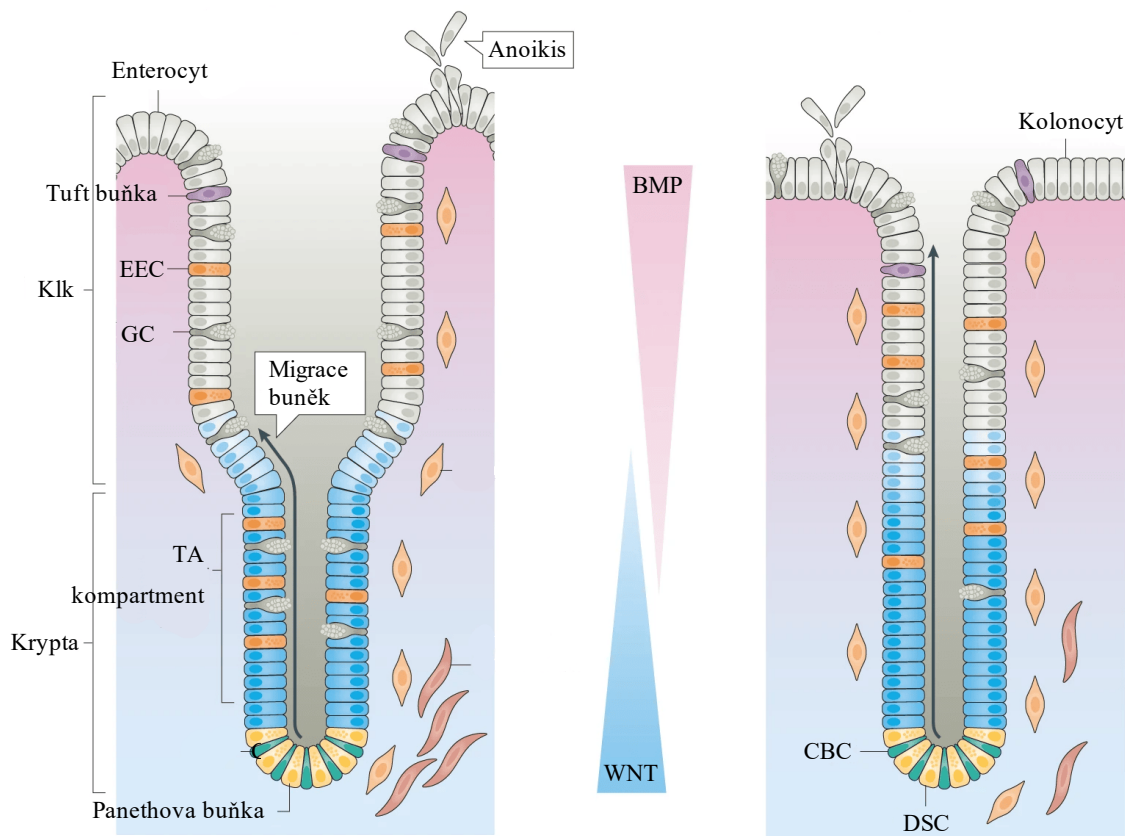
Epitely tenkého i tlustého střeva patří mezi nejrychleji obnovované tkáně v těle (obrat za 3-5 dní pro většinu buněčných typů v epitelu, Panethovy buňky vydrží déle; 6-8 týdnů). Epitel je obměňován díky dělení, diferenciaci, migraci a ztrátě buněčné adheze buněk (anoikis) pocházejících ze sloupcovitých kmenových buněk v bázích krypt (CBC; Crypt-Base Columnar

Cell). CBC jsou charakteristické svým povrchovým receptorem Lgr5 (Barker, et al., 2007) (který je důležitý pro vazbu R-Spondinů, agonistů signální dráhy Wnt) a vysokou telomerázovou aktivitou. I jediná CBC buňka je schopna generovat organoidy obsahující všechny intestinální buněčné linie (Sato, et al., 2009), efektivita tohoto procesu je ale závislá na přítomnosti Panethových buněk, které dodávají antimikrobiální ochranu i signalizační faktory kmenovým buňkám. Shrnutí v; (Beumer & Clevers, 2021).

Organizace buněk v kryptách (obr. č. 1) je ale složitější než by rozdělení na CBC a jejich linie ukazovalo. Hierarchie kmenových buněk je komplexní a bez ostrých hranic. Mnoho novějších studií navíc dokazuje, že všechny buňky krypty – jak enterocyty (Tetteh, et al., 2016), tak sekretorní progenitory (Es, et al., 2012a), (Jadhav, et al., 2017) – jsou vysoce plastické a schopné transformace v Lgr5+ buňky, pokud je střevní epitel poškozen.

Na dně krypt se nachází zhruba 15 CBC (rozpoznatelných díky přítomnosti receptorů Lgr5), které jsou v kontaktu s Panethovými buňkami. CBC rychle prochází buněčným cyklem a produkují velké množství dceřiných buněk. V případě ztráty dělicího kompartmentu po poškození (např. iradiací nebo difterickým toxinem) jsou ale rychle nahrazeny *de novo* vzniklými Lgr5+ buňkami (Tian, et al., 2011).

Experimenty sledující iradiaci a následnou regeneraci střevního epitelu vedly k objevu druhé populace buněk, o kterých se myslelo, že se jedná o kmenové buňky s pomalejším buněčným cyklem (jakousi rezervu Lgr5+ kmenových buněk). Buňky byly definovány přítomností Bmi1 (proteinu represorového komplexu Polycomb, který se podílí na umlčování genů a regulaci chromatinových struktur) (Yan, et al., 2011). Přítomnost Bmi1 tuto záhadnou populaci umístila na pozici +4 (tzn. pozice okamžitě nad poslední Panethovou buňkou) v proximální části tenkého střeva. Bmi1+ buňky zdánlivě reagovaly na poškození střevní sliznice rychlým dělením a nahrazením ztráty Lgr5+ buněk. Záhada Bmi1+ buněk byla nakonec vyřešena pomocí sledování nediferenciovaných, nedělicích se buněk na bázi krypty. Buňky byly identifikovány jako prekurzory Panethových a enteroendokrinních buněk, které však nijak nepřispívají k obnově tkáně a postupně vymizí (Buczacki, et al., 2013).



Obrázek 1: Histologie tenkého a tlustého střeva (Beumer & Clevers, 2021)

Obr.1 | **A** | Nalevo se nachází epitel tenkého střeva; CBC (z angl. Crypt-Base Columnar, kmenové buňky), TA-kompartiment (z angl. Transit Amplifying Compartment, produkující enterocyty), GC (z angl. Goblet Cell, pohárková buňka), EEC (z angl. Enteroendocrine Cell, enteroendokrinní buňka). | **B** | Napravo se nachází epitel tlustého střeva; DCS (z angl. Deep Crypt Secretory Cell, alternativa k Panethovým buňkám v tlustém střevě) (Beumer & Clevers, 2021).

To však vyvolává otázku, odkud se epitel regeneruje po poškození? V novějších studiích bylo zjištěno, že při absenci Panethových buněk se mezi CBC objevují enteroendokrinní a tuft buňky a doplňují tak chybějící Notch signalizaci (pro kterou je nutný mezibuněčný kontakt) (Es, et al., 2019). Za homeostatických podmínek, jsou právě enteroendokrinní buňky druhými nejčastějšími sousedy CBC, hned po Panethových buňkách. Je tak pravděpodobné, že právě enteroendokrinní buňky tvoří tento rezervní zásobník kmenových buněk (Yan, et al., 2017).

Za homeostatických podmínek se CBC dělí každých 24 hodin za vzniku ekvipotentních kmenových buněk, které mezi sebou soupeří o své pozice dle modelu neutrálního driftu; CBC si konkurují o životní prostor – ty, které "prohrají" kryptu opustí a diferencují. Po čase tento model vede k vzniku klonální krypty. Buňky mimo kryptu postupně ztrácí expresi Lgr5 (Lopez-Garcia, et al., 2010). Vznikají tak dva klastry Lgr5+ buněk; Lgr5<sup>high</sup>, s vysokou expresí Lgr5

a faktorů kmenových buněk, a  $Lgr5^{low}$ , s nižší expresí  $Lgr5$  a expresí dalších proteinů asociovaných s diferenciovanými buněčnými liniemi (Kim, et al., 2016) (Snippert, et al., 2010).

CBC jsou posouvány vzhůru po stranách klku, dokud nedorazí do tzv. pozice +5 (1 buněčná délka nad nejvýše postavenou Panethovou buňkou). Za touto pozicí se linie kmenové buňky diferencuje a dochází k formaci kompartmentu rychle se dělících (cca každých 12 hod) buněk, tzv. TA-kompartmentu (z angl. Transit-Amplifying), který dále produkuje velké množství enterocytů, a původců sekretorní linie (Es, et al., 2012). Každá buňka kompartmentu projde 4-5 buněčnými cykly, než dosáhne svého limitu a odbočí do senescence. Shrnuto v; (Clevers, 2013). Linie buněk s absorpční funkcí a buněk se sekreční funkcí se oddělují prakticky okamžitě indukované laterální inhibicí signalizace Notch (Es, et al., 2012a). Výsledné diferenciované buňky postupně migrují směrem ke špičkám klků mechanismem "posuvného pásu". Poté co dosáhnou vrcholu, se buňky uvolní z bazální laminy a jsou odhozeny do lumenu. Tato produkce je dostatečná na udržení stabilní střevní sliznice, která se celá regeneruje zhruba každé 3 dny (Leblond & Messier, 1958).

Celkově lze zařadit buňky střeva mezi sedm základních buněčných typů, které lze rozdělit mezi majoritní a minoritní dle jejich četnosti v epitelu (Madara, 1982):

- Majoritní buněčné typy:
  - o Enterocyty
  - o Enteroendokrinní buňky
  - o Pohárkové buňky
  - o Panethovy buňky
- Minoritní buněčné typy:
  - o Tuft buňky
  - o M-buňky
  - o Cup buňky

Většina buněk postupně dozrává během pohybu vzhůru k vrcholu klku. Výjimkou jsou Panethovy buňky, pro které platí přesný opak – nejstarší Panethovu buňku lze najít nejbližší ke dnu krypty (Bjerknes & Cheng, 1981).

V tlustém střevě ale Panethovy buňky chybí. Nové buňky vznikají z kmenových buněk na dně intestinálních krypt, stejně jako je tomu tak v tenkém střevě, nicméně k zástavě buněčného cyklu a diferenciaci dochází až v horní třetině krypty (Sancho, et al., 2004). Funkce Panethových buněk je vykonávána hlubokými sekretorními buňkami krypt (DCS; z angl. Deep Crypt Secretary Cells). DCS lze rozpoznat díky charakteristickému proteinu Reg4, který má

v buňkách antimikrobiální funkci. Exprimují Notch ligandy DLL1 a DLL4, jejichž delece způsobuje snížení počtu Lgr5+ buněk v tlustém střevě. Na rozdíl od Panethových buněk ale neprodukují Wnt ligandy a jakákoliv organoidní kultura produkovaná z DCS vyžaduje exogenní suplementy (Sasaki, et al., 2016).

