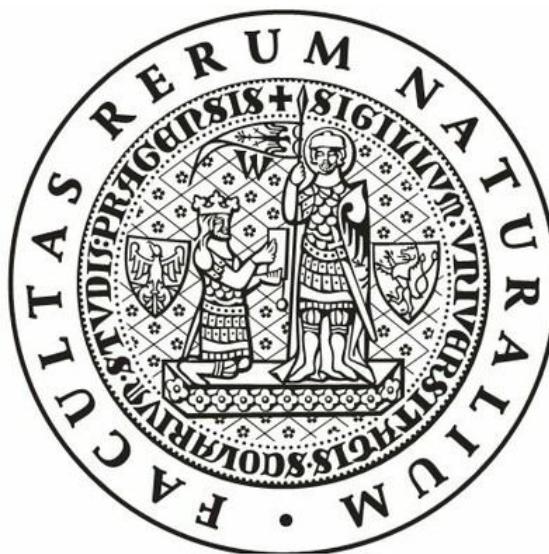


Charles University in Prague
Faculty of Science
Department of Biochemistry

Ph.D. study program: Biochemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



Michaela Krausová

**Molecular mechanisms and components controlling
the Wnt signaling pathway output**

Supervisor: Vladimír Kořínek, Ph.D.

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

Prague, 2013

Contents

1. List of abbreviations.....	3
2. Abstract	4
3. Introduction.....	5
3.1 The Wnt signaling pathway	5
3.2 Wnt signaling in homeostasis and malignant transformation of the intestinal epithelium.....	7
4. Aims of the study	9
5. Material and methods	10
6. Results and discussion	10
6.1. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling.....	10
6.2. Generation of two modified mouse alleles of the <i>Hic1</i> tumor suppressor gene ..	11
6.3 Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts with Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells	11
6.4 Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue.	13
7. Conclusions.....	13
8. References.....	14
9. Curriculum vitae	16

1. List of abbreviations

APC	Adenomatous Polyposis Coli
Axin	Axis Inhibition protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CBC	Crypt Base Columnar
cDNA	complementary DNA
ChIP-on-chip	Chromatin Immunoprecipitation in combination with DNA microarrays
CK1 α	Casein Kinase 1 α
CreERT2	Cre recombinase fused to the ligand binding domain of the Estrogen Receptor (regulated by 4-hydroxytamoxifen)
CSCs	Cancer Stem Cells
DLL	Delta-Like Ligand
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase 3
Hic1	Hypermethylated In Cancer 1
HMG	High Mobility Group
IRES	Internal Ribosome Entry Site
LEF	Lymphocyte-Enhancer-binding Factor
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor
LRP	Low density lipoprotein Receptor-related Protein
N-(linked) glycosylation	Asparagine-(linked) glycosylation
O-linked	Serine-linked
PCP	Planar Cell Polarity
RNA	Ribonucleic Acid
RNAi	RNA interference
RT-qPCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
S-palmitoylation	Cysteine-palmitoylation
TA	Transit-Amplifying
TCF	T-Cell Factor
Tcf7l2	gene encoding for Tcf4
Troy	Tumor necrosis factor Receptor family member ubiquitously expressed in the whOle embrYo

2. Abstract

Beyond its essential roles in embryonic development, the Wnt-mediated signal transduction cascade is critically implicated in homeostasis of adult tissues. In the gastrointestinal epithelium, the threshold of active Wnt signaling is kept in a physiological range by a spectrum of regulatory networks and loops, thereby balancing the opposing processes of cell fate determination, proliferation and stem cell self-renewal. Furthermore, compelling evidence undoubtedly link an aberrant Wnt activity to the onset of bowel cancer. Understanding the principle causes and effects secondary to excessive Wnt signaling can provide valuable insights into the pathology of the malignant transformation of the colorectum. The proposed thesis attempts to focus on novel modes of the Wnt pathway modulation; both general and context-specific nuances of the Wnt level adjustment are thereby delineated. The results are presented in three distinct research publications and one review article.

The first study examines the contribution of the distinct post-translational modifications, which the Wnt proteins undergo, to their proper processing, secretion and signaling activity. First, we investigated the sequential order and mutual interdependence of cysteine and serine-linked fatty acylation and N-linked glycosylation of murine Wnt1 and Wnt3a proteins. Our data indicate that the attachment of palmitoleic acid to a conserved serine residue precedes and is mandatory for the subsequent S-linked palmitation. Regarding the sequence of the acylation-glycosylation events, initial linkage of the oligosaccharide chains most likely conditions the succeeding double-acyl modification. Lastly, linkage of the fatty acyls presumably underlies the protein's ability to associate with extracellular matrix; a critical feature to the signaling competency of the Wnt ligand as revealed.

The second scientific report delivers a thorough characterization of two novel gene-targeted alleles of the murine *Hic1* gene; a recognized tumor suppressor gene that encodes for a negative regulator of the Wnt pathway. A conditional *Hic1* gene knock-out allele and a citrine (a monomeric derivative of the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP)) reporter knock-in mouse strain greatly facilitate the research of *Hic1* physiological roles and visualize *Hic1* endogenous distribution, respectively.

The third article identifies TROY, a member of the Tumor Necrosis Factor Receptor family, as a novel negative modulator of the Wnt pathway and in addition, confirms its status as a context-specific Wnt target gene. Importantly, in the intestinal epithelium the Troy expression is demonstrated to be restricted to the fast cycling stem cells, thereby defining Troy as a novel marker of these unique cells. In there, Troy likely interacts with the prominent stem cell specifier leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor (Lgr5) to reduce the local level of the Wnt pathway activity. Lastly, elevated amounts of Troy were observed in lesions arising upon genetically defined, the Wnt-pathway driven mouse models of hereditary or induced bowel cancer. On the contrary, collected samples of human sporadic colorectal cancer indicated a different pattern of *TROY* tumoral deregulation in humans.

Finally, the review article summarizes the principal signaling pathways that govern the architecture and homeostasis of the gastrointestinal tract. Ranging from the Wnt/β-catenin and Notch pathways to circuits triggered by Hedgehog, EGF or BMP ligands, all cascades are discussed in detail with respect to their fundamental roles both in physiology and malignant transformation of the gut.

3. Introduction

The Wnt proteins act in metazoans as morphogens to regulate diverse processes throughout the embryonic development. These include strictly orchestrated developmental events such as convergent extension movements or body axis specification. In the adulthood, Wnt/β-catenin signaling is essential for maintenance of somatic stem cells and committed progenitor compartments. The threshold of active signaling is thereby kept in a homeostatic range by a spectrum of regulatory networks and loops, that adjust the signaling level accordingly to the local requirement for the Wnt “just-right” dosage. Excessive signaling can lead to the onset of multiple disorders, in particular cancer. Conversely, low levels of the signaling activity probably underlie many degenerative conditions.

3.1 The Wnt signaling pathway

Overall, there are three distinct branches of Wnt signaling:

1. the β-catenin pathway (*the canonical pathway*), depending on β-catenin and members of the lymphocyte-enhancer-binding factor/T-cell factor, HMG box (LEF/TCF) family of transcriptional factors
2. the planar cell polarity (PCP) pathway, lacking both β-catenin and low density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) involvement
3. the Wnt-Ca²⁺ pathway (the latter two both assigned to as *non-canonical* or *β-catenin-independent pathways*)

Canonical Wnt signaling is predominantly regulated at the level of its key transducer and effector, the bifunctional protein β-catenin. Besides its structural engagement in cadherin-based adherens junctions (Ozawa et al., 1989), β-catenin partners as a transcription co-activator with DNA-binding gene regulatory factors of the LEF/TCF family to modulate expression of dedicated target genes (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). The most prominent Wnt target genes encode intrinsic components of the pathway, thereby providing elegant tools for negative feedback-loop (Jho et al., 2002) or positive feed-forward (Barker et al., 2007) regulation modes (**Figure 1**).

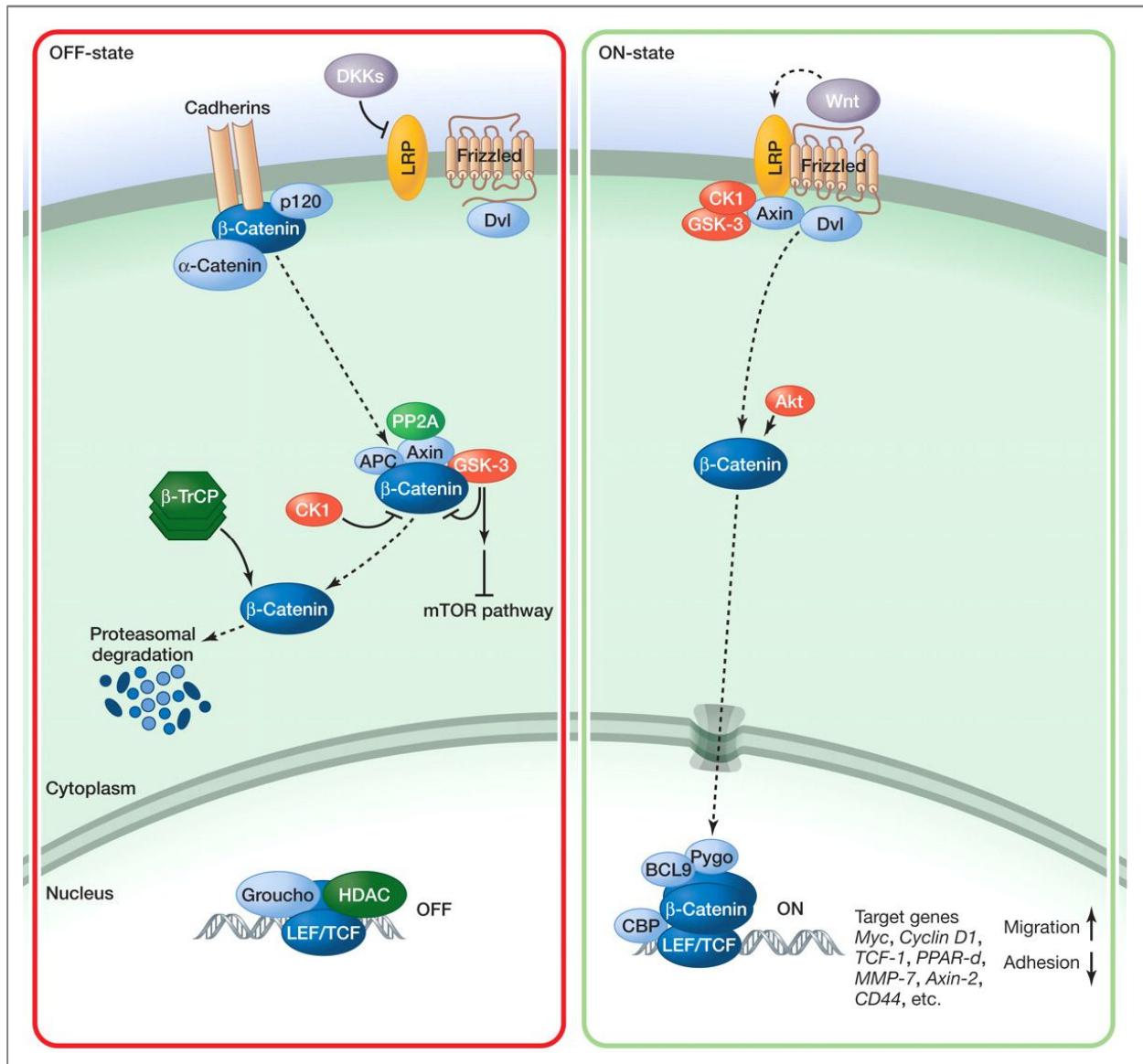


Figure 1 | Canonical Wnt signaling

The central feature of the canonical pathway is the post-translational control of the β -catenin protein stability. In the absence of a Wnt ligand (The Wnt-OFF state; left panel), the intracellular level of β -catenin is kept constantly low due to the activity of a large degradation complex. Adenomatous Polyposis Coli (APC) protein assembles with Axis Inhibition protein (Axin) to create a scaffold for Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) and Casein Kinase 1 α (CK1 α). Captured β -catenin is phosphorylated and subsequently destructed in the ubiquitin-proteasome pathway. In unstimulated cells, the Wnt responsive loci are thus kept inactive by Groucho family of transcriptional repressors. In contrast, presentation of a Wnt ligand to its Frizzled and LRP co-receptors (The Wnt-ON state; right panel) recruits Axin-GSK-3 β complexes to LRP cytoplasmic tails. β -catenin “escapes” its degradation and shuttles to the nucleus. Once in there, it acts as a transcriptional co-activator that, in concert with the gene regulatory factors of the LEF/TCF family, modulates expression of the Wnt target genes. Image adopted from (Nusse, 2012).

3.2 Wnt signaling in homeostasis and malignant transformation of the intestinal epithelium

The lining of the gastrointestinal tract is composed of a one-cell-layer epithelial sheet, which penetrates into the underlying connective tissue of lamina propria to form tubular glands called crypts. In addition, luminal protrusions of the mucosa termed villi are present in the small intestine to further enhance the surface area. The intestinal epithelium represents one of the most intensively self-replenishing organs in mammals. The homeostasis is sustained by crypt-resident intestinal stem cells that frequently divide to give rise to a pool of highly proliferative, multipotent progenitors called transit-amplifying (TA) cells. These cells undergo several rounds of cell divisions and commence differentiation towards all intestinal lineages as they migrate upwards the crypt length. Once reaching the crypt orifice, the villi then already receive a mixture of fully mature cells that fulfill the digestion-associated functions of the tissue (**Figure 2**).

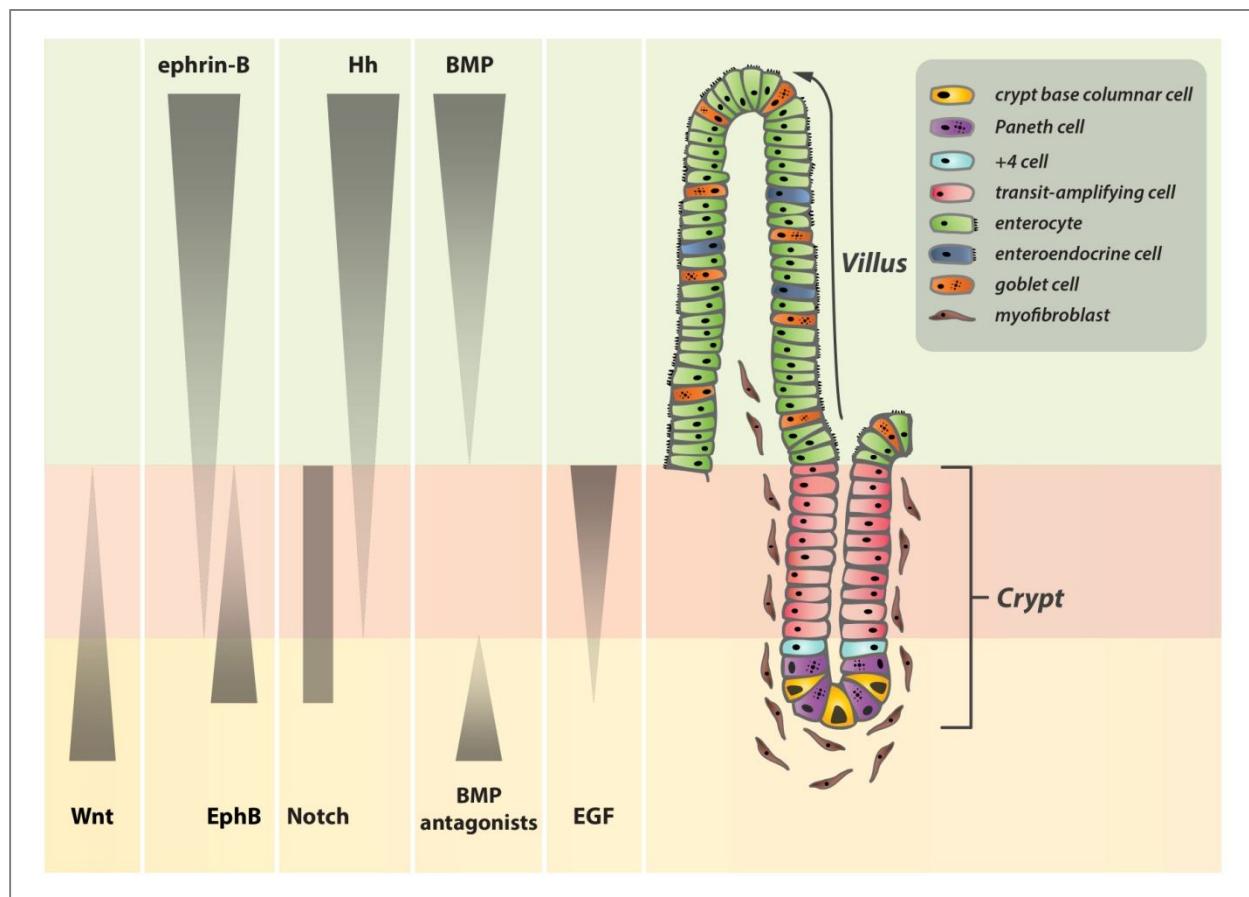


Figure 2 | Architecture of the small intestine epithelium and pathways governing its fate

The intestinal homeostasis is sustained by crypt-base columnar (CBC) stem cells (depicted in yellow) that occupy the crypt floor in positions alternating to post-mitotic Paneth cells (violet). A separate pool of more quiescent stem cells has been proposed to reside at the +4 position (light blue). The pluripotency and proliferation of the stem cells is maintained by Wnt cues, redundantly supplied by the stem-neighboring Paneth cells and subepithelial myofibroblasts (brown). The latter niche

moreover releases Bone morphogenetic protein (BMP) antagonists that locally counteract the pro-differentiation activity of the BMP proteins. On division, the stem cells stochastically self-renew or give rise to committed daughter cells (pink). These transit-amplifying cells move up the villus flanks (arrow) and terminally differentiate towards all intestinal lineages - the predominant absorptive enterocytes (green), and secretory goblet (orange) and enteroendocrine cells (dark blue) that produce mucus and release peptide hormones, respectively. Once reaching the villus top, the cells undergo anoikis and are shed to the intestinal lumen. The only exception are long-lived postmitotic Paneth cells that stay at the bottom of the crypt. The proper homeostasis of the intestinal epithelium is regulated by an interconnected network of principal signaling pathways that govern the balance between proliferation and lineage specification. Image adopted from (Krausova and Korinek, 2012).

The stem-permissive environment is considered to be constituted by the stem-neighboring Paneth cells (Sato et al., 2011) and subepithelial myofibroblasts that tightly line the crypt base basal lamina (Kosinski et al., 2007). This close association facilitates direct supply of CBC cells with essential pro-proliferative factors that include Paneth-derived Delta-like ligand (DII), Epidermal growth factor (EGF) and Wnt3 ligands, or mesenchyme-secreted Wnt2b, respectively (Farin et al., 2012; Sato et al., 2011). Numerous studies conducted both *in vivo* and *in vitro* have firmly established the role of Wnt signaling in preservation of stem cell proliferation and pluripotency. Disruption of the pathway's ultimate effectors *Tcf4* (alias *Tcf7l2*) (Korinek et al., 1998) or β -catenin (Fevr et al., 2007) are phenotypically associated with demise of the intestinal crypts. Conversely, aberrant activation of the Wnt pathway heightens the stem cell numbers as demonstrated via injection of the Wnt agonist R-SPONDIN1 into mice (Kim et al., 2005).

Wnt signaling controls further important aspects of maintenance of the epithelial architecture. These include correct cell positioning along the crypt-villus axis (Battile et al., 2002) and proper commitment, morphological maturation and spatial orientation of the Paneth cells (Andreu et al., 2008).

The misregulation of Wnt signaling is associated with the onset of cancer, most notably of the gastrointestinal tract (Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1993). The majority of sporadic colorectal tumors arise upon biallelic loss of *APC* (CancerGenomeAtlasNetwork, 2012). Overactive Wnt signaling might be also secondary to mutational inactivation of the pathway negative regulators *AXIN1* (Shimizu et al., 2002), *AXIN2* (Liu et al., 2000), or upon hits that compromise regulatory elements of β -catenin (Morin et al., 1997). In either case, stabilized β -catenin mediates inappropriate transcriptional activation of the Wnt/TCF4 target genes thus driving pathological transformation of the gut epithelium (He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999). Homozygous deletion of *Apc* throughout the mouse intestinal epithelium instantly promotes cellular proliferation while impairing differentiation (Barker et al., 2009; Sansom et al., 2004). Affected cells thereby acquire aberrant "crypt-like" phenotype resulting in massive expansion of the stem cell compartment (Barker et al., 2009). Given the harsh operating environment the tissue is continuously exposed to, this condition clearly predisposes to the onset of cancer. Importantly, the cancer-initiating events occur within the stem cell pool as demonstrated by the *Apc* deletion in *Lgr5⁺* CBC cells

(Barker et al., 2009), or in case stabilized form of β -catenin is expressed in the more quiescent stem cell population (Sangiorgi and Capecchi, 2008). In addition, oncogenic alterations have to happen in the bottommost stem cells to be successfully propagated (Pin et al., 2012). Concurrent with this “bottom-up histogenesis” hypothesis (Preston et al., 2003), the acute loss of *Apc* in short-lived progenitors gave raise to microadenomas that failed to transform to malignancy (Barker et al., 2009).

Established tumors are heterogeneous by compositions, still they preserve a cellular hierarchy that is reminiscent of normal tissue architecture (Barker et al., 2009). Consistently, a minor subset of cells displays features shared with somatic stem cells such as self-renewal and pluripotency (Schepers et al., 2012). These cells sustain the progressive growth of the lesion and are therefore termed cancer stem cells (CSCs). CSCs are shaped by elevated Wnt presence (Shenoy et al., 2012; Vermeulen et al., 2010), which originates from their enclosed surroundings. In detail, metaplastic Paneth cells generate the CSC niche in proximal parts of the gut, while colonic CSCs are analogously propagated by deregulated deep crypt secretory cells (Schepers et al., 2012). In either case, both microenvironments provide CSCs with deviant stimuli that locally promote aberrant signaling.

Taken together, the Wnt signaling cascade is essential for proper maintenance of intestinal homeostasis. Signaling by the Wnt cues preserves pluripotency and proliferation of intestinal stem cell compartments. As such, the Wnt pathway is prone to fueling tumor growth if deregulated.

4. Aims of the study

The Wnt signaling cascade is one of the most prominent pathways that governs stem cell- and cancer-associated signaling circuits. As such, the threshold of the Wnt activity is modulated by intricate loops that allow for adjusting its level accordingly. Thus, to reveal novel modes of the Wnt pathway regulation we specifically focused on following aspects of the Wnt signal transmission:

1. **Post-translational modifications of the Wnt proteins.** The overall signaling activity of the Wnt morphogens is known to be fine-tuned by elaborate post-translational modifications. These attachments are supposed to govern the ligand-receptor interactions and/or influence other aspects that substantially determine the signaling competency of the Wnt ligands. However, the sequential order and mutual interdependence of the glycosylation and lipidation events remained elusive. Thus, we critically investigated the nature and functional relevance of the Wnt post-translational processing.

2. **Context-specific regulators of Wnt signaling.** In the intestinal epithelium, the Wnt pathway promotes maintenance of undifferentiated and proliferative stem cell compartments. The gut tissue thus represents an attractive paradigm in which to study the Wnt-governed processes. We focused on identification of novel, intestine-specific targets genes of the Wnt cascade. We prepared dedicated genetic tools to delineate the molecular mechanisms by which these genes contribute to physiological and/or malignant processes relevant to the gastrointestinal tract. Lastly, we collected samples of human sporadic colorectal carcinoma to examine the tumoral behavior of these genes in humans.