#### **1.1.1. Enterocyty**

Enterocyty jsou nejpočetnějším typem buněk ve střevním epitelu. Membrány těchto buněk jsou hyperpolarizované, sousedící buňky jsou mezi sebou drženy těsnými spoji, které umožňují regulovat průchod molekul z lumenu střeva. Mezi jejich hlavní funkce patří absorpce živin a tvorba fyzické bariéry mezi vnějším a vnitřním prostředím. Zároveň se, podobně jako M-buňky, často přímo účastní i v imunitních odpovědích a dokáží exprimovat MHC molekuly třídy I i II, které na povrchu enterocytů prezentují lumenální antigeny přímo T-lymfocytům. Shrnutí v; (Snoeck, et al., 2005).

#### **1.1.2. Enteroendokrinní buňky**

Enteroendokrinní buňky patří mezi důležité senzory živin a mikrobiálních metabolitů ve střevě. Sekretují různé hormony (dle konkrétního subtypu) a zároveň fungují jako jednotky metabolické signální transdukce. Některé ze subtypů jsou rovnoměrně rozloženy po celé délce střeva (např. subpopulace sekretující serotonin), jiné lze najít v konkrétních oblastech podél traktu (např. N-buňky distálního střeva produkující neurotensin). Shrnutí v; (Gribble & Reimann, 2016).

#### **1.1.3. Pohárkové buňky**

Hlavní funkcí pohárkových buněk je tvorba a údržba mukózní vrstvy tvořené z glykoproteinů známých jako muciny. Buňky sekretují granula s mucinem, které jsou ve vnějším prostředí hydratovány a vytváří gelovou vrstvu pokrývající vnitřek střeva. Tato struktura zachycuje vodu, elektrolyty, imunoglobuliny a odumřelé buňky epitelu, a vytváří tak fyzickou i chemickou bariéru před bakteriemi a toxiny. Populace pohárkových buněk ve střevě není rovnoměrně rozložena, jejich množství vzrůstá v distálních oblastech jak tenkého, tak tlustého střeva (tj. vzrůstá od dvanáctníku ke kyčelníku a od slepého střeva ke konečníku). Shrnutí v; (Kim & Ho, 2010).

#### **1.1.4. Panethovy buňky**

Panethovy buňky jsou specializované sekretorní buňky epitelu, které lze najít na dně tzv. Lieberkühnových krypt – konkrétně pod intestinálními kmenovými buňkami. Panethovy buňky plní svou antimikrobiální funkci pomocí sekrece bakteriocidních látek jako jsou defenziny, fosfolipázy nebo lysozym. Udržují imunitní homeostázi střeva regulací druhového rozložení

střevní mikroflóry a likvidací nebezpečných patogenů. Zároveň jsou také zdrojem kriticky důležitých signálních molekul, podporujících funkci kmenových buněk. Poruchy v jejich funkci zvyšují riziko vyvinutí zánětlivých onemocnění střeva, jako je například Crohnova choroba. Relevantní pro tuto práci je porucha v genu pro TCF4, který hraje vitální roli v diferenciaci kmenové buňky v buňku Panethovu, a je silně spojena s vývinem Crohnovy choroby v oblasti ilea (Wehkamp, et al., 2007). Shrnuto v; (Bevins & Salzman, 2011).

#### **1.1.5. Tuft buňky**

Tuft buňky (resp. kartáčové buňky, Bertovy buňky) mají vcelku jedinečnou morfologii – buňky mají trs (z angl. tuft) dlouhých a silných mikrokvlků, které trčí do lumenu z apikální strany buňky. Jejich funkce není zcela objasněna, nicméně se předpokládá, že mají chemosenzorické vlastnosti podobně jako chuťové buňky. Dále se podílejí na iniciaci Th2 imunitní odpovědi, která je spouštěna především v reakci na hlísty a další parazity. Shrnuto v; (Gerbe & Jay, 2016).

#### **1.1.6. M-buňky**

M-buňky jsou membránové epitelové buňky, které jsou součástí tzv. Peyerových plátů (shluků lymfoidních folikul). Slouží především jako rozhraní mezi vnějším a vnitřním prostředím. Jsou schopné transportovat antigeny ze střevního lumen do lymfoidní tkáně asociované se střevem (GALT). Jejich apikální povrch má mikrodomény uzpůsobené k rozsáhlé endocytóze, zatímco jejich basolaterální membrána je vychlípána do "kapsy" obsahující buňky imunitního systému. Shrnuto v; (Mabbott, et al., 2013).

#### **1.1.7. Cup buňky**

Cup buňky jsou pojmenované po pohárkovitém (z ang. cup-shaped) důlku, který je vytvořen přítomností cup buňky mezi enterocyty (mikrovlky na apikální straně cup buněk jsou kratší než u enterocytů). Shrnuto v; (Madara, 1982). Jejich funkce není dodnes zcela objasněna. Jsou charakterizovány přítomností vimentinu v okolí buněčného jádra (Ramirez & Gebert, 2003).

### **3. Signální dráha Wnt**

Signální dráha Wnt je důležitá pro nesčetně procesů v těle, včetně embryonálního vývoje, regulace buněčného růstu, diferenciaci a obnovy tkání. Prvním gen Wnt byl izolován z nádorů mléčné žlázy u myši. Dnes je označován jako *Wnt1*, nicméně v originální publikaci byl pojmenován podle svého původu *int-1* (z angl. mouse mammary tumour virus integration site 1) (Nusse & Varmus, 1982). Později byla objevena silná homologie *int-1* s dalším genem

jménem *wingless* (Wg) v *Drosophile*, který je nutný pro segmentaci a vývoj křídel (Rijsewijk, et al., 1987). Spojením těchto dvou názvů; *wg* a *int*, vzniklo jméno pro signální dráhu; Wnt.

Signalizací Wnt aktivované geny kódují pro malé sekretované proteiny, které lze najít ve všech živočišných genomech. Obratlovci mají zhruba 20 různých proteinů Wnt (lidé mají 19 genů pro proteiny Wnt (Nusse, 2023)), které lze rozdělit mezi 12 konzervovaných podrodin. Poruchy signalizace Wnt jsou spojeny s mnoha onemocněními, včetně rakoviny a genetických chorob.

Signální dráha Wnt je silně konzervována a sdílena mezi obratlovci i bezobratlými. Dle studie provedené A. Kusserowem et al. (2005) na žahavci *Nematostella vectensis* z řádu *Actinaria* (sasanky) lze v této evolučně staré větvi najít mnoho genů z rodiny Wnt, které hrají zásadní roli během gastrulace. Mezi těmito geny lze najít 11 z 12 Wnt podrodin které jsou vlastní všem obratlovcům. K vývoji signalizace Wnt muselo tedy dojít alespoň před 650 miliony let a předchází tedy Kambrickou explozi (období nevidaného druhového nárůstu) o zhruba 100 milionů let. Tento fakt jen dále podtrhuje klíčovou roli genů Wnt při diverzifikaci tělních plánů v živočišné říši (Kusserow, et al., 2005).

Dnes jsou popsány 3 základní signální dráhy, které jsou spuštěny aktivací Wnt receptoru. Jedná se o kanonickou dráhu Wnt vázanou na  $\beta$ -katenin, nekanonické dráhy Wnt/PCP a Wnt/ $Ca^{2+}$ . Jak PCP, tak  $Ca^{2+}$ -vázaná dráha jsou nezávislé na  $\beta$ -kateninu. Nekanonická dráha Wnt/PCP ovládá planární polaritu buňky (z ang. Planar Cell Polarity; PCP) a pohyb buněk skrze aktivaci kaskád c-Jun N-terminální kinázy, RH0A (z angl. Ras homolog family member A) a dalších. Blíže shrnuto zde; (Katoh, 2005).

Dráha Wnt/ $Ca^{2+}$  stimuluje aktivitu fosfolipázy C, což zvýší cytoplasmatickou hladinu vápníku, která níže v kaskádě aktivuje na vápníku/kalmodulinu závislou kinázu II (CamKII). Hraje roli v embryogenezi, diferenciaci některých buněčných typů (například chondrocyty) a mezibuněčné komunikaci. Všechny tři dráhy fungují současně a jejich efekty se vzájemně vyvažují a případně i inhibují, dle konkrétní signalizace. Shrnuto v; (Kohn & Moon, 2005).

Pro účely této práce se dále budu soustředit pouze na kanonickou,  $\beta$ -katenin-dependentní signální dráhu Wnt.

### 3.1. Wnt proteiny a sekrece

Wnt proteiny jsou charakterizovány nízkou mírou sekrece z buněk, spojenou s nízkou rozpustností. Tato nerozpustnost ve vodném prostředí je způsobena proteinovou modifikací, konkrétně palmitoylací na konzervovaném cysteinu přítomném ve všech Wnt proteinech

(Willert, et al., 2003). K modifikaci dochází na membráně hrubého endoplasmatického retikula pomocí enzymu Porcupine, který provádí acylaci molekul Wnt. O-vázaná acylace serinu je nutná pro následující S-palmitoylaci na cysteinu. Tato lipidická adice je klíčová pro signální schopnosti těchto molekul a pravděpodobně způsobuje lokální zvýšení koncentrace Wnt na membráně a umožňuje tak interakci s receptorem Frizzled (Fz), který napomáhá zprostředkovat další signalizaci (Doubravská, et al., 2011).

Další významnou modifikací na Wnt proteinech je glykosylace. Podle studie prováděné H. Yamamoto et al. (2013) na Wnt11 a Wnt3a, má glykosylace vliv na jejich apikální/basolaterální sekreci (respektive) v polarizovaných buňkách. Dále může ovlivňovat strukturální integritu a skládání těchto proteinů. Na rozdíl od palmitoylace ale nejsou efekty glykosylace zatím plně prozkoumány (Yamamoto, et al., 2013).

Po modifikaci jsou proteiny Wnt laterálně předány z enzymu Porcupine na receptor Wntless (WLS, někdy nazývaný Sprinter/Evenness interrupted). WLS je několikrát transmembránový protein, který přijímá pouze palmitoylem-značené Wnt (což mimo jiné vysvětluje, proč se proteiny s defekty v lipidické modifikaci hromadí v endoplasmatickém retikulu) (Herr & Basler, 2012). Komplex Wnt-WLS interaguje s proteiny Sec12 a Sar1, které napomáhají v tvorbě COPII-opláštěného váčku (Sun, et al., 2017). Nově vytvořený vezikul je přenesen z retikula do Golgiho aparátu. Tento transport je zprostředkováván proteiny z rodiny p24. Tyto proteiny tvoří komplexy s v-SNARE (Sec22), které umožňují splynutí s membránou Golgiho aparátu (Li, et al., 2015).

Dráha Wnt-WLS komplexu po Golgiho aparátu není dodnes adekvátně popsána. Nicméně, po anterográdním transportu k membráně je Wnt protein uvolněn a "prázdný" WLS je internalizován a retrográdním transportem přesunut zpět do endoplasmatického retikula, kde interaguje s enzymem Porcupine a palmitoylovanými Wnt v dalším kole sekrece (Yu, et al., 2014).