5. Material and methods

- Cloning of constructs dedicated for expression of recombinant proteins
- Cell culture and various means of transfecting cell lines
- Infection of cell lines using pseudotyped retroviruses and lentiviruses; generation of stably transduced cell lines
- Generation of recombinant proteins for immunization of animals (antigens); isolation and purification of antibodies
- Immunocytochemistry; confocal microscopy
- Immunohistochemistry on paraffin sections
- *In situ* hybridization on frozen sections
- Collection of clinical samples
- Isolation of RNA, cDNA synthesis, RT-qPCR
- Reporter gene assays
- RNAi techniques

6. Results and discussion

6.1. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling

Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine are prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling

Doubravská, L.* , Krausová, M.* , Gradiš, D., Vojtěchová, M., Tumová, L., Lukáš, J., Valenta, T., Pospíšilová, V., Fafílek, B., Plachý, J., Šebesta, O., Korinek, V.

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

* These authors contributed equally to this work.

Abstract:

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

6.2. Generation of two modified mouse alleles of the *Hic1* tumor suppressor gene

Generation of two modified mouse alleles of the *Hic1* tumor suppressor gene

Pospichalova, V., Tureckova, J., Fafilek, B., Vojtechova, M., Krausova, M., Lukas, J., Sloncova, E., Takacova, S., Divoky, V., Leprince, D., Plachy, J., Korinek, V.

Genesis. 2011 Mar;49(3):142-51. doi: 10.1002/dvg.20719.

Abstract:

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

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

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

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

Gastroenterology. 2013 Feb;144(2):381-91. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.048. Epub 2012 Nov 7

Abstract:

BACKGROUND & AIMS:

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

METHODS:

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

RESULTS:

We identified promoter regions of 960 genes that interacted with the Wnt pathway nuclear effector T-cell factor 4 in 4 different human colorectal cancer-derived cell lines; 18 of these promoters were present in all chromatin precipitates. Wnt signaling up-regulated a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily called TROY. Levels of *TROY* messenger RNA were increased in human cells with deficiencies in the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene and in cells stimulated with the Wnt3a ligand. Expression of Troy was significantly up-regulated in neoplastic tissues from mice during intestinal tumorigenesis. Lineage tracing experiments revealed that Troy is produced specifically by fast cycling intestinal stem cells. TROY associated with a unique marker of these cells, leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor (LGR) 5. In organoids established from the intestinal crypts, Troy suppressed signaling mediated by R-spondin, a Wnt agonist.

CONCLUSIONS:

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

6.4 Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue.

Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue.

Krausova, M., Korinek, V.

Neoplasma. 2012;59(6):708-718. doi: 10.4149/neo_2012_090.

Abstract:

Intestinal homeostasis is a complex and tightly regulated process governed by a variety of signalling pathways that balance cell proliferation and differentiation. As revealed by extensive use of defined mouse models, perturbations within the signalling circuitry trigger initial expansion of premalignant cells. In this review, we attempt to summarise recent advances in the knowledge of the cellular signalling mechanisms that drive tumorigenesis in the human and mouse intestine.

7. Conclusions

In our work, we provide novel modes of the Wnt pathway regulation. Those include both general and context-specific mechanisms that allow for fine-tuning the Wnt threshold accordingly to the local needs. The results are presented in three distinct research publications and one review article and can be summed up as follows:

1. We provide evidence for the sequential order and mutual interdependence of fatty acylation and N-linked glycosylation of murine Wnt1 and Wnt3a proteins. Initial linkage of the oligosaccharide structures most likely conditions the succeeding double-acyl modification. Secondly, the attachment of palmitoleic acid to a conserved serine residue precedes and is mandatory for the subsequent S-linked palmitation. The presence of the lipid moieties emerges essential to proper extracellular trafficking of the Wnt cues, thus underlying their signaling competency.
2. We generated two novel, genetically modified alleles of the *Hic1* tumor suppressor gene. A *Hic1-citrine* reporter strain allows for reported visualization of *Hic1* endogenous distribution. Moreover, a *Hic1* conditional null allele, *Hic1*^{fl/fl}, circumvents *Hic1*^{-/-} embryonic lethality to enable spatially and temporally controlled inactivation of the *Hic1* gene.
3. We identify TROY, a receptor of the Tumor Necrosis Factor Receptor family, as a novel negative modulator of the Wnt pathway. In the intestinal epithelium, Troy expression directly underlies Wnt transcriptional regulation, thus providing a negative feedback-loop. The intestinal distribution of Troy restricts to fast cycling

stem cells, thereby defining Troy as a novel marker of these unique cells. In there, Troy likely interacts with the prominent stem cell specifier Lgr5 to reduce the local level of the Wnt pathway activity. Lastly, elevated amounts of Troy were observed in lesions arising upon genetically defined, Wnt-pathway driven mouse models of hereditary or induced bowel cancer. On the contrary, collected samples of human sporadic colorectal cancer indicated a different pattern of *TROY* tumoral deregulation in humans.

4. The review article summarizes the principal signaling pathways that govern the architecture and homeostasis of the gastrointestinal tract. Ranging from the Wnt/β-catenin and Notch pathways to circuits triggered by Hedgehog, EGF or BMP ligands, all cascades are discussed with respect to their fundamental roles both in physiology and malignant transformation of the bowel.

8. References

- Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M.M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C., and Romagnolo, B. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev Biol* 324, 288-296.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608-611.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.
- Batlle, E., Henderson, J.T., Begthel, H., van den Born, M.M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., et al. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-263.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.
- CancerGenomeAtlasNetwork (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337.
- Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* 143, 1518-1529 e1517.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 27, 7551-7559.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.
- Jho, E.H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.K., Freund, J.N., and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22, 1172-1183.

- Kim, K.A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., et al. (2005). Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 309, 1256-1259.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19, 379-383.
- Kosinski, C., Li, V.S., Chan, A.S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., et al. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15418-15423.
- Krausova, M., and Korinek, V. (2012). Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue. *Neoplasma* 59, 708-718.
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R.S., Taniguchi, K., Krishnadath, K.K., Halling, K.C., Cunningham, J.M., Boardman, L.A., Qian, C., et al. (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 26, 146-147.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. *Cell* 86, 391-399.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.
- Nusse, R. (2012). Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8, 1711-1717.
- Pin, C., Watson, A.J., and Carding, S.R. (2012). Modelling the spatio-temporal cell dynamics reveals novel insights on cell differentiation and proliferation in the small intestinal crypt. *PLoS One* 7, e37115.
- Preston, S.L., Wong, W.M., Chan, A.O., Poulsom, R., Jeffery, R., Goodlad, R.A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W.F., et al. (2003). Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res* 63, 3819-3825.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731-1734.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40, 915-920.
- Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., et al. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18, 1385-1390.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415-418.
- Shenoy, A.K., Fisher, R.C., Butterworth, E.A., Pi, L., Chang, L.J., Appelman, H.D., Chang, M., Scott, E.W., and Huang, E.H. (2012). Transition from colitis to cancer: high Wnt activity sustains the tumor-initiating potential of colon cancer stem cell precursors. *Cancer Res* 72, 5091-5100.

- Shimizu, Y., Ikeda, S., Fujimori, M., Kodama, S., Nakahara, M., Okajima, M., and Asahara, T. (2002). Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 73-81.
- Schepers, A.G., Snippert, H.J., Stange, D.E., van den Born, M., van Es, J.H., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337, 730-735.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Vermeulen, L., De Sousa, E.M.F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J.H., Borovski, T., Tuynman, J.B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., et al. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 12, 468-476.

9. Curriculum vitae

Name and surname, title: Michaela Krausová, M.Sc.

Birth date and place: 28.06.1982, Praha

Nationality: Czech

Phone: +420 604 265 018

Email: krausom@img.cas.cz

Education:

Ph.D. study: 10.2006 - 2013

Faculty of Science, Charles University in Prague, Ph.D. program Biochemistry, and Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v.v.i., Laboratory of Cell and Developmental Biology

Theme of Ph.D. thesis: The role of Wnt signaling in initiation and progression of sporadic intestinal tumors

Supervisor: Vladimír Kořínek, Ph.D.

Masters study: 09.2001-09.2006

Faculty of Science, Charles University in Prague, M.Sc. program Biochemistry

Title of Master thesis: A study of interactions of heterobifunctional photoaffinity probe with the cytochrome P450 3A6 system

Supervisor: Assoc.Prof.Petr Hodek, Ph.D.; Reviewer: Tomáš Koblas, M.Sc.

Publications included in the Ph.D. thesis:

Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor family member, interacts with Lgr5 to inhibit Wnt signaling in intestinal stem cells.

Fafilek B, [Krausova M](#), Vojtechova M, Pospichalova V, Tumova L, Sloncova E, Huranova M, Stancikova J, Hlavata A, Svec J, Sedlacek R, Luksan O, Oliverius M, Voska L, Jirsa M, Paces J, Kolar M, Krivjanska M, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H, Korinek V.

Gastroenterology. 2013 Feb;144(2):381-91. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.048. Epub 2012 Nov 7.

Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue.

Krausova M, Korinek V.

Neoplasma. 2012;59(6):708-18. doi: 10.4149/neo_2012_090. Review.

Generation of two modified mouse alleles of the *Hic1* tumor suppressor gene.

Pospichalova V, Tureckova J, Fafilek B, Vojtechova M, Krausova M, Lukas J, Sloncova E, Takacova S, Divoky V, Leprince D, Plachy J, Korinek V.

Genesis. 2011 Mar;49(3):142-51. doi: 10.1002/dvg.20719.

Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling.

Doubravská L*, Krausova M*, Gradiš D, Vojtechova M, Tumova L, Lukas J, Valenta T, Pospichalova V, Fafilek B, Plachy J, Sebesta O, Korinek V.

Cellular Signalling. 2011 May;23(5):837-48. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.01.007. Epub 2011 Jan 16.

*These authors contributed equally to this work.

Additional publications:

Monensin Inhibits Canonical Wnt Signaling in Human Colorectal Cancer Cells and Suppresses Tumor Growth in Multiple Intestinal Neoplasia Mice

Tumova L, Pombinho AR, Vojtechova M, Stancikova J, Gradiš D, Krausova M, Sloncova E, Zdrahal Z, Bartunek P, Korinek V.

Molecular Cancer Therapeutics. *under revision*

Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells.

Tureckova J, Vojtechova M, Krausova M, Sloncova E, Korinek V.

Translational Oncology. 2009 Dec;2(4):281-90.

Meetings & conferences - presentations:

IMG regular conference, IMG AS CR, v.v.i., Praha, Czech Republic, 03.09.2012; Presentation: "Troy, a Tumor Necrosis Receptor family member 19, interacts with Lgr5 to inhibit Wnt signaling in intestinal stem cells."

The Czech Wnt Meeting, Lopeník, Czech Republic, 29.04.2012-01.05.2012; Presentation: "TROY, the Tumor Necrosis Receptor family member 19, interacts with the stem cell marker Lgr5 and inhibits Wnt signaling."

3rd IMG Ph.D. conference, IMG AS CR, v.v.i., Praha, Czech Republic, 04.07.2010; Presentation: "The Wnt signaling signature in human sporadic colorectal cancer."

The Czech Wnt Network Workshop, Lednice, Czech Republic, 3.-5.3.2009; Presentation: "Wnt signaling in the liver."

Meetings & conferences - posters:

1. Study of interactions of heterobifunctional photoaffinity probe with the cytochrome P450 3A6 system - Krausová, M., Hodek, P., Šulc, M., Stiborová, M.; X. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, Czech Republic, 02.2006
2. A novel component of the Wnt signaling pathway and a new interface for the evaluation of data from ChIP on chip experiments - J. Lukas, T. Valenta, L. Doubravská, B. Fafilek, M. Krausova, P. Mazna, J. Tureckova, R. Ivanek, J. Paces and V. Korinek; Wnt Signaling in Development and Disease, Berlin, Germany, 09.2007
3. The Wnt signaling pathway target genes - potential biomarkers in the colorectal cancer tumors - Krausova M., Fafilek B., Mazna P., Pospichalova V., Doubravská L., Paces J., Ivanek R., Krivjanska M., Korinek V.; 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress Of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai, China, 08.2009
4. Post-translational modifications of the Wnt proteins and their role in signaling - Doubravská L., Fafilek B., Krausova M., Pospichalova V., Vojtechova M., Gradiš D., Korinek V.; Wnt signaling in development and disease, Arolla, Switzerland, 08.2009
5. Tracking the tumors - new prospective biomarkers in the colorectal cancer development - Fafilek B., Mazna P., Krausova M., Pospichalova V., Doubravská L., Paces J., Korinek V.; EMBO meeting 2009, Amsterdam, Netherlands, 09.2009
6. Chemical modulation of the Wnt pathway - Pombinho, A., Krausova, M., Havranek, M., Droz, L., Korinek, V., Bartunek, P.; 2nd European Chemical Biology Symposium, Praha, Czech Republic, 05.2010
7. TROY: a putative regulator of intestinal carcinogenesis and homeostasis driven by Wnt signaling pathway - Fafilek, B., Mazna, P., Krausova, M., Pospichalova, V., Doubravská, L., Tumova, L., Paces, J., Korinek, V.; The EMBO meeting, Barcelona, Spain, 09.2010
8. TMCO1: a novel target gene negatively regulated by tumor suppressor Hic1 - Pospichalova, V., Mazna, P., Strnad, H., Fafilek, B., Tureckova, J., Vojtechova, M., Krausova, M., Sloncova, E., Korinek, V.; The EMBO meeting, Barcelona, Spain, 09.2010
9. Wnt signaling signature in colorectal cancer - identification of putative regulators of Wnt-driven colorectal tumorigenesis - Krausova, M., Fafilek, B., Oliverius, M., Voska, L., Luksan, O., Kolar, M., Mazna, P., Pospichalova, V., Tumova, L., Korinek, V.; The European Wnt Meeting 2010, Stockholm, Sweden, 10.2010

10. Conditional mutagenesis in the mouse intestine - a tool for studying the role of Hic1 (hypermethylated in cancer 1) tumor suppressor in the colorectal cancer - Pospichalova, V., Tureckova, J., Tumova, L., Vojtechova, M., Fafilek, B., Krausova, M., Korinek, V.; The EMBO Meeting 2011, Vienna, Austria, 09.2011
11. High throughput screen for inhibitors of the canonical Wnt signaling pathway in colorectal cancer - Tumova, L., Pombinho, A., Waaler, J., Grasl, D., Krausova, M., Tureckova, J., Vojtechova, M., Wedlich, D., Machon, O., Bartunek, P., Korinek, V. The EMBO Meeting 2011, Vienna, Austria, 09.2011
12. TROY, marker of the intestinal stem cells and modulator of their Wnt signaling input - Fafilek, B., Krausova, M., Vojtechova, M., Tumova, L., Pospichalova, V., Sloncova, E., Huranova, M., Chmelikova, J., Sedlacek, R., Luksan, O., Oliverius, M., Voska, L., Jirsa, M., Paces, J., Kolar, M., Klimesova, K., Tlaskalova-Hogenova, H., Korinek, V.; EMBO Conference 30 Years of Wnt Signalling, Egmond aan Zee, Netherlands, 06.2012
13. Inactivation of tumour suppressor Hic1 contributes to intestinal cancerogenesis by regulating the secretory cell fate decision and inflammation in the mouse intestinal epithelium - Pospichalova, V., Hlavata, A., Vojtechova, M., Tumova, L., Tureckova, J., Fafilek, B., Stancikova, J., Krausova, M., Korinek, V.; The EMBO Meeting 2012, Nice, France, 09.2012
14. Troy, a Tumour Necrosis Factor Receptor Family Member Interacts with LGR5 to Inhibit Wnt Signalling in Intestinal Stem Cells - Fafilek, B., Krausova, M., Stancikova, J., Vojtechova, M., Pospichalova, V., Tumova, L., Klimesova, K., Korinek, V.; European Summer School on Stem Cells & Regenerative Medicine, Hydra, Greece, 09.2013
15. Small molecule SC3 - old stuff, new Wnt inhibitor - Tumova, L., Pombinho, A.R., Vojtechova, M., Stancikova, J., Grasl, D., Krausova, M., Korinek, V.; Wnt symposium, Heidelberg, Germany, 07.2013

Courses and certificates:

Cell Imaging Techniques Course by Royal Microscopical Society, Oxford, Great Britain; 09.2008

Qualification course according to the Act no.246/1992 § 17 Section 1 Protection of animals against cruelty; 11.2007

Safe use of ionizing radiation; 11.2006

Language skills:

English - fluent (FCE 06.1998; CAE 12.1999)

German - fluent (state examination 2nd grade 05.2001)

Kvalifikáciu kurz k získaniu zpùsobilosti dle §17 zak. ods.1 c.246/1992 Sb. na ochranu zvýrat proti tyraní; 11.2007
Zpùsobilost k bezpeènému nakladaní se zdroji ionizujícího záření; 11.2006
Jazykove dovednosti:
Anglicky jazyk - plynne (jazykove zkousky FCE 06.1998 a CAE 12.1999)
Nemecky jazyk - plynne (stani zkouska 2. stupne 05.2001)

Kurz mikroskopických technik Cell Imaging Techniques Course by Royal Microscopical Society, Oxford, Spojené království, 09.2008

Kurzy a osvědčení:

8. TMCO1: A novel target gene negatively regulated by tumor suppressor Hic1 - Pospichalová, V., Mazná, P., Strnad, H., Faflík, B., Turčková, J., Vojtěchová, M., Krausová, M., Sioncová, E., Kornínek, V.; The EMBO meeting, Barcelona, 09.2010
9. Wnt signaling signature in colorectal cancer - identification of putative regulators of Wnt-driven colorectal tumorigenesis - Krausová, M., Faflík, B., Olivérius, M., Voska, L., Lukšan, O., Kolář, M., Mazná, P., Pospichalová, V., Turčková, L., Kornínek, V.; The European Wnt Meeting 2010, Stockholm, Švédsko, 10.2010
10. Conditional mutagenesis in the mouse intestine - a tool for studying the role of Hic1 (hypermethylated in cancer 1) tumor suppressor in the colorectal cancer - Pospichalová, V., Turčková, J., Turčková, L., Vojtěchová, M., Faflík, B., Krausová, M., Tumova, L., Vojtěchová, M., Wedlich, D., Machon, O., Bartunek, P., Kornínek, V.; The European Wnt Meeting 2011, Víděn, Rakousko, 09.2011
11. High throughput screen for inhibitors of the canonical Wnt signaling pathway in colorectal cancer - Tumova, L., Pombinho, A., Waller, J., Grádl, D., Krausová, M., Hurnánová, M., Chmelíková, J., Sedláček, R., Lukšan, O., Olivérius, M., Voska, L., Jirsa, F., Faflík, B., Krausová, M., Vojtěchová, M., Tumova, L., Pospichalová, V., Sioncová, E., Krausová, M., Pačes, J., Kolar, M., Klimesová, K., Tlaskalová-Hogenová, H., Kornínek, V.; The European Wnt Meeting 30 Years of Wnt Signalling, Egmond aan Zee, Nizozemí, 06.2012
12. TROY, marker of the intestinal stem cells and modulator of their Wnt signalling input - Faflík, B., Krausová, M., Vojtěchová, M., Tumova, L., Pospichalová, V., Sioncová, E., Tumova, L., Vojtěchová, M., Wedlich, D., Machon, O., Bartunek, P., Kornínek, V.; The European Wnt Meeting 2012, Víděn, Rakousko, 09.2012
13. Inactivation of tumor suppressor Hic1 contributes to intestinal carcinogenesis by regulating the secretory cell fate decision and inflammation in the mouse intestinal epithelium - Pospichalová, V., Hlavata, A., Vojtěchová, M., Tumova, L., Turčková, J., Faflík, B., Stanciková, J., Krausová, M., Kornínek, V.; The EMBO Meeting 2012, Nice, Francie, 09.2012
14. Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member interacts with LGR5 to inhibit Wnt signalling in intestinal Stem Cells - Faflík, B., Krausová, M., Stanciková, J., Vojtěchová, M., Pospichalová, V., Tumova, L., Kornínek, V.; European Symposium on Small molecule SCS - old stuff, new Wnt inhibitor - Tumova, L., Pombinho, A.R., Heidelberg, Spolková republika Německo, 07.2013
15. Small molecule SCS - old stuff, new Wnt inhibitor - Tumova, L., Pombinho, A.R., Vojtěchová, M., Stanciková, J., Grádl, D., Krausová, M., Kornínek, V.; Wnt symposium, Heidelberg, Spolková republika Německo, 07.2013

1. Study of interactions of heterobifunctional photofinity probe with the cytochrome P450 3A6 system - Krausová, M., Hoděk, P., Šulc, M., Stiborová, M.; Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, Česká republika, 02.2006
2. A novel component of the Wnt signaling pathway and a new interface for the evaluation of data from chip experiments - J. Lukas, T. Valentová, L. Doubravská, B., Faflík, M., Krausová, P., Mazná, P., Pospišilová, V., Ivánková, J., Korinek, V., Wnt Signaling in Development and Disease, Berlin, Špolková republika, 09.2007
3. The Wnt signaling pathway target genes - potential biomarkers in the colorectal cancer tumors - Krausová, M., Faflík, B., Mazná, P., Pospišilová, V., Doubravská, L., Paces, J., Ivánková, R., Kryjanská, M., Pospišilová, V., Vojtěchová, M., Grádl, D., Doubravská, L., Paces, J., Korinek, V.; EMBO meeting 2009, Amsterdam, Nizozemí, 09.2009
4. Post-translational modifications of the Wnt proteins and their role in signaling - Korinek, V.; Wnt signaling in development and disease, Arrolla, Švýcarsko, 08.2009
5. Tracking the tumors - new prospective biomarkers in the colorectal cancer development - Faflík, B., Mazná P., Krausová M., Pospišilová V., Doubravská L., Paces J., Korinek, V.; EMBO meeting 2009, Amsterdam, Nizozemí, 09.2009
6. Chemical modulation of the Wnt pathway - Pombinho, A., Krausová, M., Havranek, M., Držov, L., Korinek, V., Bartunek, P.; 2nd European Chemical Biology Symposium, Praha, Česká republika, 05.2010
7. TROY: a putative regulator of intestinal carcinogenesis and homeostasis driven by Wnt signaling pathway - Faflík, B., Mazná, P., Krausová, M., Pospišilová, V., Doubravská, L., Tumova, L., Paces, J., Korinek, V.; The EMBO meeting, Barcelona, V., Španělsko, 09.2010

Plakátová sdělení:

The Czech Wnt Network Workshop (Pracovní setkání českých výzkumných skupin studujících dráhu Wnt), Lednice, Česká republika, 3.-5.3.2009; Prehnáška: "Wnt signaling in the liver."

Třetí konference Ph.D. studentů UMG, UMG AV ČR, v.v.i., Praha, Česká republika, 04.07.2010; Prehnáška: "The Wnt signaling signature in human sporadic colorectal cancer."

The Czech Wnt Meeting (Pracovní setkání českých výzkumných skupin studujícich dráhu Wnt), Lopěník, Česká republika, 29.04.2012-01.05.2012; Prehnáška: "TROY, the Tumor Necrosis Receptor family member 19, interacts with the stem cell marker Lgr5 and inhibits Wnt signaling."