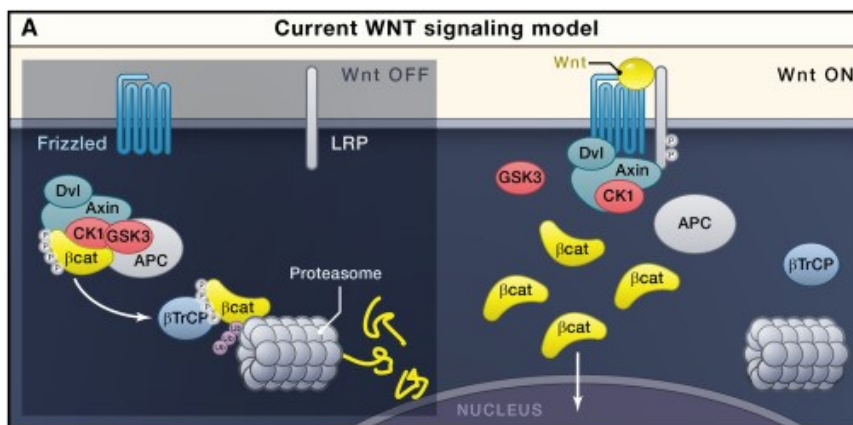
Hydrofobie Wnt proteinů značně ztěžuje jejich průchod extracelulárním prostředím. Za posledních dvacet let bylo identifikováno několik přenašečů, které zakrývají lipidické oblasti a umožňují tak průchod těchto molekul vodným prostředím. U člověka byl nalezen například glykoprotein afamin (Mihara, et al., 2016). Dále jsou debatovány role heparansulfát proteoglykanu (Serralbo & Marcelle, 2014), lipoproteinových vezikul (Panáková, et al., 2005), exozomů a dalších (Korkut, et al., 2009).

### 3.2. Signální kaskáda v buňce odpovídající na Wnt signál

Wnt ligandy se vážou na proteiny rodiny Frizzled (Fz); jedná se o sedmkrát přes membránu procházející receptory spřažené s G-proteiny. Fz proteiny obsahují N-terminální doménu bohatou na cysteiny (CRD; z angl. Cystein-Rich Domain) a C-terminální intracelulární doménu, která interaguje s proteinem Disheveled (Dsh) (Bhanot, et al., 1996). V mnoha organizmech je na povrchu buňky přítomno více typů Fz, které interagují se specifickými ligandy Wnt a zvyšují tak komplexitu aktivace. Selektivita mezi Fz a jednotlivými ligandy Wnt není dodnes dobře popsána, ale je známo, že koreceptory jako jsou LRP (z ang. Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein), ROR2 (z angl. Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2) i RYK (z angl. Receptor-like Tyrosine Kinase) hrají klíčovou roli ve tvorbě komplexů s Fz i při spouštění rakovinných procesů (Lu, et al., 2004). Kombinatorní interakce všech vazebných partnerů nakonec vedou k aktivaci jedné ze tří signálních dráh Wnt; kanonické Wnt/ $\beta$ -katenin-závislé dráhy, nekanonické Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  dráhy nebo nekanonické Wnt/PCP dráhy (Zeng, et al., 2018). Při vazbě Fz spolupracuje hlavně s koreceptorem LRP, který prochází membránou jedenkrát. U člověka se konkrétně nachází geny pro LRP5 a LRP6, které jsou oba potřebné ke spuštění signalizace Wnt. LRP5 a LRP6 jsou oba exprimované ve vyvíjejících se i dospělých tkáních (ne však společně v komplexu) a vzájemně kompenzují svou aktivitu během embryonálního vývoje. Podrobněji popsáno zde; (Ren, et al., 2021).

Wnt faktory nejsou jediné molekuly schopné ovlivnit spuštění kanonické signální dráhy Wnt. Existují i další proteiny, jako například R-spondiny, které jsou agonisty Wnt a zesilují signalizaci. U člověka bylo například prokázáno, že R-spondin-1 silně podporuje proliferaci intestinálních kmenových buněk skrze stabilizaci  $\beta$ -kateninu (Kim, et al., 2005).

Jak lze vidět na obr. č. 2 – jakmile se Wnt ligandy naváží na komplex Fz/LRP, koreceptory aktivují kanonickou signální dráhu. Minimálně dvě různé kinázy; GSK3 a  $\text{CK1}\gamma$ , silně fosforylují cytoplasmatický konec receptoru LRP5/6. Fz interaguje s proteinem Dsh a umožňuje tak interakci mezi fosforylovaným koncem LRP5/6 a Axinem, proteinem se zásadní funkcí v  $\beta$ -katenin destrukčním komplexu. Takto vázané na membránové receptory mohou proteiny Axin a Dsh vytvořit heterodimer, který posléze zprostředkovává všechny děje dolů po proudu (Mao, et al., 2001).



Obrázek 2: Model signalizace Wnt (Clevers & Nusse, 2012)

Obr.2 | Model signalizace Wnt. V nepřítomnosti Wnt signalizace zůstává destruktční komplex v cytoplasmě, kde váže a fosforyluje  $\beta$ -katenin. Fosforylovaný  $\beta$ -katenin opouští komplex, je ubiquitinylován  $\beta$ -TrCP a nakonec degradován proteazomem. Signalizace Wnt indukuje asociaci Axinu s fosforylovaným LRP. Po aktivaci Wnt dráhy se destruktční komplex rozpadá a  $\beta$ -katenin se stabilizuje (Clevers & Nusse, 2012).

### 3.3. $\beta$ -katenin destruktční komplex

$\beta$ -katenin (resp. Armadillo v *Drosophile*) je, stejně jako signální dráha Wnt, silně evolučně konzervovaný. V buňce provádí jak strukturní, tak signální roli; jedná se jak o integrální část kadherinových adhezních spojů, tak o zásadní jaderný efektor (Wieschaus, et al., 1984).  $\beta$ -katenin, který je asociován s E-kadherinem, pomáhá napojit adhezní spoje na buněčný cytoskelet (Ozawa, et al., 1989). Volný  $\beta$ -katenin je v nepřítomnosti aktivní signalizace degradován a v aktivním stavu funguje jako klíčový signalizační faktor. Jelikož jakákoliv nerovnováha mezi těmito stavy často vede k onemocněním, rakovině a metastázi, je  $\beta$ -katenin v neaktivním stavu přísně regulován.  $\beta$ -katenin destruktční komplex ho označí pro degradaci, což vede k jeho rozkladu v proteazomu. Když se ligand Wnt váže na receptorový komplex, spustí se kaskáda signálů, která vede k inhibici ubiquitinylace  $\beta$ -kateninu, čímž se umožní jeho akumulace v cytoplasmě a další signalizace v jádře buňky.

Cytoplasmatický destruktční komplex tak tvoří centrum dráhy Wnt. Jeho součástí jsou, mimo jiné; nádorové supresory Axin a APC (z angl. Adenomatous Polyposis Coli) a Ser/Thr kinázy GSK-3 a CK1. S komplexem jsou zároveň asociované i další proteiny jako je proteinová fosfatáza 2A (PP2A) a E3-ubiquitin ligáza  $\beta$ -TrCP. Kinázy GSK-3 a CK1 střídavě fosforylují Ser/Thr sekvence na  $\beta$ -kateninu, čímž odhalí vazebné místo pro ubiquitin ligázu  $\beta$ -TrCP. Ligáza

označí  $\beta$ -katenin ubiquitinem a protein je následně degradován v proteazomu (Winston, et al., 1999).

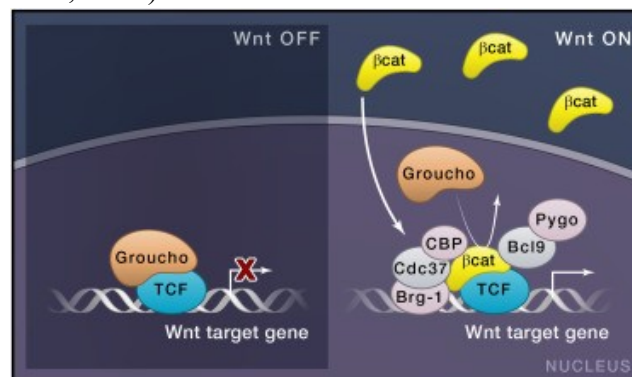
Tyto interakce jsou usnadněny přítomností Axinu a APC, které slouží jako lešení držící tento komplex pohromadě. Axin je nestrukturovaný a flexibilní protein s vazebnými místy pro GSK-3, CK1 i  $\beta$ -katenin – váže tedy enzymy i substrát reakce pohromadě a zvyšuje tím jejich efektivní koncentraci. APC má zásadní roli v destrukčním komplexu (zárodečná mutace v genu pro APC způsobuje familiární adenomatózní polypóze, mutace se zároveň vyskytuje v >80 % případů rakoviny tlustého střeva (Fearhead, et al., 2001)), indukuje totiž degradaci  $\beta$ -kateninu. APC zároveň zabraňuje receptorům Wnt v aktivaci signální dráhy, pokud nejsou stimulovány. Přesný mechanismus funkce APC ale zůstává dodnes záhadou (Saito-Diaz, et al., 2018).

Bližší informace o destrukčním komplexu zde: (Stamos & Weis, 2012).

### 3.4. Genová exprese

Pokud buňka zaznamená signalizaci Wnt, proběhne série dějů zmíněných v kapitolách výše a kinázová aktivita komplexu vůči  $\beta$ -kateninu se zastaví. Akumulovaný  $\beta$ -katenin pak vstoupí do jádra buňky, kde interaguje s transkripčními faktory, a spustí expresi genů odpovídajících an signál Wnt. V jádře hrají klíčovou roli T-buněčné faktory (TCF) a lymfoidní enhancerové faktory (LEF), které aktivují transkripci svých cílových genů.

V neaktivním stavu působí TCF/LEF jako represory a váží protein Groucho (a další jemu podobné), který funguje jako korepresor.  $\beta$ -katenin ale dokáže odsunout Groucho vazbou na N-konec TCF/LEF, čímž je transformuje v aktivátory a spustí transkripci (Daniels & Weis, 2005). Shrnutí v; (Clevers, 2006).



Obrázek 3: Genová exprese (Clevers & Nusse, 2012)

Obr. 3 | V nepřítomnosti signálů Wnt, transkripční faktory TCF potlačují expresi svých cílových genů s pomocí dalších transkripčních korepresorů jako je Groucho. Při aktivaci signální dráhy Wnt,  $\beta$ -katenin nahradí Groucho.  $\beta$ -katenin přitáhne další

*transkripční koaktivátory a histonové modifikátory (např. Brg1, CBP, Cdc47, Bcl9 a Pygopus) a rozběhne expresi cílových genů (Clevers & Nusse, 2012).*

### 3.4.1. TCF/LEF rodina

TCF/LEF transkripční faktory jsou klíčovými regulátory kanonické signalizační dráhy Wnt. Tyto proteiny patří do rodiny HMG (High Mobility Group) box faktorů a váží se na DNA v blízkosti specifických cílových genů, aby ovlivnily jejich expresi. TCF1, LEF1, TCF3 a TCF4 (kódované geny *TCF7*, *LEF1*, *TCF7L1* a *TCF7L2*)<sup>1</sup> jsou čtyři faktory z rodiny TCF/LEF proteinů, které lze najít u savců (*Mammalia*). Každý z těchto faktorů má specifické funkce v regulaci genové exprese, ale všechny zároveň vykazují podobné strukturní vlastnosti a jejich exprese se často překrývá. Hledání specifických funkcí u každého z transkripčních faktorů navíc zesložituje jejich produkce v několika různých izoformách, generovaných alternativním sestřihem mRNA nebo využitím různých promotorů (Hrckulak, et al., 2016).