Prehnáška: "Troy, a Tumor Necrosis Receptor family member 19, interacts with Lgr5 to inhibit Wnt signaling in intestinal stem cells."

Pravidelné shromáždění UMG, UMG AV ČR, v.v.i., Praha, Česká republika, 03.09.2012;

Príspävky na konferencie:

- Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells. Turecková J, Vojtěchová M, Krausová M, Sioncová E, Kornínek V. *Translational Oncology.* 2009 Dec;2(4):281-90.
- Molecular Cancer Therapeutics. Review. Zdrahal Z, Bartunek P, Kornínek V. Tumova L, Pombinho AR, Vojtěchová M, Stančíková J, Gralí D, Krausová M, Sioncová E, Tumor Growth in Multiple Intestinal Neoplasia Micro Monensin Inhibits Wnt Signaling in Human Colorectal Cancer Cells and Suppresses Tumorigenesis. *Cancer.* 2011 Jan 16;117(2):437-48. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.007. Epub 2011 Jan 16.

Dalsí publikace:

- * Oba autori prispeli k této práci stejným dilemu. Doubrovská L*, Krausová M*, Gralí D, Vojtěchová M, Tumova L, Lukas J, Valenta T, Pospíšilová V, Faříček B, Plachy J, Šebesta O, Kornínek V. And is essential for Wnt signaling. *Cellular Signaling.* 2011 May;23(5):837-48. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.01.007. Epub 2011 jan 16.
- Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine residues. Takacová S, Divoky V, Lepriñce D, Plachy J, Kornínek V. Generation of two modified mouse alleles of the *Hic1* tumor suppressor gene. *Genes.* 2011 Mar;49(3):142-51. doi: 10.1002/dvg.20719.
- Neoplasm. 2012;59(6):708-18. doi: 10.4149/neop_2012_090. Review. Krausová M, Kornínek V.

- Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue. Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor family member, interacts with Lgr5 to inhibit Wnt signaling in intestinal stem cells. Faříček B, Krausová M, Vojtěchová M, Pospíšilová V, Tumova L, Sioncová E, Hurnanova M, Stančíková J, Hlavata A, Švec J, Sedláček R, Lukšan O, Olivérus M, Voska L, Jirska M, Paces J, Kollar M, Krivjanovská M, Klimessová K, Tlaskalová-Hogenova H, Kornínek V. *Gastroenterology.* 2013 Feb;144(2):381-91. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.048. Epub 2012 Nov 7.

Publikace uvedené v dizertační práci:

- Název diplomové práce: A study of interactions of heterobifunctional photoreactive probe with the cytochrome P450 3A6 system Skolitela: Doc.RNDr. Petr Hoděk, CSc. Openent Mg.r. Tomáš Koblas

Magisterské studium: 09.2001-09.2006
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, obor Biochémie

Doktorství studium: 10.2006 - dosud Přirodovědecká fakulta UK, obor Biochemie a Ustav molekulární genetiky v.v.i., Laboratoř buněkne a vývojové biologie Tema dízeretacní práce: Uloha signálizace Wnt v iniciaci a progrese sporadických střevních nádorů Skolitel: RNDr. Vladimír Körinek, CSc.

Vzdešení:

Jmeno a příjmení, titul: Michal Krušová, Mg.r.
Datum a místo narodení: 28.06.1982, Praha
Statní přislužnost a národnost: Česká republika, česka
Kontaktní telefon: +420 604 265 018
Email: krušom@img.cz

Osobní údaje:

9. Zivotopis

Sangjorgi, E., and Capelchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40, 915-920.

Simion-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., et al. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18, 1385-1390.

Sato, T., van Es, J.H., Snijpers, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Weerting, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415-418.

Shenoy, A.K., Fischer, R.C., Butterworth, E.A., Pi, L., Chang, L.J., Appelman, H.D., Chang, M., Scott, E.W., and Huang, E.H. (2012). Transition from colitis to cancer: high Wnt activity sustains the tumor-initiating potential of colon cancer stem cell precursors. *Cancer Res* 72, 5901-5900.

Shimizu, Y., Ikeda, S., Fujimori, M., Kodama, S., Nakahara, S., Okajima, M., and Asahara, T. (2002). Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 73-81.

Schepers, A.G., Snijpers, H.J., Stange, D.E., van den Born, M., van Es, J.H., van de Weerting, M., and Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestine. *Science* 337, 730-735.

Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon adenomas. *Nature* 398, 422-426.

Vermuelen, L., De Sousa, E.M.F., Van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J.H., Borovski, T., Tuyman, J.B., Todaro, M., Merz, C., Rodermund, H., et al. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 12, 468-476.

- CancerGenomeAtlasNetwork (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337.
- Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* 143, 1518-1529 e1517.
- Fever, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelkenen, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 27, 7551-7559.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermalin, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Kim, K.A., Kakita, M., Zhao, J., Ohshima, T., Tang, T., Binneerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., et al. (2005). Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal pathway. *Mol Cell Biol* 22, 1172-1183.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huis, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking epithelium. *Science* 309, 1256-1259.
- Kim, K.A., Kakita, M., Zhang, J., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, C., Li, V.S., Chan, A.S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Clevers, H., and Korinek, V. (2012). Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue. *Neoplasma* 59, 708-718.
- Krausova, M., and Korinek, V. (2012). Signal transduction pathways participating in colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signaling. *Cunningham, J.M., Bartram, L.A., Dian, C., et al.* (2000). Mutations in AXIN2 cause mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. *Cell* 96, 391-399.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.
- Ozawa, M., Barabault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*, 1711-1717.
- Pin, C., Watson, A.J., and Carding, S.R. (2012). Modelling the spatio-temporal cell dynamics reveals novel insights on cell differentiation and proliferation in the small intestinal crypt. *PLoS One* 7, e37115.
- Preston, S.L., Wong, W.M., Chan, A.O., Poulson, R., Jeffery, R., Goodlad, R.A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W.F., et al. (2003). Bottom-up histogeneses of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res* 63, 3819-3825.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S.H., Masliah, F.R., Munemitsu, S., and Polakos, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731-1734.

- 382, 638-642.
- W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Brühn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, C. (1996). Positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 85, 251-263.
- Robertson, J., van de Wetering, M., Pasworn, T., et al. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Nature* 420, 608-611.
- Bartle, E., Henderson, J.T., Begthel, H., van den Born, M.M., Sancho, E., Huis, G., Meeldijk, J., Bakker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M.L., Cozijnsen, M., Haegembath, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.
- Danenberger, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells of origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608-611.
- Baraker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev Biol* 324, 288-296.
- Laurent-Puig, P., Perret, C., and Romagnolo, B. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin pathway in the development of colorectal cancer. *Nature* 457, 608-611.
- Andreu, P., Peiglouon, G., Sjolman, C., Taketo, M.M., Colmoc, S., Robine, S., Lamardue, D., Lauret-Puig, P., Perret, C., and Romagnolo, B. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin pathway in the development of colorectal cancer. *Nature* 457, 608-611.

8. Použitá literatura

- na jejich zásadní roli ve fyziologii i zhoubné přeměně střevní tkáně.
- Podílejí na výstavbě a homeostaze trávícího traktu. Práce podrobné popisuje kasakdy nekontrolovanou aktivací kaskady Wnt. Naopak nasbírané vzkazy lidských sporadickych druhů mohou způsobit vývoj vrozeného nebo ziskaného rizika vzniku rakoviny v geneticky definovaných myších modelech díky významnému vlivu na riziko vzniku rakoviny druhý Wnt. Zvýšené množství blikoviny Troy jsme pozorovali v lezích, využívajících buňek, jmenovitě receptor Lgr5; vysledkem této vazby je pak snížení místní hladiny těchto buněk. Troy pravidelně interaguje s druhým, využívajícím znakem těchto rychle se dělící kmenové buňky, a tím definuje Troy jako nový, unikátní marker negativního regulace myšíku. Ve střevní tkáni se exprese genu Troy omezuje na TROY primé regulaci kaskadou Wnt, a tak blikovina Troy současné poskytuje dráze Wnt jakou nový záporový modulátor druhý Wnt. Ve střevním epitelu podleha transkripcie genu TROY připravili jíme gen TROY, člen rodiiny receptorů nekrotizujících nádory, které se definují jíme poskytuje dráze Wnt. Vysledkem je, že vývoj vrozeného nebo ziskaného rizika vzniku rakoviny je závisl na expresi TROY.

4. Ten to přehledový článek shrnuje poznatky o halavních signálních dráhách, které se nekontrolují kaskadou Wnt. Naopak nasbírané vzkazy lidských sporadickych druhů mohou způsobit vývoj vrozeného nebo ziskaného rizika vzniku rakoviny v geneticky definovaných myších modelech díky významnému vlivu na riziko vzniku rakoviny druhý Wnt. Zvýšené množství blikoviny Troy jsme pozorovali v lezích, využívajících buňek, jmenovitě receptor Lgr5; vysledkem této vazby je pak snížení místní hladiny těchto buněk. Troy pravidelně interaguje s druhým, využívajícím znakem těchto rychle se dělící kmenové buňky, a tím definuje Troy jako nový, unikátní marker negativního regulace myšíku. Ve střevní tkáni se exprese genu Troy omezuje na TROY primé regulaci kaskadou Wnt, a tak blikovina Troy současné poskytuje dráze Wnt jakou nový záporový modulátor druhý Wnt. Ve střevním epitelu podleha transkripcie genu TROY připravili jíme gen TROY, člen rodiiny receptorů nekrotizujících nádory, které se definují jíme poskytuje dráze Wnt. Vysledkem je, že vývoj vrozeného nebo ziskaného rizika vzniku rakoviny je závisl na expresi TROY.

2. Připravili jíme dve nové, geneticky modifikované alely nádorového supresoru Hic1. Myší kmeny Hic1-citrine umozňují vizualizovat přirozenou distribuci proteinu Hic1. Podmínka alela Hic1_{flx/flx} obchází zárodečnou letalitu Hic1^{-/-}, myší, takže dovoluje prostorové a časové určení okamžiku inaktivace genu Hic1.

- Pokrytuje me experimentální důkazy o povádání a vazebníme posloupnosti navázání mastných kyselin na mýtí proteiny Wnt1 a Wnt3a a jejich N-glykosylace. Pocateční připojení oligosacharidových struktur s nejvýšší pravděpodobností podmíní je následnou dovoji acyaci. Za druhé, přidává kyselinu palmitolejovou na konzervovaný zbytek serinu prodechází a je současné využití pro následnou modifikaci cysteinu palmitatem. Přitomnost lipidických složek je důležitá pro rádny extracelulární pohyb proteinů Wnt.

V násí prací jsme se zaměřili na ohlášení nových způsobů regulace signálů, dráhy umozňují vydávit hladinu dráhy. Vnitřní potřeb místního prostředí. Vysídelky jsou prezentovány ve třech výzkumných publikacích a dále v jednom přehledovém článku a jež shrnuje následovně:

7. Zavery

Střevní homoeostáza je složitý a přesné regulovaný proces, který podlehlá spektru ružných signálních druhů. Tyto různé rovnováhu mezi buněčnou proliferací a differenciací. Vyzkumy rozsahle využívající pokusné myši modely poukazují na skutečnost, že ochylky signalizací, které pocházejí zvnějška využívají schopné vyznamenat rozdíly v buněčných signálach. Tyto různé novinky následně shrnuje a myslí a lidském střeve.

Souhrn:

Signaling transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue. Krausová, M., Koriňek, V. *Neoplasma*. 2012;59(6):708-718. doi: 10.4149/neo_2012_090.

6.4 Dráhy prenosu signálu, podliejúci sa na homeostáze a záhubné premené strevní tkanie

Závěry: Expertise TROY je zvyšena v buněčných liniích odvozených od lidských kolorektálních karciinomů a dle ve střevních nadorech vyvíjených u pokusních myší. Protein TROY pak funguje jako zapojený modulátor dráhy Wnt a jeho působení se ve střevní tkani omezuje na kmenové buňky, které produkují receptor LGR5.

V ex vitro stereomich kulturnich, tzv. organoidech, pak lroy potlacoval signálizaci prostředkovávanou proteiny R-spondin, které fungují jako agoništi ligandů Wnt.

Ve ctyřech buněkách linických, obovených od lidských kolorektálních karcinomů, jíme identifikovali promotorové oblasti celkem 960 genů, které jsou první regulovaným jaderním proteinem TCF4, halvinim ciliovým transkripcním faktorem dráhy Wnt. 18 z těchto promotorových oblastí pak bylo průtomeno ve všech precipitacích chromatinu. Signifikace Wnt zvýšuje expresi genu *TROY*, který koduje protein z nadrodným receptorům faktory Wnt. Zvýšení expresi genu *TROY* je zvyšena v lidských buňkách, které nekrotizující nadory (TNFR). Hlavní mRNA pro *TROY* je zvyšena v lidských buňkách, které neobsou použí v genu APC (Adenomatous Polyposis Coli), nebo také v buňkách stimulovaných ligandem Wnt3a. Expressie *TROY* byla vyznamená zásluhou v nadrodných tkanicích myší, ktere vyvíjeli střevní zhoubné buňky. Experimenty sledující původ buňek (tzv. lineage tracing) poukazaly na fakt, že protein Troy je využíván v rychle se dělících kmenových buňkách tenkého střeva. Troy je využíván tvorem v rychle se dělících kmenových buněk, a to receptorém LGR5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor).

Vysledky:

Pro identifikační genů řízených drahou Wnt jsme přistoupili k technice chromatinové imuno precipitace ve sponěti s DNA mikročipy, tzv. ChIP-on-chip. Pro tyto účely jsme využili buněčné linie odvozené od lidských kolorektálních karcinomů, konkrétně pak linie Colo320, LS174T a SW480. Dále jsme pak navodili tvarbu střevnicich nádroř u myší kmene C57BL/6J pomocí podání latek azoxymethanu a dehydratní sulfátu. Střevní takto oštěrených myší, stejně tak jako vztoky také pocházející z myší kmene $Afp^{+/-}Mln$ a APC_{GK0/GK0}/Lgr5-EGFP-IRE-S-CREERT2, byly analyzovány pomocí imunohistochemického barvení a *in situ* hybridizace.

Methods:

Fazadí s ch. Signální dráha. Vnitřní je vyzádována pro udržování homeostázy střevního appetitů, blokování tetto kaskády snížuje proliferační schopnosti střevních kmenových buněk. Nekontrolovaná signální role dráhy. Vnitřní homoeostáze a maligní přeměně vystěky střevního traktu, a to za zkomušil role dráhy. Vnitřní homoeostáze a maligní přeměně vystěky střevního traktu, a to za signálizace. Vnitřní vede na druhu stranu k vývinu rakoviny střevní tkáně. V následující jsem signalizace. Vnitřní vede na druhu stranu k vývinu rakoviny střevní tkáně. V následující jsem

Pozadí & cíle:

Sohrn:

L AON

Fafilek, B., Krausová, M., Vojtěchová, M., Tumová, L., Pospíchalová, V., Slomcová, E., Hurnánová, M., Chmelíková, J., Šedláček, R., Lukšan, O., Olivérius, M., Voska, L., Jirsa, M., Paces, J., Kolar, M., Krivjanská, M., Klimesová, K., Tlaskalová-Hogenová, H., Korinek, V., Gastroenterology. 2013 Feb;144(2):381-91. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.048. Epub 2012 Nov 7

Signaling in Intestinal Stem Cells

Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, interacts with Lgr5 to inhibit Wnt

6.3 Troy, člen rodiiny recepfótoru faktoru nekrotizujújicího nadory, interaguje s proteinem Lgr5 a inhibuje signálizáciu Wnt ve střevních kmenových buňkach

Gen *Hic1* (Hypomethylated in cancer 1) je nadodrovým supresorem, který se nalézá v chromosomalní oblasti 17p13.3. Tento region je pak v lidských nádorech často předmětem nadměrné methylace nebo ztraty. Vzrůstecných stadiích pokusné myší je gen *Hic1* nezbytný pro růstový vývoj plodu, u dospelejších zvrat pak *Hic1* vykonává protinádorové role. Vzhledem k tomu, že myší deficience na *Hic1* umírá jižte před narozením, jsem vytvořil podmíněnou *Hic1* alelu, kdy jsme kodující oblast genu *Hic1* ohranicili loxP mísť. Za podmínek nakrzenu těchto tzv. kondičionálních zvrat na myší exprimující rekombinánsu Cre pak můžeme ziskat nové poznatky tykající se funkce *Hic1* ve vývinějících se, jakoz i dospelejich tkáních. Dále jsme pomoci genového inženýrství nahradili sekvenční kodující aminoacyseliny 186-893 z proteinu *Hic1* DNA kodující fluoroscentní protein citrime. Ukažujeme, že distribuce fluorescenčního proteinu *Hic1*-citrine odpovídá expresnímu vzoru půrozeného (tzv. wild-type) *Hic1*. V důsledku toho se tedy může fluororescence *Hic1*-citrinové myší používat jako tzv. reportér rovněž sledování akivity lokusu *Hic1*.

Souhrn:

Generation of two modified mouse alleles at the *Hic1* tumor suppressor gene
Pospichalova, V., Tureckova, J., Fajlcek, B., Vojtechova, M., Krausova, M., Lukas, J., Sioncova,
E., Takacova, S., Divoky, V., Lepriene, D., Plichty, J., Korinek, V.
Genes, 2011 Mar; 49(3):142-51. doi: 10.1002/dvg.20719.

6.2. Výrobka dvoù myšicí kmene nesoucích geneticky pozmenené alely nadroveného superesoru *Hic1*

Souhru: Proteiny Wnt tvorí rodinu extracelulárnič signalnich molekul, ktere rozchodusí o osudu bunek v rozvíjicich se i dospelejich tkanicich. Predpoklada se, ze vsech 19 savcich proteinu Wnt obsahují dva druhy posttranslaticních modifikací: kovalentní projekci, extracelulárnemu mastným akvitidem myšicich ligandů Wnt a Wnt3a. Bylo zjištěno, že O-acylace serinu je vyzádována pro praktické jistme zkoumání, jak tyto úpravy přispívají k sekrecii, extracelulárnemu pochybu a signalu kyselein na dve rozdílné pozice a dale N-glykosylici na vše různých zbytků asparaginu. V následné fázi rozvojovany serinový zbytek, pak vyzádována akvitidem aktivitou i forma proteinu Wnt1, které chybí dovozených zembryalní drapakty vyzádovála aktivitu i forma proteinu Wnt1, které chybí palmitaticce cysteinu. V případě proteinu Wnt3a byla souvislost dvojí acylace s funkci proteinu Wnt mene vyrážná - ligand bez proteinositi mastneho retezce na cysteinu byl stále schopny signalizovat, a to různých bunecných kontextech. Záverem takeho systému byl signální kompetence proteinu Wnt1 ! Wnt3a těsně souvisí s jejich schopností připravit se k extracelulární matrix.

* Obiectiv prișpelelă este practică și jumătate.

Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine are prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signaling. Doubrovská, L., Krausová, M., Gralí, D., Vojtěchová, M., Tumová, L., Lukáš, J., Valentová, T., Pospíchalová, V., Faříček, B., Plachy, J., Šebestá, O., Koriňek, V.

6.1. Modely kace proteinu Wnt1 a Wnt3a pridavkem mastne kyseliny na serin je predpokladem pro naslednou lipidaci na cysteinu a je nezbytna pro signálizaci Wnt

6. Vysledek a diskuse

- Klonování plasmidů pro expresi rekombinantních proteinů
 - Tkánové kultury a různé způsoby transferace pěstovaných buněk linií
 - Infeckce buněk linií pseudotypovanými retroviry a lentiviry; výroba stabilních buněk linií
 - Výroba rekombinantních proteinů (antigenů) pro imunizaci pokusných zvířat; isolace a přesítování protitěk
 - Imunočtyochemické barvení na parafinových řezech
 - In situ hybridizace na mrazových řezech
 - Sběr klinických vzorků
 - Izolace RNA, syntéza cDNA, RT-qPCR
 - Reportová stanovení aktivity genů
 - Techniky RNA interference

5. Material a método

Kontextove-specifické regulátorý signálizace Wnt. Ve střevním epitelu pomáhá dráha Wnt udržovat nediferencované a proliferační oddíly kmenových buněk. Střevní tkán tak představuje lákavý model pro studium procesů, které jsou základem kaskaďou Wnt. Ve své praci jsme se tedy zaměřili na identifikaci nových cílových genů dráhy Wnt, které by byly specifické pro střevní tkán. Pro tyto účely jsme připravili vhozené genetické nástroje, které nám současně umožnily vytvářit molekulární mechanismy, jimž tyto geny přispívají k fyziologickým nebo zhoubným procesům trávicího traktu. Dále jsme též shrnula významy lidských sporadických kolorektálních karcinomů, abychom mohli sledovat chování těchto genů v nadorech u clověka.

něbyla. Proto jsme podrobne zkoumali charakter a funkci vyznam techo postranslancnich úprav.

Posttranslational modifications of proteins. O celkové signální aktivitě morfogenů z rodiiny Wnt je zámo, že je do značné míry doladěna složitými posttranslacionními upravami. Tyto modifikace se podílejí na interakcích proteinů Wnt s jelfičkami. Tyto modifikace mají vliv na další aspekty, ktere vyznamená určují signifikantně receptory a také mají vliv na dalsí aspekty, ktere jsou spojené s navázáním mastných kyselin a cukerných zbytků, však zámo ktere jsou spojené s navázáním mastných kyselin a cukerných zbytků, však zámo schopnosti ligandů Wnt. Časová posloupnost a vazjemá provázanost procesu,

Signální dráha Wnt je jednou z nejvýznamnějších kaskád, které mohou signalizovat obvydny potřebné pro kmenové, jakoz i růkovinné buňky. Práh aktivity kaskády Wnt je upravovan lze závislými regulacemi myčkami, které umožní ladit hladinu signifikantně pozadavku místního prostředí. V naši snaze ochalit nové způsoby regulace dráhy Wnt jsme se tedy soustředili na následující aspekty prenosu signálů Wnt:

4. Cíle práce

Signáliezace protějny vytváří udržující protileraci a pluripotenční oddíly střevních kmenových buněk, a tím se křídové podilí na záchování radní střevní homeostázy. Jakto taková je ale dráha, kterou následně podstavuje podpora vývinu a růstu střevních nádorů, pokud dojde ke ztrátě její kontroly.

Jíž založené nádory jsou různorodé ve svém slození, stále si ale zachovávají pravky buněčné hierarchie, která připomíná běžnou výstavbu krypty (Barker et al., 2009). Menší podmnožina buněk tak využije vlastnosti, které jsou sdílené se somatickými kmenovými buněkami - například schopnost sebepodobnou a pluripotencie (Schepers et al., 2012). Tyto buněkami zabezpečují progresivní růst leze, a jsou proto nazývány nádorovými kmenovými buněkami (Cancer Stem Cells, CSCs). Tyto nádorové buněky jsou udržovány zvyšenou aktivitou dráhy Wnt, která pochází z jejích bezprostředního okolí (Shenoy et al., 2012). Vzhledem k tomu, že tato buněka je schopna vytvářet nové buněky, které mohou využít kmenovým buněkam podobnou obdobnou podporuji CSC buněky deregulované pocházkové buněky ze dna krypty (Schepers et al., 2012). Oba mikroprostředí pak poskytuje nádorovým kmenovým buněkam podobné vlastnosti, které v místě svého působení využívají nekontrolovanou signalizaci.

zádlostí musejí uskutečnit v oddílu kmenových buněk, jak ukazuje ztrata genu *ApC* v CBC buněkach exprimujících receptor Lgr5 (Barker et al., 2009), nebo v připadě, kdy jsou stabilizované formy β-kateninu produkovány v dormantních populacích střevních kmenových buněk (Sangiorgi and Capelchi, 2008). Pro úspěšné řízení tkaní se navíc onkogeny musí odebírat v kmenových buněkách, ktere se nalezají v nespojených polohách krypty (Pin et al., 2012). Zcela v souladu s touto hypotézou, tzv. "histogenetická zdrojnice nahoru" (Preston et al., 2003), je následující pozorování: ztrata genu *ApC* v nekmenových buněkách dala vzniknout pouze mikroskopickým adenomům, ktere se nepřeměňovaly ve zhoubné nádory (Barker et al., 2009).