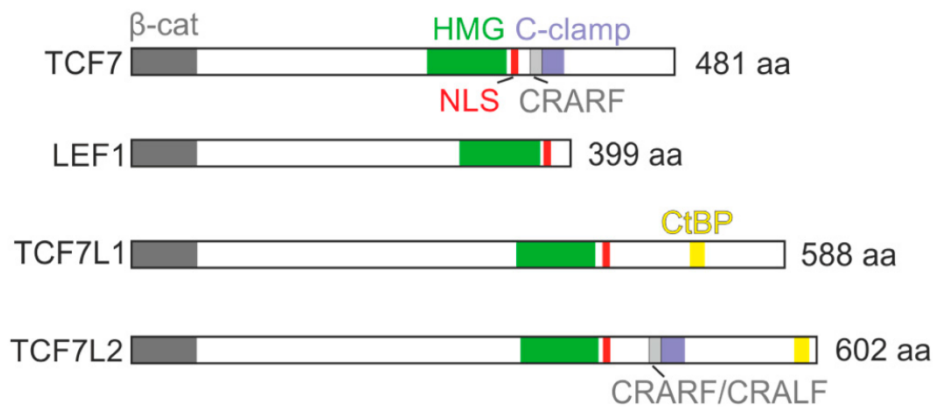
Ve střevě hraje TCF/LEF-zprostředkovaná signalizace hned několik rolí – napomáhá udržovat kmenové buňky pomocí regulace buněčného cyklu, reguluje buněčné osudy a určuje lokalizaci buněk na ose krypta-klk. Aktivovaná signální dráha Wnt tedy reguluje geny pro proteiny jako jsou například:

- Axin2; který hraje důležitou roli v regulaci kanonické signální dráhy Wnt (viz výše) a tvoří negativní zpětnou vazbu pro signalizaci Wnt (Lustig, et al., 2002).
- Ndk1; který hraje roli signálního antagonisty pro signální dráhu Wnt tím, že se váže k proteinu Dsh a zastavuje signální transdukci. Ndk1, stejně jako Axin2, tvoří negativní zpětnou vazbu pro signalizaci Wnt, zejména v rané embryogenezi u *Drosophila* (Rousset, et al., 2001).
- Troy; který je produkován rychle se dělícími intestinálními kmenovými buňkami a je asociován receptorem charakteristickým pro CBC; Lgr5. Dokáže potlačit signalizaci zprostředkovanou Wnt agonistou; R-Spondinem (Fafilek, et al., 2013).

---

<sup>1</sup> *TCF7L2* je název obecně používaný pro gen. Označení TCF4 je obecně používáno pro protein. Pro lepší čitelnost textu budu nadále používat označení TCF4 pro gen i protein.

Všechny TCF/LEF proteiny rozpoznávají konsensus sekvenci na DNA nazývanou WRE (Wnt response element – z angl. na Wnt odpovídající element), která je zachytávána silně konzervovanou doménou HMG-box. Jak lze vidět na obr. č. 4, izoformy savčích faktorů z TCF/LEF rodiny mají hned několik dalších funkčních domén, které jsou silně konzervované i mezi homology z *Drosophila m.* Jedná se o  $\beta$ -katenin-vazebnou doménu na N-konci, HMG-box DNA-vazebnou doménu, jaderný lokalizační signál (NLS), Cystein-clamp DNA-vazebný motiv (C-clamp) a C-terminální protein-vazebnou doménu (CtBP) (Hrckulak, et al., 2016).



Obrázek 4: Hlavní funkční domény proteinů rodiny TCF/LEF (Hrckulak, et al., 2016)

Obr. 4 | Graf, převzatý z publikace (Hrckulak, et al., 2016), ukazuje pozici konzervovaných funkčních domén v nejdůležitějších proteinech rodiny TCF/LEF;  $\beta$ -cat,  $\beta$ -katenin-vazebná doména (šedá); HMG, High Mobility Group-box DNA-vazebná doména (zelená); NLS, jaderný lokalizační signál (červená); C-clamp (fialová); CtBP (žlutá); CRARF/CRALF sekvence – obsahující cysteinové zbytky, klíčové pro vazbu pomocných sekvencí (světle fialová); aa aminokyseliny. Segmenty reprezentující NLS a CRARF/CRALF sekvence nejsou zobrazeny ve škále korespondující se zbytkem ukázaných domén.

Naprostá většina izoform TCF má  $\beta$ -katenin-interakční doménu na N-konci. Existují ale i přirozeně se vyskytující izoformy, kterým tato doména chybí. Jedná se například jednu z izoform TCF4, která působí při embryonálním vývoji ventrální strany diencefalonu (předního mozku). Transkripční faktor Vax1, který je exprimován specificky ve ventrálním diencefalonu, nasedá na krátkou, ale silně konzervovanou, sekvenci DNA v pátém intronu. Vax1 poté specificky transkribuje mRNA, které chybí prvních pět exonů TCF4. První z těchto exonů obsahuje  $\beta$ -katenin-vazebnou doménu, bez které nemůže odpovídat na signalizaci Wnt a působí tedy jako globální dominantně-negativní Wnt antagonist (Vacik, et al., 2011)

DNA vazebná doména je nejsilněji konzervovaný segment z celé TCF/LEF rodiny ( $\geq 94\%$ ). K rozpoznávání WRE slouží 88 aminokyselin dlouhá HMG doména složená z tří

částí; 68 aminokyselin dlouhého HMG-boxu, 9 aminokyselin dlouhé zásadité sekvence působící jako NLS a 9 aminokyselin dlouhý řetěz, který ji pojí k HMG-boxu. HMG-box rozpoznává specifickou sekvenci v malém žlábků na DNA (YCTTTGWW) a zároveň ohne DNA molekulu o úhel až 130°. Flexibilní řetězec aminokyselin dovolí NLS vlézt do velkého žlábků, interagovat s fosfátovou vazbou a stabilizovat interakci s DNA. Silná homologie mezi DNA-vazebnými doménami ale překvapivě neznamená, že všechny TCF/LEF aktivují Wnt-vázané geny ekvivalentně (Atcha, et al., 2007).

Atcha ve své publikaci; (Atcha, et al., 2007), popisuje rozdílnou potenci aktivace genů *LEF1* a *CDX1* alternativně sestřiženými izoformami TCF1 a TCF4 v C-terminálním exonu; "E-tail". E-tail obsahuje C-clamp ("C-sponu"); 30 aminokyselin dlouhý motiv zprostředkovávající doplňkovou interakci s DNA. WRE potřebuje C-clamp k vazbě  $\beta$ -kateninu a aktivaci. C-clamp motiv obsahuje konzervovaný cystein a další zásadité a aromatické aminokyselinové zbytky. C-clamp neovlivňuje specificitu vazby k WRE, nicméně může ovlivňovat stabilní aktivaci různých genů.

XTCF v *Xenopus* a TCF3 a TCF4 izoformy u savců obsahují navíc CtBP-vazebnou doménu. CtBP (z angl. C-terminal Binding Protein) je globální korepresor, jehož přesný mechanismus působení není dodnes znám, ale funguje v mnoha různých kontextech v těle při regulaci transkripce a udržování homeostázy. Nicméně, co se týče konkrétního efektu CtBP ve signalizaci Wnt panují rozporuplné názory. Studie od Valenty et al. ukazuje, že v člověku CtBP asociuje s C-koncem TCF4, zastavuje transkripci Wnt-ovlivněného reportéru a snižuje aktivitu promotoru Axin2 (Valenta, et al., 2003). Na druhé straně byly provedeny studie (Patel, et al., 2014) na lidských rakovinných kmenových buňkách (CSC), jejíž výsledky ukazují že vyčerpání CtBP zastavuje růst CSC a nadměrná exprese naopak podporuje růst a sebeobnovu. A konečně v *Drosophila* byla zjištěna role CtBP jako genově-specifický duální represor i aktivátor. CtBP se váže na Wnt-regulované enhancery a zvyšuje jejich transkripční aktivaci proteinem Armadillo ( $\beta$ -katenin rodu *Drosophila*) a zároveň zabraňuje expresi určité podmnožiny genů za absence signalizace Wnt a bez zapojení TCF proteinů (Fang, et al., 2006).

#### **4. Transkripční faktor TCF4**

Transkripční faktor TCF4, někdy také známý jako TCF7L2 (z angl. T-Cell Factor 7-like-2) je nejstudovanějším faktorem z TCF/LEF rodiny. Je klíčovým faktorem při udržování homeostázy a regenerace střevního epitelu a jeho poruchy vedou k rozsáhlé škále patologií jako

jsou různé neurovývojové poruchy (Dias, et al., 2021), diabetes mellitus 2. typu (Grant, et al., 2006), rakovina tlustého střeva a ileální Crohnova choroba (blíže popsané dále).

Během embryogeneze u myši je nejvíce exprimován ve střevní trubici a nervových tkáních. V dospělosti ale není jeho exprese zdaleka tak omezená. I přesto, že jeho exprese zůstává nejvyšší ve střevě, je možné ho najít v mnoha proliferujících nikách různých tkání. Míra exprese se v různých segmentech střeva liší; v tenkém střevě lze najít Tcf4 rovnoměrně po celé ose krypta-klk, zatímco v tlustém střevě je na dně krypty nízká, ale zvyšuje se v necyklujících buňkách vršku krypty (Es, et al., 2012b). Nejvíce je Tcf4 přítomen v kryptách tenkého střeva, konkrétně v CBC a Panethových buňkách (Hrckulak, et al., 2018). Je také důležité zmínit zvýšenou expresi v buňkách rakoviny tlustého střeva izolovaných z lidských nádorů (Korinek, et al., 1997).

Gen TCF4 má v lidských a myších genomech celkem 17 exonů a tvoří 12/18 protein-kódujících izoforem (podle RefSeq/Ensembl databáze resp.). V buňkách nádorů rakoviny tlustého střeva (CRC, z angl. Colorectal Cancer Cells), bývají nalézány mutace v místech sestřihu (které mohou produkovat nové izoformy) a v nádorech vykazujících mikrosatelitní nestability jsou časté mutace s posuvy čtecího rámce, které krátí protein TCF4. TCF4 gen obsahuje 3 oblasti, které podléhají alternativnímu sestřihu (Weise, et al., 2010). Jedná se o sestřih:

- Exonu 4, který kóduje pro 23 AK-dlouhou doménu bez známé funkce.
- Exonů 7, 8, a 9. Přeskočení exonu 8 vede ke tvorbě izoform schopných vázat  $\beta$ -katenin, ale postrádajících HMG-box – jedná se nejspíše jako negativní faktory signalizace Wnt.
- Exonů 13, 14, 15 a 16 v různých kombinacích, lišících se složením C-konce. Pouze TCF4E varianty mají kompletní variantu C-clamp a navíc obsahují vazebné motivy pro CtBP (všem ostatním jedna, nebo obě, z uvedených struktur chybí).