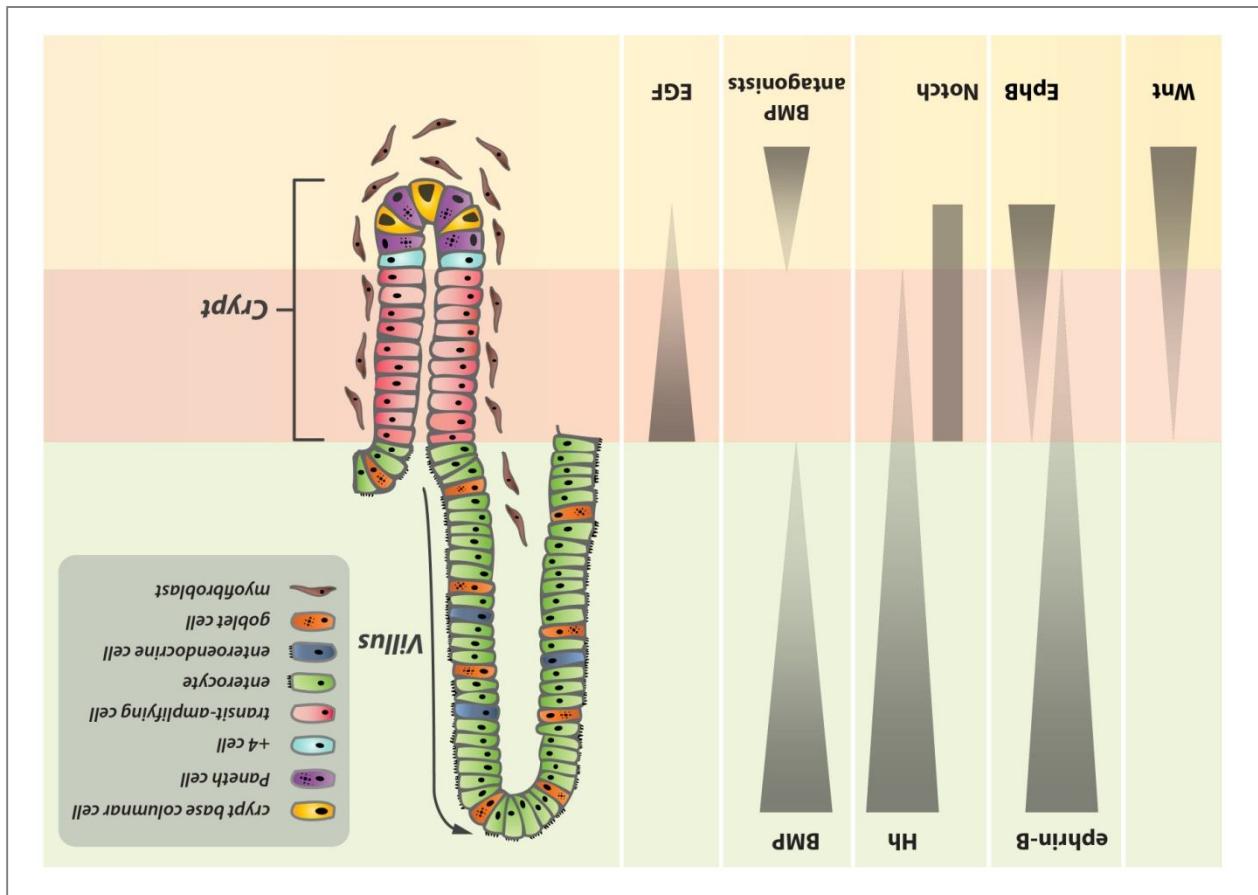
zdrovění je záchována materiála kmenová linie. Dleříne, tzn. translat amplifying (TA) buňky pak postupují směrem vzhůru na klíky (šípka). Při své cestě diferencují do všechn strukturálních linii - převládají vstřebávací interocyty (zelena) a dalej pak jsou tvorený vyměšující pocharkové buňky (Goblet cells) a enteroendokrinní buňky (tmavé modrá). Počátkové buňky vytvářejí hlen, zatímco enteroendokrinní buňky vytvářejí trávicí peptidové hormony. V okamžiku, kdy buňky dosahou vrcholu klíku, postupují a následkem jsou vytvořeny do nitra střeva. Výjimkou z tohoto pravidla jsou dluhové Panethovy buňky, které se nedělí a zůstávají na dne krypty. Rádha homeostaza střevní epitelové tkáně je součinností upravují rovnováhu mezi proliferační a rozružňující buňkami do jednotlivých střevních linií. Obrazek předvádí publikace (Krausová and Korinek, 2012).

Proliferaci podmínuje kmenovost buňek současné vytváření sousedící Panethovy SPONDIN1, pokusy myší (Kim et al., 2005). Rádha vytváří nepravidelné výrůstky, které jsou genovou manipulací vytvářeny geny kodující koncentrické signálů (Tcf4) (Fever et al., 2007). Naopak, umělé zvýšení aktivity dráhy Wnt navýší počet střevních (Ctnnb1) (Rubinfeld et al., 1993). Většina kolorektálních karcinomů travicího traktu (Moirin et al., 1997; Moirin et al., 1997; Moirin et al., 2002), AXIN2 (Liu et al., 2000) vzniká v okamžiku ztráty obou alel genu APC (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Nadmerné aktivity signalizace Wnt ale také může být zápracínená mutací inaktivaci záporu mych regulátorů dráhy, tj. genu AXIN1 (Shimizu et al., 2002), AXIN2 (Liu et al., 2000) (Moirin et al., 1997). Ve všechny výše zmíněnych připadech reguláční oblasti proteinu β-kateninu nebo mutacemi záshy, ktere ve vysledku poskozují regulaci oblasti proteinu β-kateninu molekulý β-kateninu nepatří aktivitou transkripční aktivity ciliových genů Wnt/TCF, což vedle homozygotní ztráty genu APC v epitelu tenkého střeva pokusné myší obratem podněcuje k chorobné premeně střevní tkáně (He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999).

Střevní dráha Wnt je spojena s propuknutím rakoviny, a to zejména (Andreu et al., 2008). Ztráta kontroly nad dráhou Wnt je spojena s propuknutím rakoviny, a to zejména (Moirin et al., 1997). Ve všechny výše zmíněnych připadech regulace Wnt/TCF, což vedle molekulý β-kateninu nepatří aktivitou transkripční aktivity ciliových genů Wnt/TCF, což vedle homozygotní ztráty genu APC v epitelu tenkého střeva pokusné myší obratem podněcuje bude prokazat, že výsledkem vysokého výskytu mutací v oblastech, které jsou významné pro regulaci výroby buňek, je vysoký riziko vzniku rakoviny. Tento výzkum by mohl poskytnout nové možnosti pro preventivní a terapeutickou strategii v boji s rakovinou.

aktivitě proteinu BMP. Kmenové buňky se asymetricky dělí tak, že vznikají dceřiné buňky (růzová), a antagoniste druhý Bone morphogenic protein (BMP), které v místě působí proti preferenciální nácházejícími se v lamíně propria (zobrazeny ve hnědé barvě). Z této oblasti jsou navíc uvolňovány Wnt, které jsou současné dodávány sousedními Panethovými buňkami a myofibroblasty ade dna krypty (světle modrá). Pluripotencie a proliferační kmenových buněk je určována impulsy obsahují oddíl dormantních kmenových buněk, které si dílící buněk +4 buněčných průměrů (dělek) střídají s nedelíjicími se Panethovými buňkami (fialová). Střevní tkaní pak ještě pravidelně podobně (CBG) buňky; zobrazeny ve žluté barvě). Tyto zaujmají na dně krypty takové polohy, ve kterých se Homeostáza střevní tkané je určována cylindrickými kmenovými buňkami (tzv. Crypt Base Columnar

Obrázek č.2| Uspořádání epiteliu tenkého střevního dráhy řídí jejho výstavbu



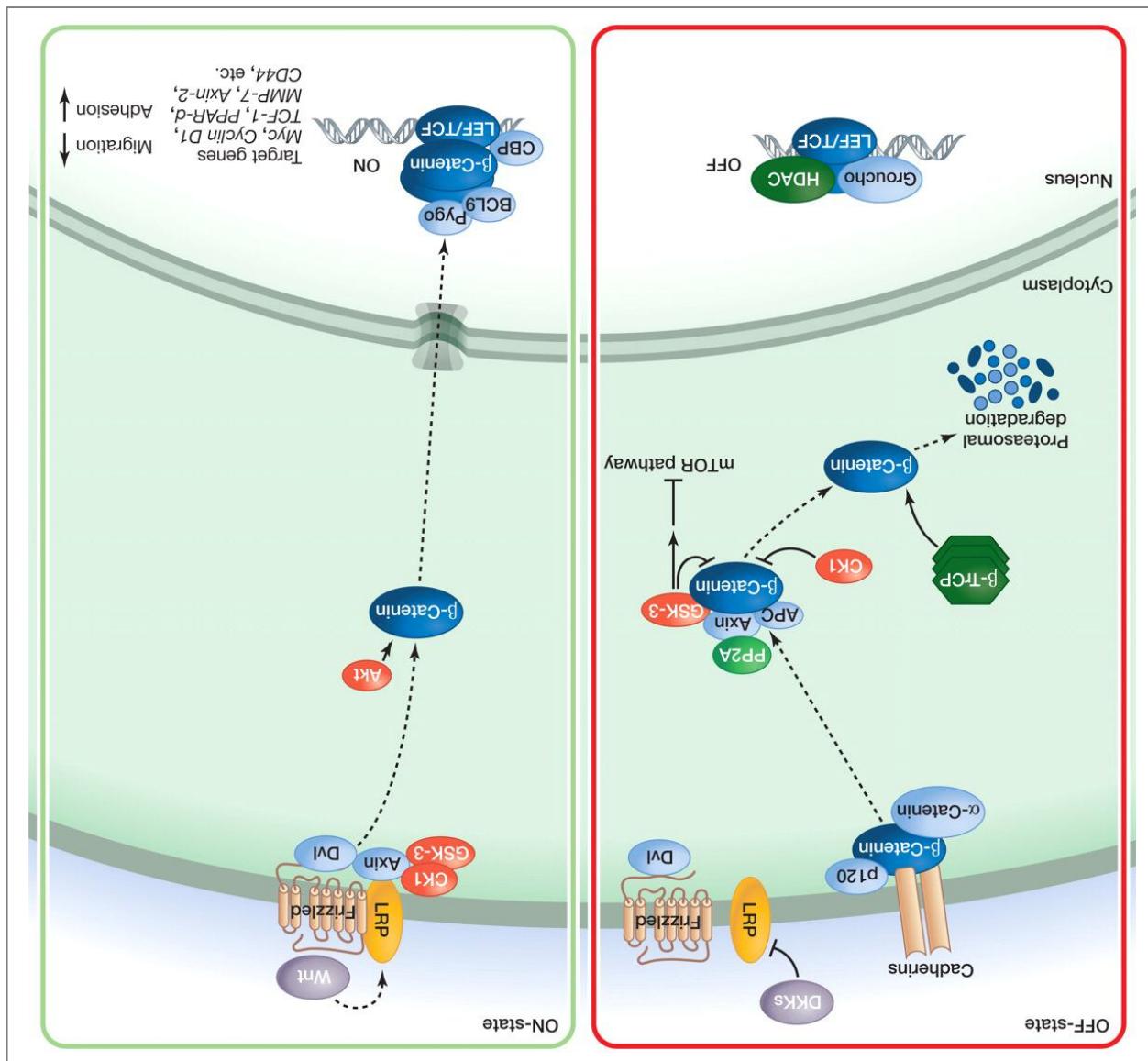
s travením spojené ukoji střevní tkané (Obrázek č.2).