Aby bylo možné různé izoformy charakterizovat, Weise et al. naklonovali celkem 13 různých transkriptů TCF4 z myši a rozdělili je mezi skupiny s E, S a M variantami.

- E-skupina zahrnuje nejdelší transkripty, které mají kompletní E-tail.
- S-skupina obsahuje transkripty, kterým chybí část C-clamp na C-konci proteinu.
- M-skupina obsahuje transkripty, kterým E-tail zcela chybí.

Jak se ukázalo, nejefektivnější aktivátory transkripce byly izoformy ze skupiny E, kterým chyběl exon 4. Isoformy z S- a M-skupin měly slabý, nebo žádný aktivační potenciál. Různé vlastnosti spojené s alternativními transkripty podporují myšlenku, že různé skupiny TCF4-aktivovaných genů vyžadují různé izoformy. Což, mimo jiné, vysvětluje rozporuplné

názory na efekt TCF4 v tumorigenezi. Bylo zjištěno, že TCF4 aktivuje geny podporující dělení a proliferaci, a má tedy roli v onkogenní aktivitě signalizační dráhy Wnt. Zároveň studie ale ukazují jeho antionkogenní funkci. Zkoumáním různých izoform bylo zjištěno, že tato inhibiční funkce je spojena s C-koncové domény, obsahující C-clamp. V rakovinných buňkách bývá úsek na 5'-konci 17. exonu často zkracován/prodlužován, čímž se posunuje čtecí rámec a znemožňuje produkce úplné C-clamp (nutné pro TCF4E varianty). TCF4E varianty se odlišují od ostatních jejich schopností aktivovat geny Axin2 a Cdx1, které mají tumor-supresivní funkce (Weise, et al., 2010).

## 5. TCF4 v obnově střevního epitelu

Buňky lemující střevní klky bývají často poškozeny během vstřebávání živin při průchodu tráveniny. Obnova střevního epitelu je proto proces nezbytný pro udržení integrity a funkčnosti střevní sliznice. Je velmi důležitá pro udržení funkce střeva i pro prevenci vzniku střevních patologií. Při poškození střevní sliznice, například při akutních nebo chronických střevních onemocněních, se potřeba obnovy epitelu zvyšuje. (Bevins & Salzman, 2011).

Jak bylo zmíněno výše v kapitole 2.1. Buněčné typy, CBC udržují homeostatický stav střeva dělením a diferenciací do různých buněčných linií. CBC se dělí každých 24 hod a tvoří buňky TA-kompartmentu, které se dělí každých 12 hod a jsou zodpovědné za produkci většiny populace. Výsledné diferenciované buňky migrují směrem ke špičkám klků a jsou odhozeny do lumenu (Clevers, 2013).

Celý proces proliferace a regenerace je regulován vysoce konzervovanými signálními drahami, mezi které patří zejména signální dráha Wnt. Ta ovlivňuje vývojové osudy buněk i proliferaci intestinálního epitelu. Vliv signalizace Wnt na rozvoj epitelu lze snadno demonstrovat na genetických mutacích nádorového supresoru APC, které vedou k nahromadění stabilních  $\beta$ -katenin-TCF4 komplexů v jádře a konstitutivní aktivaci cílových genů dráhy Wnt. Deregulovaná transkripce TCF4-cílových genů poté provází formaci adenomů střevního epitelu (Korinek, et al., 1997).

Konkrétní mechanismy funkce TCF4 ve střevě a jeho obnově jsou rozporuplné a dodnes ne zcela prozkoumané. Kořínek et al. (1998) jako jedni z prvních provedli experimenty na laboratorních myších s účelem popsat jeho funkce. Cíleným celotělovým vyřazením jednoho z exonů *Tcf4* (konkrétně jeho DNA-vazebné HMG box domény) zjistili, že homozygotní mutantní (*Tcf4*<sup>-/-</sup>) umírají krátce po narození kvůli abnormalitám střevní sliznice. Ve sliznici

tenkého střeva chyběly klky a počet epiteliálních buněk byl výrazně snížený. Dále se ukázalo, že dva z nejpočetnějších buněčných typů střevního epitelu – enterocyty a pohárkové buňky – zůstávají přítomny, ale enteroendokrinní buňky chybí (Korinek, et al., 1998).

Hrculak et al. (2018) sledovali buněčný osud kmenových buněk po podmíněném vyřazení TCF4 Cre-Lox rekombinací<sup>2</sup>. Zjistili, že linie buněk s chybějícím TCF4 ze střevního epitelu postupně mizí a neúčastní se na doplnění poškozeného epitelu. Z výsledků obou studií – (Hrculak, et al., 2018) i (Korinek, et al., 1998) – se dá usoudit, že TCF4 hraje klíčovou roli v udržování kmenových buněk a v obnově epitelu tenkého střeva.

Výsledky experimentů zahrnující ablaci *Tcf4* pomocí Cre-Lox rekombinace exonu 11 (který kóduje pro DNA-vazebnou doménu) odráží výsledky Korinek et al. (1998). Epitel tenkého střeva v dospělosti nadále vyžaduje *Tcf4* k udržení proliferujícího *Lgr5+* kompartmentu. Es et al. (2012) také popisují dopad delece *Tcf4* na tlusté střevo, která vyústí v ztrátu dělicích se buněk krypty (resp. ztrátu Ki67; proteinu zásadního pro buněčné dělení) (Es, et al., 2012b). Mezi další efekty patří ztráta exprese receptorů EphB2 a EphB3, které umožňují dolů-směřující migraci Panethových buněk. EphB2 a EphB3 receptory tvoří klesající gradient ode dna po vršek krypty. Jejich ligand ephrin-B1 pak tvoří opačný gradient, klesající směrem ke dnu. Narušení genů EphB2 a EphB3 vede k prolínání proliferativních a diferencovaných buněk. Signalizace Wnt tedy koordinuje kontrolu proliferace podél osy krypta-klk s tříděním populací krypt zprostředkovaným mechanismem interakce EphB/ephrin-B (Batlle, et al., 2002) (Wetering, et al., 2002). Panethovy buňky jsou klíčové v udržování niky kmenových buněk – jsou producenti signalizace Wnt, Notch i EGF. A zároveň je signalizace Wnt nezbytná pro dozrávání Panethových buněk. V případě podmíněného vyřazení TCF4 z funkce se Panethovy buňky aberantně rozšíří po klcích epitelu, až nakonec zmizí kolem sedmého dne po vyřazení (Es, et al., 2012b).

Přítomnost TCF4 je tedy nutná k regulaci funkce signalizace Wnt. Studie využívající jiné modely aktivace či represe dráhy Wnt zrcadlí výsledky produkované experimenty na TCF4. Pokud je například dráha inhibována Wnt antagonistou Dickkopf1, jak ukázali (Kuhnert, et al., 2003), dochází k degeneraci slizniční architektury a ztrátě krypt, zrovna tak jako při deleci TCF4. Naopak silný agonista R-Spondin1 (*Rspo1*) způsobuje stabilizaci cytosolického

---

<sup>2</sup> Cre-Lox rekombinace je založená na principu vystřížení specifické DNA sekvence, která je z obou stran ohraničena tzv. Lox-P místy (krátké, 34bp dlouhé sekvence), enzymem Cre-rekombinázou. Celý mechanismus (Cre-rekombináza i původní Lox-P sekvence) je původem z bakteriofága P1 (Sauer & Henderson, 1989).

$\beta$ -kateninu a indukuje proliferaci. Lidský Rspol přenesený do myších modelů v úspěšných chimérách způsobuje ztluštění sliznici, hyperplázii kryptového kompartmentu a značné rozšíření zóny proliferujících buněk (dokázané přítomností Ki-67) (Kim, et al., 2005).

## 6. TCF4 v patologiích

### 6.1. Rakovina tlustého střeva

Role TCF4 v rozvoji kolorektálního karcinomu je komplexní a dodnes ne zcela vysvětlený. TCF4 může působit jako onkogen, jehož deregulace imituje buněčný program proliferujících buněk. Zároveň ale může TCF4 působit jako tumorový supresor. Různé studie na toto téma naznačují, že diametrálně odlišné efekty na rozvoj rakoviny jsou způsobeny přítomností různých izoforem genu *TCF4* a zejména přítomností jeho C-terminálního segmentu, který ovlivňuje míru aktivace cílových genů (Weise, et al., 2010).

Nejsilnějším supresorem signální dráhy Wnt je protein APC, jehož mutace se často objevují v CRC buňkách (>80 %). Dříve se předpokládalo, že TCF4 je odpovědný za aktivaci růst-podporujících genů po ztrátě APC. Studie uplatňující iterativní strategii screeningu celého genomu, která využívá několik neredundantních RNAi činidel, provedená skupinou Tang et al. (2008) ale podala důkazy ukazující přesný opak. Studie ukázala funkci Tcf4 jako negativního regulátoru signalizační dráhy Wnt. Tcf4 se ukázal jako negativní regulátor dvou genů; HGF (z angl. Hepatocyte Growth Factor) a HECA (z angl. Headcase), které podporují růst a dělení buněk a jejich zvýšená přítomnost v lidském séru či fekáliích je u pacientům znakem špatné prognózy. Vyšlo najevo, že mutace vedoucí ke ztrátě funkce Tcf4 způsobily nárůst v buněčném dělení v CRC buňkách, a naopak mutace vedoucí k zisku funkce u Tcf4 růst potlačují. Tang et al. identifikovali C-terminální doménu jako zdroj supresivní funkce (Tang, et al., 2008).

Tcf4 haploinsuficience v kombinaci s mutací APC silně podporuje růst nádorů v tlustém střevě. Zatímco *Apc<sup>min</sup>* myší modely<sup>3</sup> mají pouze slabou tendenci k formaci kolorektálních nádorů, u *Apc<sup>min</sup>Tcf4<sup>het</sup>* mutantů vzniká v průměru zhruba 8 nádorů/myš (četnost nádorů v tenkém střevě se nemění). Tento fakt podporuje hypotézu o funkci TCF4 jako tumorsupresoru (Angus-Hill, et al., 2011).

---

<sup>3</sup> *Apc<sup>min</sup>* (z angl. multiple intestinal neoplasia) myši mají dominantní bodovou mutaci v genu *Apc*, způsobující výskyt nádorů střeva a mléčné žlázy. Homozygotní mutace *Apc<sup>min</sup>* je letální (Su, et al., 1992).

Studie, které podporují hypotézu o funkci *TCF4* jako onkogenu, dokazují jeho účast na udržování normální proliferující funkce v buňkách CRC. Aktivita *TCF4* v buňkách CRC způsobuje, že tyto buňky přechází z fenotypu diferencovaného křkového epitelu na fenotyp podobný kryptě. Cílový gen *TCF4*; *c-MYC* je významný proto-onkogen, jehož exprese bývá vysoká jak v brzkých, tak pozdních stádiích rakoviny tlustého střeva (Sikora, et al., 1987). Mezi jeho centrální role patří represe promotoru genu *p21<sup>CIP1/WAF1</sup>*, který kóduje pro CDK inhibitor a zastavuje G1/S (a případně G2/M) přechod. Nepřítomnost *TCF4* vede k zástavě buněčného cyklu v G1 (což odpovídá tomu co je známo o vlivu *TCF4* na fyziologii buňky) (Wetering, et al., 2002). *TCF4*-negativní buňky navíc vykazují morfologické změny, zvýšenou migraci, invazivitu a adhezi ke kolagenu, ačkoli závažnost fenotypových změn se projevuje v závislosti na buněčné linii. Wenzel et. al. (2020) provedli globální profilování transkriptomu a identifikovali regulační dráhy, ve kterých *TCF4* pozitivně reguluje proto-onkogen *MYC* a zároveň potlačuje inhibitory buněčného cyklu *CDKN2C/CDKN2D*. Z jejich výsledků usoudili, že přítomnost *TCF4* podporuje proliferaci CRC buněk, ztráta jeho funkce ale zvyšuje invazivitu a malignanci nádoru (Wenzel, et al., 2020). Zjistili také, že v kontrastu oproti zdravému kolorektálnímu epitelu, úplná inaktivace *TCF4* v CRC buněčných liniích nemá vliv na jejich životaschopnost. Tento fakt zaznamenali i Hrckulak et al. (2018), kteří v jejich studii vyřadili *TCF3/TCF4* (jednoduché či dvojité vyřazení) z APC-deficientních buněk. Všechny výsledné klony byly životaschopné a bez výrazných změn v jejich proliferčních schopnostech. Obě studie tak ukazují, že existuje jistá míra vzájemné zaměnitelnosti mezi *TCF* transkripčními faktory v lidských buňkách.

*TCF4* tedy na kolorektální karcinom působí jak supresivně, tak onkogenicky, i když názory na přesný mechanismus obou funkcí se liší. Mimo střev jsou některé alely *TCF4* implikovány v rozvoji rakoviny žaludku (Torres, et al., 2016). Alela rs12255372, která je asociována s rizikem vývoje cukrovky 2. typu, zároveň zvyšuje riziko agresivní formy rakoviny prostaty (Agalliu, et al., 2008). Další (rs7903146) se pak často objevuje u pacientů s rakovinou prsu (Naidu, et al., 2012). *TCF4* zůstává předmětem rozsáhlého studia i možným cílem léčby.

## **6.2. Crohnova choroba**

Crohnova choroba patří mezi idiopatické střevní záněty nebo IBD (z angl. Inflammatory Bowel Disease). Jedná se o chronické střevní záněty, které bývají doprovázeny různorodými extraintestinálními příznaky (horečka, úbytek hmotnosti, anorexie...). Etiopatogeneze těchto onemocnění není dodnes zcela objasněná, i přesto že je předmětem rozsáhlého výzkumu.

Projevy IBD obvykle začínají v dětství či během dospívání. Současná koncepce říká, že se symptomy projeví u geneticky predisponovaných jednotlivců a vedou k nepřiměřené a trvalé aktivaci slizničního imunitního systému normální lumenální mikroflórou. Na základě klinických příznaků a histopatologie se IBD běžně dělí na dva hlavní typy: ulcerózní kolitidu (UC; z angl. Ulcerative Colitis) a Crohnovu chorobu (CD; z angl. Crohn's disease). Liší se konkrétní lokací (UC pouze tlusté střevo, CD celý gastrointestinální trakt) a histologií (UC postihuje sliznici a podslizniční vazivo, CD pak všechny vrstvy střevní stěny). Případně mezi ně navíc patří neurčitá (nedeterminovaná) kolitida, která se vyznačuje společnými rysy UC i CD s atypickými znaky, díky kterým nelze onemocnění jednoznačně zařadit (Lebl, et al., 2014).

Crohnova choroba tenkého střeva je forma zánětlivého střevního onemocnění, které způsobuje chronický zánět gastrointestinálního traktu. Obvykle postihuje střeva, ale může se vyskytovat od úst až po konečník. Konkrétní lokalita bývá u jednotlivých pacientů překvapivě stálá. Je charakterizována sníženou expresí antimikrobiálních defenzinů a přítomností adhezivních bakterií na sliznici střeva. CD tlustého střeva je spojena s nízkým počtem genetických kopií  $\beta$ -defenzinů, což vede k oslabené epiteliální indukci antimikrobiálních  $\beta$ -defenzinů ve sliznici (Fellermann, et al., 2006). Naopak ileální CD je asociována s nedostatkem jiné skupiny defenzinů Panethových buněk;  $\alpha$ -defenzinů, které chrání hostitele před patogeny z vody a potravy a napomáhají regulaci bakteriálních kolonií (Wehkamp, et al., 2005).

Panethovy buňky rovněž produkují NOD2 (intracelulární receptor pro muramyl dipeptid, strukturu typickou pro některé typy bakterií), jehož mutace je běžná pro pacienty s ileální CD (Hampe, et al., 2001). Přítomnost *NOD2* mutace umocňuje výše zmíněný nedostatek  $\alpha$ -defenzinů (Wehkamp, et al., 2004). TCF4 řídí diferenciaci Panethových buněk a  $\alpha$ -defenziny typu 5 (HD5) a 6 (HD6) jsou nejhojnějšími produkty Panethových buněk, jejichž exprese je ovládaná TCF4. Studie od Wehkamp et al. (2007) uvádí, že CD tenkého střeva je spojena s poklesem Wnt signálního transkripčního faktoru TCF4, což vede k pozorovanému poklesu  $\alpha$ -defenzinů Panethových buněk. Tento pokles nebyl zaznamenán v případech CD tlustého střeva. Vliv hladiny TCF4 na expresi  $\alpha$ -defenzinů byl navíc nezávislý na vlivu genotypu NOD2 (Wehkamp, et al., 2007).

TCF4 se váže na promotory HD5 a HD6 a přímo reguluje jejich expresi, pokles jeho exprese způsobuje jejich nedostatek. Současné údaje ukazují genetickou asociaci mezi vzácnou SNP variantou TCF4 a určitými skupinami ileální CD. Jedná se o mutaci v promotoru (ID alely rs3814570 T). Nebyla nalezena žádná asociace s CD tlustého střeva či UC, což napovídá tomu,

že nedostatek HD5 a HD6 může být pokládán za primární defekt této komplexní choroby (Kosłowski, et al., 2009).

### 6.3. Diabetes mellitus 2. typu

Cukrovka 2. typu (T2DM; z angl. Type 2 Diabetes Mellitus) je metabolická porucha charakterizována hyperglykemií, která může být způsobena mechanismy snížené sekrece inzulínu, rezistence vůči inzulínu v perifériích nebo zvýšené produkce glukózy játry.

*TCF4* je nejsilnějším lokusem ovlivňujícím nástup a vývoj T2DM. Existují odhady, že *TCF4* má vliv na zhruba 1/5 všech případů (Tong, et al., 2009). Souvislost mezi *TCF4* s T2DM byla studována extenzivně a nalezena v diverzních populacích po celém světě. Byl objeven mikrosatelit, DG10S478, v třetím intronu *TCF4*, který měl silnou asociaci s T2DM. DG10S478 je ve vazebné nerovnováze s pěti SNP; rs12255372, rs7903146, rs7901695, rs11196205 a rs7895340 (Grant, et al., 2006). Konkrétní mechanismy působení *TCF4* na T2DM stále nejsou zcela známé, ale vzhledem k faktu, že rizikové SNP se vyskytují v intronech *TCF4*, je oprávněné předpokládat, že ovlivňují regulační procesy. Jelikož existuje řada alternativně sestřihaných izoforem *TCF4*, předpokládá se, že rizikové SNP ovlivňují jejich expresi i alternativní sestřih (Hansson, et al., 2010). Xia et al. (2015) zkoumali proteiny asociované s rs7903146 variantou a objevili vazbu PARP1 (z angl. poly (ADP-ribose) polymerase 1) v této oblasti tohoto polymorfismu. *TCF4* interaguje s proteinovým komplexem obsahujícím PARP1 a vytvoří komplex, který zpětnou vazbou reguluje *TCF4*. Konkrétní forma, kterou tato interakce bere je ale stále předmětem studia. (Xia, et al., 2015). Význam této interakce je evidentní; PARP1 aktivace je častá u pacientů i v rizikových skupinách (Szabó, et al., 2002) a PARP1 inhibitory jsou úspěšné v zmírnění příznaků diabetických komplikací (Ilnytska, et al., 2006).

*TCF4* jako takový reguluje buněčně-specifickou expresi genu proglukagon (*Gcg*) který kóduje inkretin hormon GLP1 (z angl. Glucagon-like peptide-1) (Yi, et al., 2005). GLP1 je 30 aminokyselin dlouhý peptidový hormon produkovaný intestinálními endokrinními L-buňkami. Má mnoho metabolických funkcí, z nichž nejdůležitější je stimulace sekrece inzulínového hormonu a inhibice sekrece glukagonu, čímž se významně zaslouhuje za snížení koncentrace glukózy v krvi. Mimo jiné také funguje jako „brzda“ gastrointestinální motility, fyziologický regulátor pro chuť k jídlu a příjem potravy, stimulator buněčné proliferace, umírňuje zánětlivé procesy a apoptózu a má i mnohé další funkce, které jsou nad rámec této práce. Rekombinantní analogy tohoto hormonu – GLP1R – byly úspěšně použity k léčbě T2DM a další klinické studie ukazují optimistické prognózy v léčbě obezity – shrnuto v; (Müller, et al., 2019).

Gen *Gcg* je transkribován v  $\alpha$ -buňkách pankreatických ostrůvků, intestinálních endokrinních L buňkách a určitých neurálních buňkách v mozku. I přesto že je přepisována identická *GCG* mRNA a translatován identický prohormon, díky posttranslačním modifikacím dochází k tkáňově-specifické produkci tří různých peptidických hormonů – glukagon, GLP1 a GLP2 – s diametrálně rozlišnými funkcemi (Yi, et al., 2005).

Yi et al. (2005) navrhli, že gen *GCG* je nejspíš cílovým genem *TCF4* v intestinálních endokrinních buňkách, nikoli však v buňkách pankreatu, kde nebyla zaznamenána exprese *TCF4* (Yi, et al., 2005). Jejich úvaha se ale ukázala jako chybná, protože *TCF4* je exprimován ve většině lidských tkání, včetně pankreatických  $\beta$ -buněk, s výjimkou kosterního svalstva (Cauchi, et al., 2006). Shao et al. (2013) ve své studii použili transgenní myši s dominantně negativním lidským *TCF4* genem, exprimovaným specificky v proglukagon-pozitivních buňkách. Tyto myši ukázaly sníženou expresi proglukagonu v mozku a střevě, nikoliv však v pankreatu. Při běžném krmení u myši vzrostla hladina glukózy v plasmě a byla zaznamenána snížená produkce insulinu, nicméně homeostáza glukózy nebyla signifikantně narušena. Při krmení vysoce tučnou stravou se ale tyto efekty prohloubily a způsobily kompenzační zvýšení množství  $\beta$ -buněk. Celkově, i přes ztrátu 40-78 % střevní exprese *Gcg* mRNA a 58 % buněk produkujících *Glp1*, myši byly stále schopné sekretovat normální množství *Glp1*, což ukazuje na to, že savci mají silnou kompenzační kapacitu pro tento systém (Shao, et al., 2013).

I přes tuto kapacitu pro kompenzaci, rizikové alely *TCF4* (konkrétně rs12255372 a rs7903146) jsou asociované se sníženou inzulinovou odpovědí na glukózu u nediabetiků. Alela rs12255372 byla rovněž spojena s prediabetes (porušenou glykemií nalačno) (Munoz, et al., 2006). V rizikových genotypech *TCF4* byl potvrzen snížený inkretinový efekt<sup>4</sup>. Pacienti nesoucí rizikovou T alelu rs7903146 vykazují slabší inzulinovou odpověď na orální podání glukózy než intravenózní, což naznačuje defekt v enteroinzulární ose. Oslabení efektu může být způsobeno jak sníženou sekrecí, tak sníženým efektem inkretinových hormonů (Lyssenko, et al., 2007).

Ve stejné studii Lyssenko et al. (2007) zjistili zvýšenou expresi *TCF4* v  $\beta$ -buňkách pankreatických ostrůvků u T2DM pacientů. Exprese *TCF4* silně pozitivně korelovala s expresí inzulinového genu a zároveň (paradoxně) negativně korelovala s glukózou-stimulovanou

---

<sup>4</sup> Podání glukózy orálně způsobuje vyšší produkci insulinu, než kdyby byla podána intravenózně díky produkci inkretinů (GIP a GLP1) střevní stěnou. Inkretiny působí na pankreas přes inkretinové receptory. Tento efekt bývá defektní u pacientů s T2DM, shrnuto v; (Nauck & Meier, 2016).

sekrecí inzulínu z buněk. Tato korelace byla silnější u jedinců nesoucích rizikový genotyp (Lyssenko, et al., 2007). TCF4 má také roli v udržování proliferace a životaschopnosti  $\beta$ -buněk a změny v hladině TCF4 u nosičů rizikového genotypu mohou být důvodem pro defekty sekrece inzulínu a progresi T2DM (Shu, et al., 2009).

Objev asociace TCF4 s T2DM zůstává významným milníkem ve studiu této komplexní nemoci. I když všechny mechanismy jeho působení a jejich efekt na vývoj T2DM nejsou známy, tato oblast zůstává předmětem studia a mohla by se ukázat jako stěžejní ve vysvětlení etiopatogeneze T2DM.

## 7. Závěr

Střevní epitel tvoří dynamickou strukturu, která se neustále obměňuje. Tělo se těmito procesy snaží opravovat poškození, které vznikají průchodem tráveniny a působením silných žaludečních a pankreatických šťáv. Homeostáza je udržována populací rychle se obměňujících kmenových buněk umístěných na dně krypt.

Na řízení procesů proliferace, diferenciaci a lokalizaci buněk ve střevním epitelu se v různé míře podílejí četné signální dráhy, ale nejvýznamnější roli hraje dráha Wnt, která je zodpovědná za embryonální vývoj i homeostázu dospělého střeva. V rámci signalizace Wnt je ve střevě nejvýznamnějším hráčem efektor TCF4, který je zodpovědný za udržování proliferativního kompartmentu krypty. Působí například na *MYC*, transkripční aktivátor podporující replikaci a buněčný růst, i další geny podporující buněčnou „kmenovost“.

Dříve se předpokládalo, že TCF4 je onkogenem řídícím proliferativní procesy v kolorektálním karcinomu po ztrátě APC (silný supresor signalizace Wnt). Tyto teorie byly do jisté míry potvrzeny; konstitutivní aktivace TCF4 způsobuje formaci nádorů a přechod z diferenciováného křovitého epitelu na fenotyp podobný kryptě. Nicméně v posledním desetiletí začíná převažovat názor, že TCF4 ve skutečnosti působí jako tumorový supresor a negativní regulátor. I nejnovější studie si ale často vzájemně odporují v jejich názorech na terapeutický potenciál inhibice TCF4. Odpověď směřující tyto diametrálně odlišné názory zřejmě tkví v alternativním sestřihu *TCF4* a produkci různých izoform s diametrálně odlišnými funkcemi. Znalost konkrétního působení izoform v CRC a mutací v regulačních oblastech, které vedou k jejich produkci, by v budoucnu mohla přinést spolehlivější prognózy a umožnit lepší optimalizaci terapií.

V druhé z vybraných patologií, Crohnově chorobě, je diskutován vliv rizikových alel *TCF4* na Panethovy buňky a jejich produkty. Snížená exprese TCF4, a s ní spojená snížená exprese  $\alpha$ -defenzinů, je již dlouho asociována s ileální Crohnovou chorobou. Nedostatek obou kompromituje antimikrobiální schopnosti epitelu a zřejmě se podílí na spuštění této nemoci. Nejnovější klinické studie zkoumající efekt orálního podání  $\alpha$ -defenzinů mají zatím pozitivní výsledky a mohly by se ukázat slibnou novou terapií pro léčbu ulcerativní kolitidy i Crohnovy nemoci (Zeng, et al., 2020). Obdobně, stimulace kmenových buněk Rspo1 (agonista dráhy Wnt) vede k jejich diferenciaci v Panethovy buňky a zvýšení sekrece  $\alpha$ -defenzinů. Tato léčba se ukázala jako účinná i v prevenci reakce štěpu proti hostiteli po transplantacích (Hayase, et al., 2017).

Poslední diskutovanou chorobou v této práci je diabetes mellitus 2. typu. Efekt TCF4 na vývoj této patologie není jednoznačný, ale *TCF4* je dodnes označován za gen s nejsilnějším dědičným vlivem na vývoj diabetu. Jeho rizikové alely se objevují u zhruba 1/5 všech pacientů. Vliv rizikových alel TCF4 na produkci inkretinového hormonu GLP1 je pouze jedním ze způsobů, kterým mohou ovlivňovat vývoj diabetes u pacientů. Pro budoucí klinické využití by bylo vhodné popsat efekt rizikových alel v kontextu celého organismu.

Funkce TCF4 jsou různé, často tkáňově specifické a závislé na konkrétní izoformě. Mezi nejdůležitější patří udržení homeostázy dělících se buněk. Lze ho najít v téměř všech tkáních v těle, v dospělosti je ho ale nejvíce v epitelu střeva. Hraje významnou roli v mnohých komplexních patologiích sužujících člověka, a i proto je dnes nejspíše nejvíce zkoumaným efektozem signální dráhy Wnt. Lze předpokládat, že i do budoucna pravděpodobně zůstane atraktivním předmětem studia.

## 8. Seznam použité literatury

- Agalliu, I. a další, 2008. Evaluation of a variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and prostate cancer risk in a population-based study. *The Prostate*, 68(7), pp. 740-747.
- Angus-Hill, M. L., Elbert, K. M., Hidalgo, J. & Capecchi, M. R., 2011. T-cell factor 4 functions as a tumor suppressor whose disruption modulates colon cell proliferation and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), pp. 4914-4919.
- Atcha, F. A. a další, 2007. A Unique DNA Binding Domain Converts T-Cell Factors into Strong Wnt Effectors. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), pp. 8352-8363.
- Barker, N. a další, 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449(7165), pp. 1003-1007.
- Battle, E. a další, 2002.  $\beta$ -Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB. *Cell*, 111(2), pp. 251-263.
- Beumer, J. & Clevers, H., 2021. Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(1), pp. 39-53.
- Bevins, C. L. & Salzman, N. H., 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), p. 356–368.
- Bhanot, P. a další, 1996. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382(6588), p. 225–230.
- Bjerknes, M. & Cheng, H., 1981. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from paneth cells in the adult mouse. *American Journal of Anatomy*, 160(1), pp. 51-63.
- Buczacki, S. J. A. a další, 2013. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*, 495(7439), p. 65–69.
- Cauchi, S. a další, 2006. Transcription Factor TCF7L2 Genetic Study in the French Population: Expression in Human  $\beta$ -Cells and Adipose Tissue and Strong Association With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 55(10), p. 2903–2908.
- Clevers, H., 2006. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), pp. 469-480.
- Clevers, H., 2013. The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell*, 154(2), pp. 274-284.
- Clevers, H. & Nusse, R., 2012. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149(6), pp. 1192-1205.
- Daniels, D. L. & Weis, W. I., 2005.  $\beta$ -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(4), p. 364–371.
- Dias, C. a další, 2021. De novo variants in TCF7L2 are associated with a syndromic neurodevelopmental disorder. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 185(8), pp. 2384-2390.
- Doubravská, L. a další, 2011. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. *Cellular Signalling*, 23(5), pp. 837-848.

- Es, J. H. v. a další, 2012. A Critical Role for the Wnt Effector Tcf4 in Adult Intestinal Homeostatic Self-Renewal. *Molecular and Cellular Biology*, 32(10), pp. 1918-1927.
- Es, J. H. v. a další, 2012. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nature Cell Biology*, 14(10), pp. 1099-1104.
- Es, J. H. v. a další, 2019. Enteroendocrine and tuft cells support Lgr5 stem cells on Paneth cell depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(52), pp. 26599-26605.
- Fafilek, B. a další, 2013. Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts With Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology*, 144(2), pp. 381-391.
- Fang, M. a další, 2006. C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 25(12), pp. 2735-2745.
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P. & Bodmer, W. F., 2001. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, 10(7), p. 721-733.
- Fellermann, K. a další, 2006. A Chromosome 8 Gene-Cluster Polymorphism with Low Human Beta-Defensin 2 Gene Copy Number Predisposes to Crohn Disease of the Colon. *The American Journal of Human Genetics*, 79(3), pp. 439-448.
- Gerbe, F. & Jay, P., 2016. Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunology*, 9(6), pp. 1353-1359.
- Grant, S. F. A. a další, 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, 38(3), p. 320-323.
- Gribble, F. M. & Reimann, F., 2016. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*, Svazek 78, pp. 277-299.
- Hampe, J. a další, 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *The Lancet*, 357(9272), pp. 1925-1928.
- Hansson, O., Zhou, Y., Renström, E. & Osmark, P., 2010. Molecular Function of TCF7L2: Consequences of TCF7L2 Splicing for Molecular Function and Risk for Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 10(6), p. 444-451.
- Hayase, E. a další, 2017. R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine*, 214(12), p. 3507-3518..
- Herr, P. & Basler, K., 2012. Porcupine-mediated lipidation is required for Wnt recognition by Wls. *Developmental Biology*, 361(2), pp. 392-402.
- Hrckulak, D. a další, 2018. Wnt Effector TCF4 Is Dispensable for Wnt Signaling in Human Cancer Cells. *Genes*, 9(9), p. 439.
- Hrckulak, D., Kolar, M., Strnad, H. & Korinek, V., 2016. TCF/LEF Transcription Factors: An Update from the Internet Resources. *Cancers*, 8(7).
- Ilnytska, O. a další, 2006. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Alleviates Experimental Diabetic Sensory Neuropathy. *Diabetes*, 55(6), p. 1686-1694.
- Jadhav, U. a další, 2017. Dynamic Reorganization of Chromatin Accessibility Signatures during Dedifferentiation of Secretory Precursors into Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 21(1), pp. 65-77.e5.

- Katoh, M., 2005. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (Review). *Oncology Reports*, 14(6), pp. 1583-1588.
- Kierszenbaum, A. L., 2007. *Histology and Cell Biology, An Introduction to Pathology*. 2 editor místo neznámé: MOSBY Elsevier.
- Kim, K.-A. a další, 2005. Mitogenic Influence of Human R-Spondin1 on the Intestinal Epithelium. *Science*, 309(5738), pp. 1256-1259.
- Kim, T.-H. a další, 2016. Single-Cell Transcript Profiles Reveal Multilineage Priming in Early Progenitors Derived from Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Reports*, 16(8), pp. 2053-2060.
- Kim, Y. S. & Ho, S. B., 2010. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), p. 319–330.
- Kohn, A. D. & Moon, R. T., 2005. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38(3-4), pp. 439-446.
- Korinek, V. a další, 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genetics*, 19(4), p. 379–383.
- Korinek, V. a další, 1997. Constitutive Transcriptional Activation by a  $\beta$ -Catenin-Tcf Complex in APC<sup>-/-</sup> Colon Carcinoma. *Science*, 275(5307), pp. 1784-1787.
- Korkut, C. a další, 2009. Trans-Synaptic Transmission of Vesicular Wnt Signals through Evi/Wntless. *Cell*, 139(2), pp. 393-404.
- Koslowski, M. J. a další, 2009. Genetic Variants of Wnt Transcription Factor TCF-4 (TCF7L2) Putative Promoter Region Are Associated with Small Intestinal Crohn's Disease. *PLOS ONE*, 4(2), p. e4496.
- Kuhnert, F. a další, 2003. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), pp. 266-271.
- Kusserow, A. a další, 2005. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature*, 433(7022), p. 156–160.
- Lau, W. d. a další, 2011. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 476(7360), pp. 293-297.
- Lebl, J., Janda, J., Pohunek, P. & Starý, J., 2014. *Klinická pediatrie*. 1 online zdroj (698 stran) editor Praha: Galén.
- Leblond, C. P. & Messier, B., 1958. Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine-H3 into mice. *The Anatomical Record*, 132(3), pp. 247-259.
- Li, X. a další, 2015. Drosophila p24 and Sec22 regulate Wingless trafficking in the early secretory pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(4), pp. 483-489.
- Lopez-Garcia, C., Klein, A. M., Simons, B. D. & Winton, D. J., 2010. Intestinal Stem Cell Replacement Follows a Pattern of Neutral Drift. *Science*, 330(6005), pp. 822-825.
- Lustig, B. a další, 2002. Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), pp. 1184-1193.

- Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B. & Baltimore, D., 2004. Mammalian Ryk Is a Wnt Coreceptor Required for Stimulation of Neurite Outgrowth. *Cell*, 119(1), pp. 97-108.
- Lyssenko, V. a další, 2007. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, Svazek 117, p. 2155–2163.
- Mabbott, N. A. a další, 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology*, 6(4), pp. 666-677.
- Madara, J. L., 1982. Cup Cells: Structure and Distribution of a Unique Class of Epithelial Cells in Guinea Pig, Rabbit, and Monkey Small Intestine. *Gastroenterology*, 83(5), pp. 981-994.
- Mao, J. a další, 2001. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Molecular Cell*, 7(4), pp. 801-809.
- Mehta, S., Hingole, S. & Chaudhary, V., 2021. The Emerging Mechanisms of Wnt Secretion and Signaling in Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(1), pp. 1-17.
- Mihara, E. a další, 2016. Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ $\alpha$ -albumin. *eLife*, Svazek 5, p. e11621.
- Miller, J. R., 2001. The Wnts. *Genome Biology*, Svazek 3.
- Müller, T. a další, 2019. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism*, Svazek 30, pp. 72-130.
- Munoz, J. a další, 2006. Polymorphism in the Transcription Factor 7-Like 2 (TCF7L2) Gene Is Associated With Reduced Insulin Secretion in Nondiabetic Women. *Diabetes*, 55(12), p. 3630–3634.
- Naidu, R., Yip, C. H. & Taib, N. A. M., 2012. Genetic variations in transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene: association of TCF7L2 rs12255372(G/T) or rs7903146(C/T) with breast cancer risk and clinico-pathological parameters. *Medical Oncology*, 29(2), p. 411–417.
- Nauck, M. A. & Meier, J. J., 2016. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 4(6), pp. 525-536.
- Neutra, M. R., Frey, A. & Kraehenbuhl, J.-P., 1996. Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. *Cell*, 86(3), pp. 345-348.
- Nusse, R., 2023. *the Wnt homepage*, místo neznámé: autor neznámý
- Nusse, R. & Varmus, H. E., 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1), pp. 99-109.
- Ozawa, M., Baribault, H. & Kemler, R., 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species.. *The EMBO Journal*, 8(6), pp. 1711-1717.
- Panáková, D. a další, 2005. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature*, 435(7038), p. 58–65.
- Patel, J. a další, 2014. Inhibition of C-terminal binding protein attenuates transcription factor 4 signaling to selectively target colon cancer stem cells. *Cell Cycle*, 13(22), pp. 3506-3518.

- Ramirez, C. & Gebert, A., 2003. Vimentin-positive Cells in the Epithelium of Rabbit Ileal Villi Represent Cup Cells but not M-cells. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(11), p. 1533–1544.
- Ren, Q., Chen, J. & Liu, Y., 2021. LRP5 and LRP6 in Wnt Signaling: Similarity and Divergence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(670960).
- Rijsewijk, F. a další, 1987. The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, 50(4), pp. 649-657.
- Rousset, R. a další, 2001. naked cuticle targets dishevelled to antagonize Wnt signal transduction. *Genes & Development*, 15(6), pp. 658-671.
- Routledge, D. & Scholpp, S., 2019. Mechanisms of intercellular Wnt transport. *Development*, 146(10).
- Saito-Diaz, K. a další, 2018. APC Inhibits Ligand-Independent Wnt Signaling by the Clathrin Endocytic Pathway. *Developmental Cell*, 44(5), pp. 566-581.e8.
- Sancho, E., Batlle, E. & Clevers, H., 2004. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), pp. 695-723.
- Sasaki, N. a další, 2016. Reg4<sup>+</sup> deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5<sup>+</sup> stem cells in colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(37), pp. E5399-E5407.
- Sato, T. a další, 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), p. 262–265.
- Sauer, B. & Henderson, N., 1989. Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Research*, 17(1), p. 147–161.
- Serralbo, O. & Marcelle, C., 2014. Migrating cells mediate long-range WNT signaling. *Development*, 141(10), p. 2057–2063.
- Shao, W. a další, 2013. The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 Controls Gut and Brain Proglucagon Gene Expression and Glucose Homeostasis. *Diabetes*, 62(3), pp. 789-800.
- Shu, L. a další, 2009. Transcription Factor 7-Like 2 Regulates  $\beta$ -Cell Survival and Function in Human Pancreatic Islets. *Diabetes*, 57(3), p. 645–653.
- Sikora, K. a další, 1987. c-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer*, 59(7), pp. 1289-1295.
- Snippert, H. J. a další, 2010. Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell*, 143(1), pp. 134-144.
- Snoeck, V., Goddeeris, B. & Cox, E., 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and Infection*, 7(7-8), pp. 997-1004.
- Specian, R. D. & Oliver, M. G., 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 260(2), pp. C183-C193.
- Stamos, J. L. & Weis, W. I., 2012. The  $\beta$ -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1).
- Su, L. K. a další, 1992. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*, 256(5057), pp. 668-670.

- Sun, J. a další, 2017. A Wntless–SEC12 complex on the ER membrane regulates early Wnt secretory vesicle assembly and mature ligand export. *Journal of Cell Science*, 130(13), p. 2159–2171.
- Szabó, C. a další, 2002. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Is Activated in Subjects at Risk of Developing Type 2 Diabetes and Is Associated With Impaired Vascular Reactivity. *Circulation*, 106(21), pp. 2680-2686.
- Tang, W. a další, 2008. A genome-wide RNAi screen for Wnt/ $\beta$ -catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28), pp. 9697-9702.
- Tetteh, P. W. a další, 2016. Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Cell Stem Cell*, 18(2), pp. 203-213.
- Tian, H. a další, 2011. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 478(7368), pp. 255-259.
- Tong, Y. a další, 2009. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BCM Medical Genetics*, 10(1).
- Torres, K., Labrador, L., Valderrama, E. & Chiurillo, M. A., 2016. TCF7L2 rs7903146 polymorphism is associated with gastric cancer: A case-control study in the Venezuelan population. *World Journal of Gastroenterology*, 22(28), p. 6520–6526.
- Vacik, T., Stubbs, J. L. & Lemke, G., 2011. A novel mechanism for the transcriptional regulation of Wnt signaling in development. *Genes & Development*, 25(17), pp. 1783-1795.
- Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K., 2012. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *The EMBO Journal*, 31(12), pp. 2714-2736.
- Valenta, T., Lukas, J. & Korinek, V., 2003. HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acid Research*, 31(9), p. 2369–2380.
- Wehkamp, J. a další, 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. *Gut*, 53(11), pp. 1658-1664.
- Wehkamp, J. a další, 2005. Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), pp. 18129-18134.
- Wehkamp, J. a další, 2007. The Paneth Cell  $\alpha$ -Defensin Deficiency of Ileal Crohn's Disease Is Linked to Wnt/Tcf-4. *The Journal of Immunology*, 179(5), pp. 3109-3118.
- Weise, A. a další, 2010. Alternative splicing of Tcf7l2 transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt/ $\beta$ -catenin targets. *Nucleic Acids Research*, 38(6), p. 1964–1981.
- Wenzel, J. a další, 2020. Loss of the nuclear Wnt pathway effector TCF7L2 promotes migration and invasion of human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 39(19), p. 3893–3909.
- Wetering, M. v. d. a další, 2002. The  $\beta$ -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells. *Cell*, 111(2), pp. 241-250.
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. & Jürgens, G., 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux' Archiv*, 193(5), p. 296–307.

- Willert, K. a další, 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), pp. 448-452.
- Winston, J. T. a další, 1999. The SCF $\beta$ -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I $\kappa$ B $\alpha$  and  $\beta$ -catenin and stimulates I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination in vitro. *Genes & Development*, 13(3), pp. 270-283.
- Xia, Q. a další, 2015. Characterization of the transcriptional machinery bound across the widely presumed type 2 diabetes causal variant, rs7903146, within TCF7L2. *European Journal of Human Genetics volume*, 23(1), p. 103–109.
- Yamamoto, H. a další, 2013. The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms. *Journal of Cell Science*, 126(13), p. 2931–2943.
- Yan, K. S. a další, 2017. Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell Stem Cell*, 21(1), pp. 78-90.e6.
- Yan, K. S. a další, 2011. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), pp. 466-471.
- Yi, F., Brubaker, P. L. & Jin, T., 2005. TCF-4 Mediates Cell Type-specific Regulation of Proglucagon Gene Expression by  $\beta$ -Catenin and Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ \*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), pp. 1457-1464.
- Yu, J. a další, 2014. WLS Retrograde Transport to the Endoplasmic Reticulum during Wnt Secretion. *Developmental Cell*, 29(3), pp. 277-291.
- Zeng, C.-M., Chen, Z. & Fu, L., 2018. Frizzled Receptors as Potential Therapeutic Targets in Human Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), pp. 1-18.
- Zeng, L. a další, 2020. An engineering probiotic producing defensin-5 ameliorating dextran sodium sulfate-induced mice colitis via Inhibiting NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Translational Medicine*, 18(107).