dosázení okrajové krypty tak na kleny směřují již plně vyzrále buňky, které nasledně plní všechny několikrát projdou buněčným cyklem a zahrájí rozružnění do jednotlivých střevních linií. Po buněk. Tyto buňky pak putují směrem vzhůru po délce svisele osy krypty. Během této cesty dceřiné populaci rovněž se rychle delší, tzv. transit-amplifying (TA) progenitorových dceřiné kmenových buněkmi ze dna krypty, které se často dělí, a tím dávají vzniknout sliznice kmenovými buňkami nazývanými kleny. V tří savců představuje dynamika zvyšeného vstřebávací plochy je dale vystělka tenkého střeva uspořádaná do zvláštních výčněliků, nazývaných slizniční kleny. V tří savců představuje dynamika podložního pozívové tkané, tzv. laminy propria. Tím se tvorí turbokovité zlázové zvané krypty. Pro zvláštní celkové vstřebávací plochy je dale vystělka tenkého střeva uspořádaná do zvláštních výčněliků, nazývaných slizniční kleny. V tří savců představuje dynamika

3.2 Signálizácie Wnt v homeostáze a zhoubne

expressi ciliových genů dráhy Wnt. Obrázek převzat z publikace (Nusse, 2012).
 Jako transkripcní kofaktér, který moduluje v součinnosti s regulátorními proteiny z rodiny LEF/TCF receptoru LRP. B-katenin tak unika své degradaci a premisuje se do buněčného jádra. Tam působí kofaktorem Frizzled a LRP působí komplexy proteinů Axin/GSK-3β k cytoplasmatickým částem umělovaný transkripcními reprezory z rodiny Groucho. Vazba ligandu Wnt na komplex jeho degradací. Za kladových podmínek jsou tak oblasti genomu, které podléhají regulaci protenosomální komplexem záhybené molekuly B-kateninu jsou fosforylovány a poté zněčeny protenosomální následně připojen k ináz Glykogen Syntázě 3 (GSK-3β) a kasein Kinázě 1a (CK1α). Veskre pro (APC) se vazí s blikavou Axis inhibiční protein (Axin), zíz vytváří molekulární „lesení“ pro nizké hladiny, a to díky aktivity velkého degradacního komplexu. Protein Adenomataous Polyposis Coli (APC) je vnitrobuněčná úroveň B-kateninu trvale udržována na kanonická dráha přenosu signálu Wnt rozchádží o posttransláciu stabilitu proteinu B-katenin.

Obrázek č. 1 | Kanonická signálizace Wnt



zprávě negativní (Jho et al., 2002) nebo pozitivní (Barker et al., 2007) smyčky (**Obrázek č.1**). Kódůjící vnitřní komponenty samotné dráhy Wnt. Dráha tak podlehlá elegantnímu řízení přes Molenaar et al., 1996). Mezi nejvýznamnější takto regulované ciliové geny pak patří geny LEF/TCF, v důsledku čehož dochází k modulaci exprese ciliových genů (Behrens et al., 1996; druhé roli pak jako transkripcní koaktivátor spoluúpracuje s DNA-vazebnými proteiny z rodiny strukturálně podílí na vystavě kádherinových adhesních spojů (Ozawa et al., 1989). Ve své prenáséce a ciliového proteinu, β -kateninu. Ten toto bifunkční protein se v první řadě svých roli kanonická signifikace Wnt je regulovaná převážně na úrovni svého křízového

nekanonické nebo též jako nezávisle na β -kateninu)

3. dráha Wnt- Ca^{2+} (obě naposled jmenované cesty jsou souhrnně označované jako low density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6))
2. dráha tzv. „Planner cell polarity“ (PCP), která nevyžaduje zapojení β -kateninu a receptoru z rodiny lymphoto-enzaner-binding factor/T-cell factor (LEF/TCF)
1. dráha β -kateninu (kanonická dráha), která závisí na β -kateninu a transkripcních faktorech

V souhrnu lze říci, že existují tři různé cesty přenosu signálů Wnt:

3.1 Signální dráha Wnt

Morfogenetické proteiny z rodiny Wnt mají u mnohobuněčných organismů nejrůznější využití degenerativních chorob. Vývojní signální dráhy Wnt je vlastně vývojem, který hladiny signifikantní činnosti jsou naložené základem pro onemocnění, zejména rakoviny. Nízké hladiny signifikantní činnosti jsou naložené základem pro dráhy dle požadavku místního prostředí. Namáhání signifikantní činnosti ke vzniku různých fyziologickém rozmezí různé regulaci obvykle a smyčky, které přizpůsobují hladinu aktivity pak specifickyho typu předurčených, tzv. progenitorových buněk. Signifikantní Wnt udružuje všechny buněky v daném místě do jednoho typu, který je schopen vytvářet nové buněky, které pak vytvářejí nové buněky, a tak vzniká vývojový cyklus.

3. Úvod

Ctvrtý, přehledový čísněk shrnuje poznatky o zakladních signálních dráhách, které se podílejí na homeostáze a správě vystavěté trávicího traktu. Práce zahrnuje popis kaskád Wnt/B-kateninu a Notch a dale se zabývá signálními dráhami zahrnovajícími ligandy z rodin Hedgehog, EGF nebo BMP. Veskeré dráhy jsou programem zjednodušením s ohledem na jejich zásadní role ve fyziologických i Zhoubynych procesech sterevní tkáni.

Třetí publikace charakterizuje protein TROY, patřící do rodiny receptorů pro faktor nekrotizující nádory (TNFR), jako nový inhibitor signální kaskády Wnt. Samotný gen TROY se pak zahrává v kontextu střevní tkáně stavá ciliovým genem této dráhy. Expressie blikoviny Troy se v trávicím traktu omezuje na rychle se dělící kmenové buňky, což umožňuje tento gen povzbuzat za nový marker těchto buněk. Troy pravděpodobně interaguje s jiným, dobré charakterizovaným znakem této buněk, a to receptorem Lgr5; vysledkem této vazby je pak inhibice dráhy Wnt. Zvyšené množství blikoviny Troy jsme detekovali v nadorech vyvýjených v systémy věrné napodobují dědičnou nebo ziskanou formu onemocnění, která jsou "poháněna" nekontrolovanou aktivací dráhy Wnt. Naproti tomu nasbírané vzhledy lidských pacientů trpících kolorektálními karcinomy poukazují na jiný typ chování genu TROY.

Druhá publikace přináší podrobný popis přípravy dvoj nových, geneticky pozmeněných alel myšího genu *Hic1*. Tento gen je popsán jako nádorový supersor, který koduje negativní regulátor dráhy Wnt. Podmíněné deletovatelná, tzv. knock-out alela značně zvláštně fluorescenčního proteinu (EYFP), a tak umožňuje *in vivo* sledovat přirozeny výskyt *Hic1*.

Sígnálu dráha spouštěna protěiny Wnt se vyznamená podíl na kontrole procesu zárodečného vývoje. V dosavadním orgánismu pak tato kaskáda rádi zjednána homeostazu tkání. Ve výstěle tráviciho traktu udružuje fyziologickou hladinu signálizace Wnt různé regulaciní děje, které zároveň využívají protichůdné procesy proliferace, sebeobnovy kmenových buněk či jejich diferenčiaci do jednotlivých buněčných střevnicích linií. Bylo jednoznačně prokázáno, že nekontrolovaná aktivace kaskády Wnt vedle k vývinu rakoviny travicího traktu. Překládaná práce se zaměřuje na popis nových způsobů regulace dráhy specifických mechanismů. Výsledky jsou předloženy ve třech výzkumných publikacích a dale Wnt, tykajících se nejen všeobecné platnosti aspektů prenosu signálů Wnt, ale i kontextové spezifikacích mechanismů. Výsledky jsou předloženy ve třech výzkumných publikacích a dale

2. South

APC	Adenomatous Polyposis Coli	Axin	Axins Inhibition protein	BMP	Bone Morphogenic Protein	CBC	Cylindrical buňky lokalizované do sponní části střevních krypt	CDNA	Komplexní DNA	CK1α	Kasein Kinaza 1a	CreERT2	Cre rekombináza spojená s ligand-vazebnou doménou	CSCs	nádrově kmenové buňky	DII	Delta-Like Ligand	DNA	Deoxyribonukleová kyseľina	EGF	Epidermální růstový faktor	EYFP	Zluty fluorescenční protein	GSK-3	Glykogen Synthase Kinaza 3	Hic1	Hypermethylated in Cancer 1	HMG	High Mobility Group	IRES	Internal Ribosome Entry Site	LEF	Lymphocyte-Enhancer-binding Factor	LRP	Low density lipoprotein Receptor-related Protein	LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor	PCP	Planner Cell Polarity	RNA	Ribonukleová kyseľina	RNAi	RNA interference	RT-qPCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction	TA	S-palmitoylation	TCF	T-Cell Factor	TCF12	gen kodující TCF4	TNFR	receptor pro faktor nekrotizující nádory	Troy	gen nadrodiny receptoru pro faktor nekrotizující nádory		exprimovaný v celém embryu
-----	----------------------------	------	--------------------------	-----	--------------------------	-----	--	------	---------------	------	------------------	---------	---	------	-----------------------	-----	-------------------	-----	----------------------------	-----	----------------------------	------	-----------------------------	-------	----------------------------	------	-----------------------------	-----	---------------------	------	------------------------------	-----	------------------------------------	-----	--	------	---	-----	-----------------------	-----	-----------------------	------	------------------	---------	--	----	------------------	-----	---------------	-------	-------------------	------	--	------	---	--	----------------------------

1. SEZNAM ZKRÁTEK

1.	Seznam zkrátek	3
2.	Souhrn	4
3.	Uvod	5
3.1	Signální draha Wnt	5
3.2	Signálizace Wnt v homeostaze a zhoubné přeměně střevní/epitelové tkáně	6
4.	Cíle práce	9
5.	Materiál a metody	10
6.	Výsledky a diskuze	10
6.1.	Modifikace proteínu Wnt1 a Wnt3a předavkem mastné kyseliny na serin je předpokládem pro následnou lipidaci na cysteinu a je nezbytná pro signálizaci Wnt. 10	
6.2.	Tvorba tvou myšich kmenů nesoucích geneticky pozmeněné alely nadorového superoru <i>Hic1</i>	11
6.3.	Troy, člen rodiny receptoru faktoru nekrotizujícího nádory, interaguje s proteinem Lgr5 a inhibuje signálizaci Wnt ve střevních kmenových buňkách	12
6.4.	Drahy přenosu signálu, podlejíci se na homeostaze a zhoubné přeměně střevní tkáně	13
7.	Závěry	13
8.	Pozitiva literatura	14
9.	Zivotopis	16

Práha, 2013

Akademie věd České republiky
Ústav molekulární genetiky, V.V.I.
Laboratoř buněčné a vývojové biologie
školitel: RNDr. Vladimír Kotrlík, CSc.

na kontrole signální dráhy Wnt
Molekulární mechanismy a geny podílející se
Michaela Krausová



Autoreferát dízeretacní práce
Doktorsky studijní program: Biokémie

Katedra biokémie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze