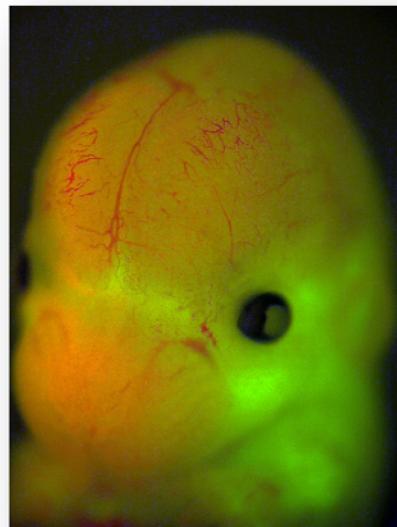




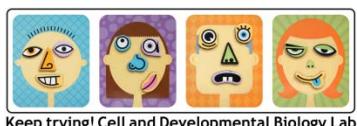
VENDULA POSPÍCHALOVÁ

REGULATORY MECHANISMS OF WNT SIGNALLING



Summary of PhD. thesis

Supervisor: Vladimír Kořínek, PhD.



**Laboratory of Cell and Developmental
Biology**

**Institute of Molecular Genetics
Academy of Sciences of the Czech Republic**



Prague, 2012

DOCTORAL STUDIES IN BIOMEDICINE

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

Programme: **IMMUNOLOGY**

Committee chair: **ASSOC. PROF. VLADIMÍR HOLÁŇ, PhD**

The thesis was done in: **Laboratory of Cell and Developmental Biology
Institute of Molecular Genetics
Academy of Sciences of the Czech Republic**

Author: **VENDULA POSPÍCHALOVÁ, MSc**

Title: **REGULATORY MECHANISMS OF WNT SIGNALLING**

Supervisor: **VLADIMÍR KOŘÍNEK, PhD**

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

CONTENTS

1. LIST OF ABBREVIATIONS	5
2. ABSTRACT	6
3. REVIEW OF THE LITERATURE	7
3.1. The Wnt signalling pathway	7
3.2. Role of Wnt signalling in the intestinal epithelium and colorectal cancer	8
3.3. HIC1 tumour suppressor	11
4. RESULTS AND DISCUSSION	12
4.1. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling	12
4.2. Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF4	13
4.3. TROY, the tumour necrosis receptor family member 19, interacts with stem cell marker Lgr5 and inhibits Wnt signalling	14
4.4. Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumour suppressor gene	15
4.5. The biological role of HIC1 tumour suppressor gene	16
5. CONCLUSIONS	18
6. REFERENCES	19
7. CURRICULUM VITAE	20

Cover image: 14.5 days old embryo of *Hic1-citrine* knock-in ‘reporter’ mouse. Fluorescence of protein citrine reveals expression of *Hic1* in craniofacial and nasal area, the presumptive maxillary/mandibular components of the first branchial arch, and in mesenchyme adjacent to precartilage or cartilage condensations of the skeletal system of limbs.

1. LIST OF ABBREVIATIONS

4-OHT	4-hydroxy tamoxifen
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Atoh1	Atonal homologue 1 (Math1)
BTB/POZ	Broad-Complex, Tramtrack, Bric à brac/ Pox virus and Zinc finger
CBC	Columnar based cells
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
cit	Citrine
CK1	Casein Kinase I
CRC	Colorectal cancer
CreER ^{T2}	Cre recombinase fused to oestrogen receptor (regulated by 4-OHT)
CtBP	C-terminal Binding Protein
Dazap	Deleted in azoospermia associated protein
delEx2	deleted exon 2
Dsh/Dvl	Dishevelled
E	embryonic day
EGF	Epidermal Growth Factor
Flox	flanked with <i>loxP</i> sites
Gfi1	growth factor independent 1
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HDAC	Histone Deacetylase
Hes 1	hairy/enhancer of split 1
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HiRE	HIC1 Responsive Element
HMG	High Mobility Group
INT-1	integrated 1
LEF 1	Lymphoid Enhancer Factor 1
LGR	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor
LRP5/6	Low Density Lipoprotein Related Protein 5/6
MEFs	Mouse embryonic fibroblasts
Neurog3	Neurogenin 3
SIRT1	Sirtuin 1
Sox9	SRY-box containing gene 9
Spdef	SAM pointed domain containing Ets transcription factor
TA	Transit amplifying
TCF	T-Cell Factor
TGF	Tumour growth factors
TLE 1	Transducin-Like Enhancer 1
Tlr2	Toll-like receptor 2
TMCO1	Transmembrane coiled-coil domains 1
TNF	Tumour Necrosis Factor
TNFRSF19	TNF receptor superfamily member 19
TROY	TNF receptor superfamily member expressed on the mouse embryo
Wnt	wingless, int-1
Y2H	Yeast two hybrid

2. ABSTRACT

The Wnt signalling pathway is one of the major signal transduction cascades in all multicellular organisms ensuring successful embryogenesis³⁻⁵, regeneration⁶⁻⁸ and tissue homeostasis^{2, 9}. Accordingly, mutations in the pathway lead to birth defects^{10, 11} and to various diseases¹², most notably cancer¹³⁻¹⁵.

β -catenin is a central mediator of canonical Wnt signalling (also called Wnt/ β -catenin signalling). In unstimulated cells β -catenin is being constantly destabilized by a multiprotein complex and degraded in the proteasome. Unlike in the presence of Wnt ligands when they engage their receptors, degradation complex disassembles, β -catenin is stabilized and translocates to the nucleus to serve as a co-activator of Lef/Tcf transcription factors and to drive the transcription of Wnt target genes^{16, 17}. Wnt/ β -catenin signalling is tightly regulated at various levels by as many as hundred proteins.

This thesis is based on four original articles and unpublished data that aim to increase the knowledge of the regulation of the Wnt signalling pathway. The first publication focuses on sequential posttranslational processing of the Wnt ligands. The next article discusses the positive role of nuclear protein Dazap2 in determination of the Wnt/ β -catenin signalling outcome. The third study reports TROY as a novel negative modulator of the Wnt pathway which reduces the levels of Wnt signalling in LGR5-positive stem cells of intestinal epithelium. Finally, the last issue depicts generation of two gene-targeted mouse strains that enable studying the role of Hic1 *in vivo*. The last chapter of the thesis describes unpublished data on the nature of HIC1 bodies, HIC1 physical interaction with members of the Wnt pathway, novel target genes and consequences of conditional *Hic1* deletion in the intestinal epithelium which results in mis-regulation of secretory cell types and enhanced tumourigenesis.

In conclusion, our findings contributed to the field of regulation of a fundamental signalling pathway in development and disease.

3. REVIEW OF THE LITERATURE

Signal transduction pathways are molecular instruments that play diverse and context-dependent roles in an incredibly complex process of vertebrate development. In adults, the same evolutionary conserved pathways orchestrate the every-day tissue renewal and regeneration in many organs after injury.

3.1. The Wnt signalling pathway

The Wnt signalling pathway plays a critical and evolutionarily conserved role in directing cell fates during embryogenesis¹⁵ and adult tissue maintenance⁹ and regeneration⁸. However, as a double edged sword, mutations in the components of Wnt pathway are very often exploited in cancerogenesis² and neurodegenerative diseases¹⁶.

Wnt signalling splits into canonical and non-canonical pathways based on their ability to stabilize β -catenin, a central molecule to the canonical Wnt signalling cascade. In this thesis, only the heavily studied canonical, β -catenin-dependent, signalization (Wnt/ β -catenin signalling) is dealt with. The stabilization of cytosolic β -catenin is a central logic of the canonical Wnt signalling. In cells not exposed to Wnt, β -catenin is constantly degraded in the proteasome through interactions with Axin, adenomatous polyposis coli (APC), casein kinase 1 (CK1), and glycogen synthase kinase 3 (GSK-3). When a Wnt ligand binds to the Frizzled/LDL-related protein (LRP) receptor complex at the cell surface, these receptors transduce the signal to Dishevelled (Dsh/Dvl) and to Axin. As a consequence, the degradation of β -catenin is inhibited and it accumulates in the cytoplasm. Stable β -catenin enters the cell nucleus where it associates with the pathway specific T cell factor/Lymphoid enhancer (TCF/LEF) transcription factors to regulate expression of the Wnt/ β -catenin responsive genes, such as *c-MYC* and *Cyclin D1* (*CCND1*)¹⁶ [Figure 1].

The pathway itself is tightly regulated at various levels. The first level of regulation is the synthesis and processing of the Wnt ligands themselves. Next, the activity of the Wnt ligands is stimulated or attenuated in the extracellular space by a diverse group of antagonists, co-factors and co-receptors. In the cytoplasm, the amount of β -catenin is constitutively reduced by a large destruction protein complex. In the nucleus, the transcriptional stimulation of the target genes is modulated by a complicated interplay

between various activators, repressors and other auxiliary factors. All the details on the pathway including the historical perspectives are available in recent reviews^{2, 15, 16} as well as at the Wnt home page (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>).

Of the numerous Wnt pathway modulators, Dazap2,

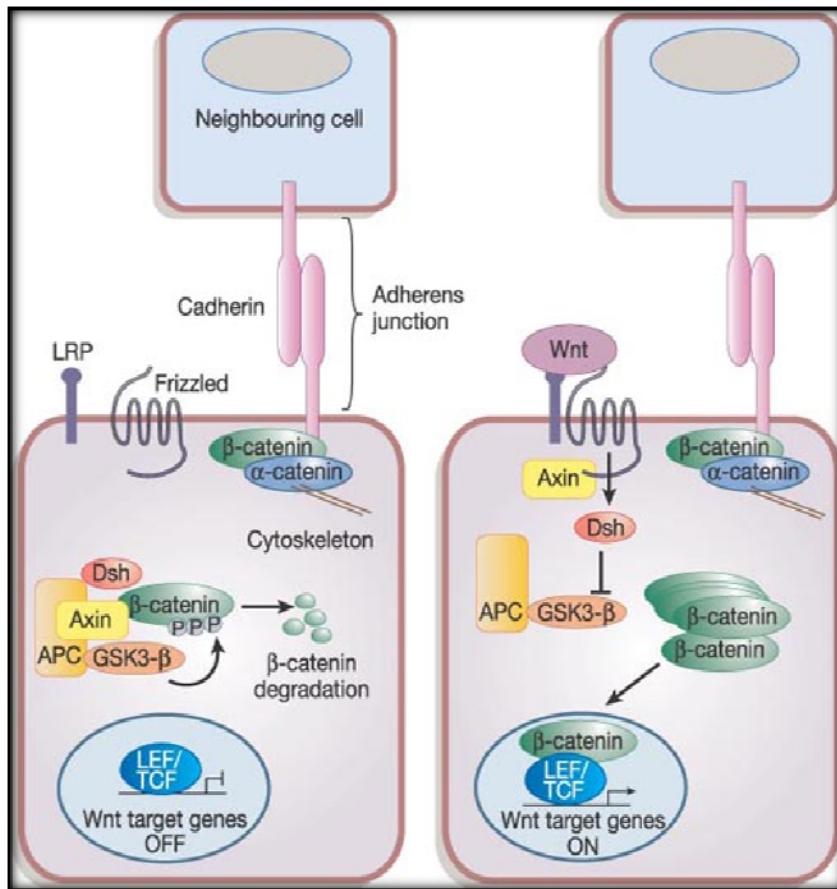


Figure 1. Wnt/β-catenin signalling. In the absence of Wnt ligand (left panel), cytosolic β-catenin forms a complex with Axin, APC, GSK3, and CK1, and is phosphorylated by CK1 and subsequently by GSK3-β. Phosphorylated β-catenin is targeted for proteasomal degradation and the target genes are repressed by Groucho co-repressors. β-catenin also exists in a cadherin-bound form and regulates cell-cell adhesion. In the presence of Wnt stimulus (right panel), β-catenin is uncoupled from the degradation complex allowing it to accumulate in the cytoplasm. Finally, β-catenin enters nucleus where it serves as a coactivator for TCF/LEF family of proteins to activate Wnt-responsive genes. Adopted from².

Troy and Hic1 are discussed

further.

3.2. Role of Wnt signalling in the intestinal epithelium and colorectal cancer

The epithelia of gastrointestinal tract represent the most rapidly self-renewing tissue in the adult mammalian body (reviewed in). The absorptive single-layer epithelium of the small intestine is ordered into invaginations called crypts of Lieberkühn (henceforth only crypts) and microscopic finger-like protrusions called villi. The colon epithelium contains crypts but has a flat surface. The mouse intestinal epithelium completely renew approximately every three to five days. Each crypt contains several long-lived stem cells, which proliferate and feed an upward compartment of transit-amplifying (TA), progenitor cells. The TA cells frequently divide and move upwards from the crypt. When they reach the edge of the crypts, they differentiate either into the predominant absorptive cell type enterocyte or into a member of secretory cells lineage. Secretory

cells can be subdivided into three main cell types: mucus-producing goblet cells, hormone-secreting enteroendocrine cells, and bactericidal and stem cell niche constituting Paneth cells. In addition, minor populations are represented by opioids releasing tuft cells and antigen sampling M-cells [Figure 2]. The differentiated cells continue their upward migration and when they reach the top of the villus (small intestine) or the luminal surface (colon), they undergo apoptosis and are shed to the intestinal lumen¹⁸. Paneth cells are an exception to the scheme. These antibacterial agents producing cells stay at the crypt base where they persist for approximately three to six weeks and serve as multifaceted guardians of the stem cell niche¹⁹.

Active Wnt signalling in the intestinal epithelium is essential for the preservation of undifferentiated and proliferative status of the stem and progenitor cells²⁰. At the bottom of the crypts, Lgr5⁺ stem cells are interspersed between terminally differentiated Paneth cells. Lgr5 is a target of the Wnt pathway and numbers of Lgr5⁺ stem cells seem to be restricted by available Paneth cell surface²¹. Numbers of Paneth cells must therefore be tightly regulated, which is indeed the case, otherwise this may have delirious consequences, for instance cancer.

It has been postulated that cancer is a disease of stem cells. In a wide variety of cancers, including colorectal cancer (CRC), only a small subset of tumour cells are able to initiate and sustain malignant tumour growth and to give rise to the phenotypic heterogeneity observed in the tumour²². It is thus not surprising that the major pathway regulating stem cells in healthy intestinal tissue, the Wnt pathway, is the most frequently and the earliest pathway mutated in colorectal carcinogenesis with the tumour suppressor *Adenomatous polyposis coli (APC)* being a perfect example, as its mutations are found in the majority of intestinal cancers^{23, 24}. It is of vital importance, that a mutation in *Apc* is only tumour productive, if it happens in the stem cell²⁵. Mutation in a TA cell or a differentiated one will hardly manifest itself in tumour formation. This is due to the fact, that the progenitor (TA) or mature cells have a short lifespan and a limited opportunity to accumulate the multiple mutations in critical genes required for tumour development.

In conclusion, Wnt signalling has been indubitably linked to the CRC by a wealth of studies that provided invaluable insights into the disease. However, further molecular studies should be warranted before bringing new hope for patients.

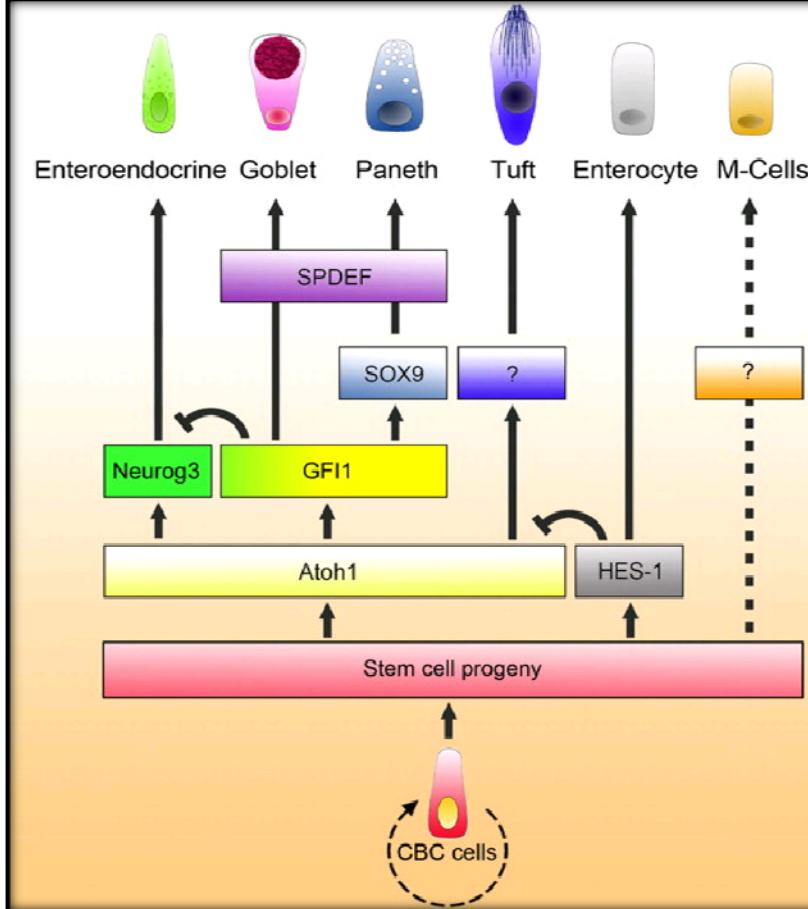
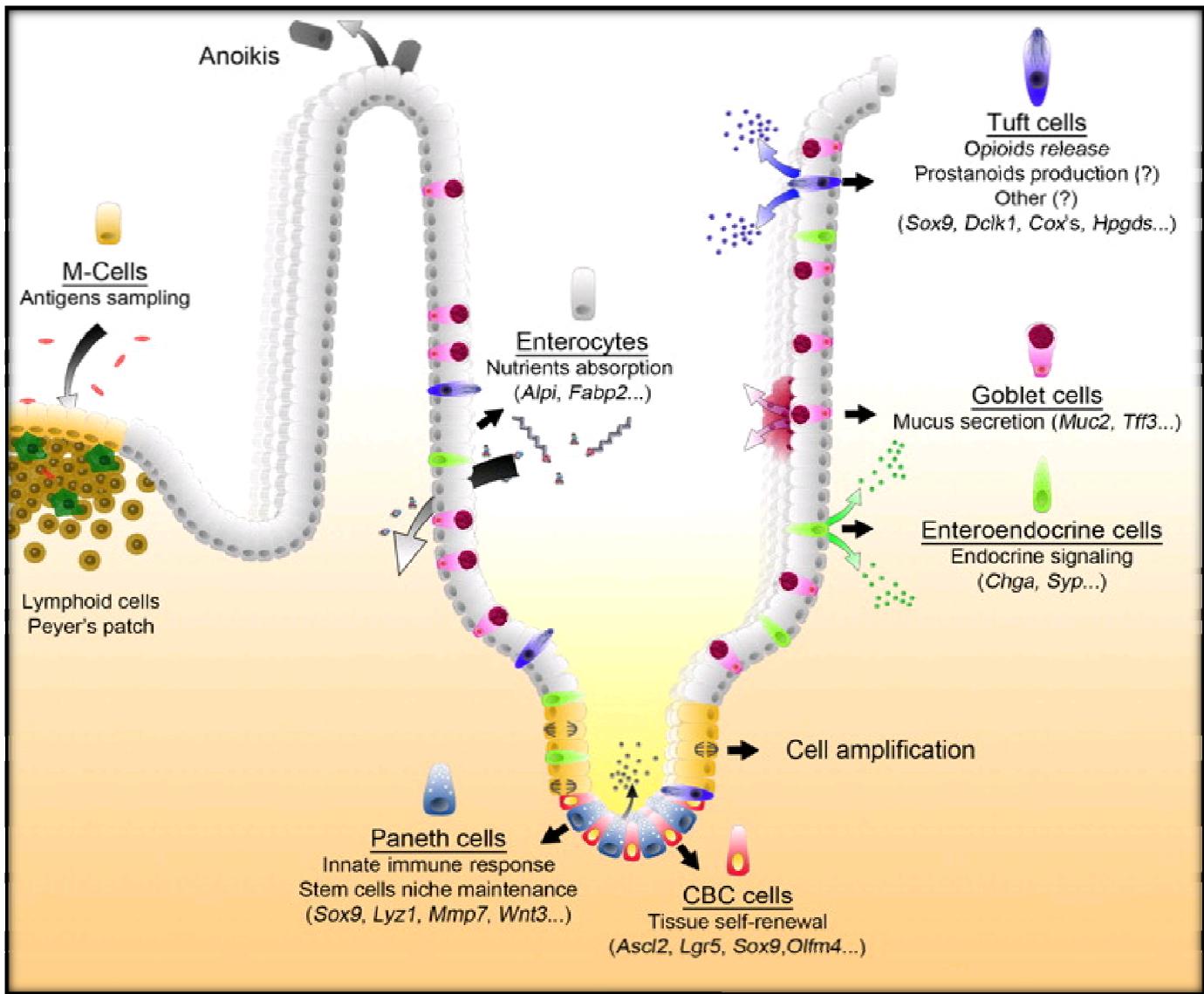


Figure 2. The epithelium of the small intestine. Up, the scheme represents a crypt/villus unit in the adult mouse small intestinal epithelium. The main functions and representative molecular markers identifying each of the cell types and the intestinal stem cells (CBCs) are indicated. Down, the genetic hierarchy of epithelial cell lineage commitment in the intestine. CBCs proliferate and produce progenitors. Choice between absorptive or secretory cell fates is under the control of the *Hes1* or *Atoh1* gene. Within the cells committed to secretory types, *Neurog3* is required for enteroendocrine cell differentiation. *Gfi1* is required for Paneth and goblet cell differentiation, preventing the expression of *Neurog3*. *Sox9* is essential for differentiation of Paneth cells. *Spdef* is required for both Paneth and goblet cell terminal maturation. Adopted from¹.

3.3. HIC1 tumour suppressor

HIC1 (*Hypermethylated In Cancer 1*) was isolated as a candidate tumour suppressor gene during the screening of the short arm of chromosome 17, that is frequently altered in human cancers²⁶. HIC1 encodes an evolutionary conserved transcription repressor, whose target genes remain largely unknown. However, the known target genes participate in diverse cellular processes, including DNA damage response, cell cycle regulation, differentiation of progenitor cells and metastatic invasion²⁷. Although silencing of HIC1 expression during cancerogenesis has been known for almost fifteen years, the biological role of HIC1 remains elusive.

Data obtained from mice have firmly established *Hic1* as a tumor suppressor gene. *Hic1*^{+/−} mice develop spontaneous malignant tumors, interestingly with a gender-dependent pattern and with a dense promoter hypermethylation and concomitant silencing of the remaining *Hic1* allele²⁸. *Hic1*^{−/−} mouse die perinatally probably due to severe developmental defects of head and limbs²⁹. Such embryonic lethality stresses the importance of *Hic1*, but at the same time limits the use of these mice for further studies and calls for generation of conditional knock-out allele.

HIC1 was encountered in our lab during the search for novel regulators of Wnt signalling pathway. Two TCF/LEF family members, TCF3 and TCF4, associate with CtBPs. Therefore, we performed Y2H screen for interacting partners using CtBP as a bait. Our team identified HIC1 as a CtBP-associating protein and later on reported this ubiquitously expressed transcription factor as an attenuator of Wnt/β-catenin signalling³⁰.

Several issues made us to extend our *in vitro* studies of HIC1 to *in vivo* model. First, the unique features of the intestinal self-renewal epithelia make them an ideal target for testing tumour suppressor functions. Second, the rapid turnover of the intestinal epithelium is ruled by the Wnt signalling pathway. Next, *Atoh1* was recently published as a *Hic1* target gene in the nervous system³¹; however, *Atoh1* is also essential for differentiation of the intestinal secretory cells. Having developed the *Hic1*^{fl/fl} mice and having the established methodologies, we investigated the role of *Hic1* in the intestinal epithelium and contribution of its inactivation to intestinal neoplasia.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. 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 is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. Doubravská L, Krausova M, Gradl D, Vojtechova M, Tumova L, Lukas J, Valenta T, **Pospichalova V**, Fafilek B, Plachy J, Sebesta O, Korinek V. *Cellular signalling*. 2011 May;23(5):837-48. Epub 2011 Jan 16.

Abstract:

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

4.2. Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF4

Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4. Lukas J, Mazna P, Valenta T, Doubravská L, **Pospichalova V**, Vojtechová M, Fafílek B, Ivanek R, Plachý J, Novák J, Korinek V. *Nucleic Acids Research*. 2009 May;37(9):3007-20. Epub 2009 Mar 20.

Abstract:

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

4.3. TROY, the tumour necrosis receptor family member 19, interacts with stem cell marker Lgr5 and inhibits Wnt signalling

TROY, the tumour necrosis receptor family member 19, interacts with stem cell marker Lgr5 and inhibits Wnt signalling. 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*. Under revision.

Abstract:

Background & Aims

In the intestine, the Wnt signaling pathway plays two seemingly opposing roles. Under physiological conditions the pathway is required for maintenance of the intestinal epithelia and its blocking diminishes the proliferative capacity of the intestinal stem cells. Conversely, aberrant Wnt signaling leads to intestinal cancer.

Methods

To investigate the role of the Wnt pathway in gut epithelium homeostasis and its malignant transformation, we employed the chromatin immunoprecipitation method in combination with DNA microarrays (so-called ChIP-on-chip) to identify genes regulated by Wnt signaling in colorectal cancer (CRC) cells.

Results

Promoter regions of 960 genes interacting with the Wnt pathway nuclear effector T-cell factor (TCF) 4 were identified in four different human CRC-derived cell lines; 18 of these promoters were present in all chromatin precipitates. One of the most prominent targets of canonical Wnt signaling was *TROY*, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF). *TROY* messenger RNA (mRNA) was increased in human cells deficient in the *adenomatous polyposis coli* (*APC*) gene and in cells stimulated with the Wnt3a ligand. Moreover, *Troy* expression was significantly upregulated in neoplastic tissues in two mouse models of intestinal tumorigenesis. Lineage tracing experiments revealed that *Troy* is produced specifically in the fast-

cycling intestinal stem cells. TROY associates with a unique marker of these cells, leucine-rich-repeat containing G-protein coupled receptor (LGR) 5, and suppresses Wnt signaling.

Conclusions

TROY functions as a negative modulator of the Wnt pathway to reduce the levels of Wnt signaling in LGR5-positive stem cells.

4.4. Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumour suppressor gene

Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumour suppressor gene.

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

Abstract:

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

4.5. The biological role of HIC1 tumour suppressor gene

In order to contribute to the knowledge of HIC1 role in the cell, we study HIC1 by differential approaches using a pallet of methodologies. This part of the thesis contains the unpublished data on HIC1 gained during my PhD study, which can be summarized as follows:

1. HIC1 bodies are dynamic, cell cycle-regulated structures that do not colocalize with markers of known nuclear bodies or speckles.
2. HIC1 physically associates with several components of the Wnt signalling pathway, namely APC, Dvl3 and likely kinases CKI, CKII and GSK3,
 - the intact CtBP-binding domain of HIC1 protein, unlike the CtBP-binding domain of APC, is indispensable for interaction between HIC1, CtBP and APC.
3. *TMCO1* is a novel target gene negatively regulated by HIC1 identified in WI38 cells
 - two hundred genes are significantly up-regulated upon HIC1 knock-down in primary human cells,
 - *TMCO1* is repressed by HIC1 in human primary fibroblasts, CRC cell lines and in MEFs,
 - HIC1 co-operates with CTBP in negative regulation of *TMCO1*.
4. Whole genome search for new target genes of *Hic1* in mouse revealed that only seven genes were significantly upregulated upon conditional *Hic1*-deletion in MEFs,
 - the most interesting candidate to be further validated is *Toll-like receptor 2 (Tlr2)*.
5. Homozygous disruption of *Hic1* in *Hic1^{cit}* and *Hic1^{delEx2}* mice results in early embryonic lethality, which is in contrast with the data reporting perinatal lethality of *Hic1^{-/-}* mice.
6. HIC1 maintains the homeostasis of the intestinal epithelium by determining the secretory cell fate
 - *Hic1* is efficiently depleted from intestinal epithelium of *Hic1^{fl/fl}Villin1-CreER^{T2}* and *Hic1^{fl/fl}Lgr5-CreER^{T2}* model mice after tamoxifen administration,
 - decreased level of *Hic1* is accompanied by an increased expression of its target

genes *Atoh1*, *Sirt1* and *Sox9*, which we assume account for altered cell fate decision of secretory cells,

- short term *Hic1* deletion in the intestinal epithelium mispositions and increases Paneth cell marker expression and goblet cell numbers at the expense of enteroendocrine cells,
- long term depletion of *Hic1* in the intestinal epithelium leads to formation of dysplastic villi and preneoplastic lesions that are infiltrated with inflammatory cells which are believed to sustain a chronic inflammation, a condition that clearly enhances the tumourigenic process,
- hyperplastic lesions are potential sites of further mutation accumulation and can be considered as a ‘mucosa at risk’.

7. *Hic1* synergizes with *Apc* tumour suppressor gene in preventing the tumourigenesis in the intestine

- *Hic1* deletion is insufficient to induce tumour formation
- depletion of *Hic1* is able to promote cancerogenesis in an established model of intestinal neoplasia
- the germ line inactivation of *Hic1* confers more severe cancer phenotype than the conditionally inactivated *Hic1* allele in the adulthood.

8. CONCLUSIONS

This thesis is based on four original articles and unpublished data that aim to increase the knowledge about the regulation of the Wnt signalling pathway. The results are summed up below:

1. Wnt ligands trigger the signalling cascade. The ligands are glycosylated and double acylated and we provided an evidence for the sequence of these posttranslational modifications. First, N-glycosylation occurs, second palmitoleylation on serine conditions and precedes the cysteine palmitoylation. Moreover, lipid adducts are necessary for interaction of Wnt proteins with the extracellular matrix, which is connected to their ability to induce Wnt signalling.
2. Focusing on the cell nucleus, we described a small and evolutionary conserved protein Dazap2 as a TCF4 interacting partner. Dazap2 positively modulates TCF4 affinity for its specific DNA sequence and thus its knock-down has negative impact on Wnt/β-catenin-stimulated transcription.
3. The next manuscript depicts the identification and characterization of the Wnt/β-catenin pathway target gene *TROY* encoding a membrane protein from the TNF receptor superfamily. In our study, we utilized lineage tracing experiments to show that TROY represents – next to LGR5 – another marker specific for the fast-cycling CBC stem cells of the intestinal epithelium. In addition, we proved that TROY interacts with LGR5 and limits the level of canonical Wnt signalling.
4. The last publication reports generation of two modified alleles of *Hic1* tumour suppressor gene. We generated a conditional *Hic1* null allele using *Cre/loxP* system to overcome the embryonic lethality of *Hic1*^{-/-} mice. Additionally, we used gene targeting to replace major coding part of *Hic1* by citrine fluorescent protein and generated *Hic1-citrine* ‘reporter’ mice with a reliable fluorescent surrogate marker of *Hic1* locus activity.
5. Using the *Hic1*^{fl/fl} mice we assessed the role of Hic1 in the homeostasis of the intestinal epithelium and show that *Hic1* deletion mispositions and increases Paneth cell marker

expression and goblet cell numbers at the expense of enteroendocrine cells. Long term depletion of Hic1 promotes formation of dysplastic villi and neoplastic inflammatory lesions in the intestinal epithelium which are at risk of further progression to malignancies. Consequently, stem cell and cancer stem cell markers are upregulated in the mucosa with metaplastic Paneth cells in Hic1-depleted intestines. Accordingly, Hic1 synergizes with Apc in the prevention of intestinal neoplasia.

Moreover, our team identified that HIC1 nuclear bodies are dynamically cycling structures and that HIC1 physically associates with several members of the Wnt signalling cascade, in particular with APC and Dvl3. Additionally, we reported *TMCO1* as a novel target gene of HIC1 and other target genes are being heavily sought after. Their identification is necessary for solving the question of the biological role of HIC1.

9. REFERENCES

1. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* 2011;192:767-80.
2. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843-50.
3. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-305.
4. Cadigan KM, Peifer M. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002881.
5. Guder C, Philipp I, Lengfeld T, et al. The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 2006;25:7450-60.
6. Stoick-Cooper CL, Moon RT, Weidinger G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev* 2007;21:1292-315.
7. Ito M, Yang Z, Andl T, et al. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 2007;447:316-20.
8. Chen Y, Alman BA. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J Cell Biochem* 2009;106:353-62.
9. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:409-14.
10. Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 1999;22:361-5.
11. Niemann S, Zhao C, Pascu F, et al. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 2004;74:558-63.
12. Cotter D, Kerwin R, al-Sarraj S, et al. Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia--evidence for neurodevelopmental abnormality. *Neuroreport* 1998;9:1379-83.
13. Nygren MK, Dosen G, Hystad ME, et al. Wnt3A activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines. *Br J Haematol* 2007;136:400-13.
14. Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 2005;205:130-44.
15. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
16. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17:9-26.
17. Moon RT. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* 2005;2005:cm1.
18. Ahuja V, Dieckgraefe BK, Anant S. Molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:90-4.
19. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011;469:415-8.
20. Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes & development* 2008;22:1856-64.
21. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2010;469:415-8.
22. Eaves CJ. Cancer stem cells: Here, there, everywhere? *Nature* 2008;456:581-2.
23. de Sousa EM, Vermeulen L, Richel D, et al. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2011;17:647-53.
24. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001;10:721-33.
25. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009;457:608-11.
26. Wales MM, Biel MA, el Deiry W, et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1995;1:570-7.
27. Fleurie C, Touka M, Boulay G, et al. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:26-33.
28. Chen WY, Zeng X, Carter MG, et al. Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 2003;33:197-202.
29. Carter MG, Johns MA, Zeng X, et al. Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene Hic1 exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;9:413-9.
30. Valenta T, Lukas J, Doubravská L, et al. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *Embo J* 2006;25:2326-37.
31. Briggs KJ, Corcoran-Schwartz IM, Zhang W, et al. Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev* 2008;22:770-85.
32. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007;449:1003-7.

CURRICULUM VITAE

Name and Title	Vendula Pospichalova, MSc.
Date of Birth	6 th July 1984
Nationality	Czech
Email	pospitch 

EDUCATION

2008 – 2012	PhD study – Faculty of Science, Charles University in Prague; programme Immunology <u>Title of PhD thesis:</u> Biological role of tumour suppressor HIC1, an inhibitor of Wnt signalling; Supervisor: Vladimir Korinek, PhD.
2006 - 2008	Master study - Faculty of Science, Charles University in Prague; programme Immunology <u>Title of Master thesis:</u> Tumor suppressor HIC1, novel inhibitor of Wnt signalling Supervisor: Vladimir Korinek, PhD.; Reviewer: Dominik Filipp, PhD.
2007	Erasmus - University of Wales, Bangor, United Kingdom; programme Biomedical science
2003 - 2006	Bachelor study - Faculty of Science, Charles University in Prague; programme Biology <u>Title of Bachelor thesis:</u> Wnt signalling in stem cells and cancer Supervisor: Vladimir Korinek, PhD.; Reviewer: Vladimir Krylov, Ph.D.
1999 - 2003	High school - Gymnazium, Jana Masaryka 1, Jihlava

LABORATORY EXPERIENCE

2005 – 2012	Laboratory of Cell and Developmental Biology , head: Vladimir Korinek, PhD., Institute of Molecular Genetics ASCR, v.v.i.
-------------	---

PUBLICATIONS

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. **TROY, the tumour necrosis receptor family member 19, interacts with stem cell marker Lgr5 and inhibits Wnt signalling.** *Gastroenterology*. Under revision.

Pospichalova V, Tureckova J, Fafilek B, Vojtechova M, Krausova M, Lukas J, Sloncova E, Takacova S, Divoky V, Leprince D, Plachy J, Korinek V. **Generation of two modified mouse alleles of the Hic1 tumor suppressor gene.** *Genesis*. 2011 Mar;49(3):142-51.

Doubravská L, Krausova M, Gradl D, Vojtechova M, Tumova L, Lukas J, Valenta T, Pospichalova V, Fafilek B, Plachy J, Sebesta O, Korinek V. **Fatty acid modification of**

Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. Cell Signal. 2011 May;23(5):837-48.

Pospichalova V. Tumour suppressor HIC1 – novel inhibitor of Wnt signaling; On generating gene targeted (Hic1 conditional knock-out and Hic1-reporter) mouse strains. LAP Lambert Academic Publishing. 2010
ISBN 978-3-8383-6123-9, paperback, 112 pages.

Lukas J, Mazna P, Valenta T, Doubravská L, Pospichalova V, Vojtechová M, Fafílek B, Ivanek R, Plachý J, Novák J, Korinek V. **Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4.** Nucleic Acids Res. 2009 May;37(9):3007-20.

CONFERENCES

- 2011 **Conditional mutagenesis in the mouse intestine – a tool to study the role of Hic1 tumour suppressor gene in colorectal cancer** – poster
 The EMBO Meeting 2011, Wien, Austria
- Hic1 tumour suppressor gene and colorectal cancer** – presentation
 Czech Wnt Network Workshop, Ondřejovice, Czech Republic
- HIC1 – an ugly duckling among tumour suppressors** – presentation – best presentation award in section Molecular Biology of Cancer
 The Student Scientific Conference on Cancer Research, Brno, Czech Republic
- 2010 **TMCO1: a novel target gene negatively regulated by tumour suppressor HIC1** – poster
 The EMBO Meeting 2010, Barcelona, Spain
- 2009 **Generating conditional knock-out mouse step by step** – presentation
 PhD conference IMG ASCR, v.v.i., Prague, Czech Republic
- Tumor suppressor HIC1 – a novel inhibitor of Wnt signalling** – presentation
 Czech Wnt Network Workshop, Lednice, Czech Republic

PERSONAL INTEREST

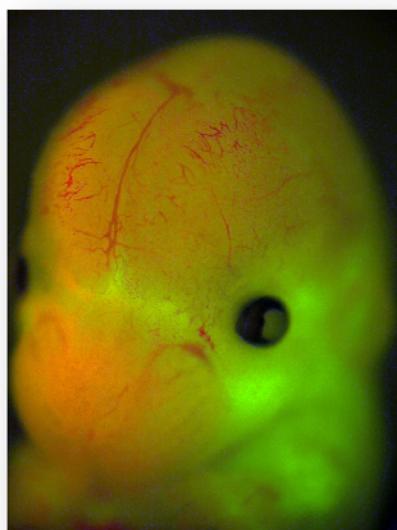
- Sport** in particular basketball and ninepins, less often cycling, skiing, in line skating, tennis
- Travelling** getting to know local culture and sights within our country and abroad
-

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Doktorský program: Imunologie



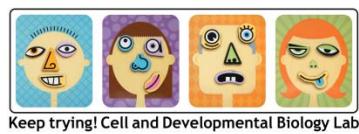
VENDULA POSPÍCHALOVÁ

MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY REGULACE SIGNÁLNÍ DRÁHY WNT



Autoreferát disertační práce

Školitel: Vladimír Kořínek, CSc.



**Laboratoř buněčné a vývojové biologie
Ústav molekulární genetiky, v.v.i.
Akademie věd České republiky**



Praha, 2012

DOKTORSKÉ STUDIJNÍ PROGRAMY V BIOMEDICÍNĚ

*Univerzita Karlova v Praze
a
Akademie věd České republiky*

Program: **IMUNOLOGIE**

Předseda oborové rady: **DOC. RNDR. VLADIMÍR HOLÁŇ, DRSC.**

Školící pracoviště: **LABORATOŘ BUNĚČNÉ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE
ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ GENETIKY, V.V.I.
AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY**

Autorka: **MGR. VENDULA POSPÍCHALOVÁ**

Název práce: **MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY REGULACE SIGNÁLNÍ DRÁHY WNT**

Školitel: **RNDR. VLADIMÍR KOŘÍNEK, CSc.**

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

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	28
2. ABSTRAKT	29
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	30
3.1. Signální dráha Wnt	30
3.2. Úloha signální dráhy Wnt ve střevě a při vzniku kolorektálního karcinomu	31
3.3. Nádorový supresor HIC1	34
4. VÝSLEDKY	35
5. ZÁVĚR A DISKUZE	36
6. LITERATURA	38
7. ŽIVOTOPIS	39

1. SEZNAM ZKRATEK

4-OHT	4-hydroxy tamoxifen
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Atoh1	Atonal homologue 1 (Math1)
BTB/POZ	Broad-Complex, Tramtrack, Bric à brac/ Pox virus and Zinc finger
CBC	cylindrické buňky na bazi střevních krypt
ChIP	chromatinová imunoprecipitace
cit	Citrine
CKI	Casein Kinase I
CRC	kolorektální karcinom
CreER ^{T2}	Cre rekombináza spojená s estrogenovým receptorem (regulovaná pomocí 4-OHT)
CtBP	C-terminal Binding Protein
Dazap	Deleted in azoospermia associated protein
delEx2	vystřízený exon 2
Dll4	Delta like 4
Dsh/Dvl	Dishevelled
E	embryonální den
EGF	Epidermální růstový faktor
Flox	ohraničené místy <i>loxP</i>
Gfi1	growth factor independent 1
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HDAC	deacetyzáza histonů
Hes 1	hairy/enhancer of split 1
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HiRE	HIC1 Responsive Element
HMG	High Mobility Group
INT-1	integrated 1
LEF 1	Lymphoid Enhancer Factor 1
LGR	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor
LRP5/6	Low Density Lipoprotein Related Protein 5/6
MEFs	myší embryonální fibroblasty
Neurog3	Neurogenin 3
SIRT1	Sirtuin 1
Sox9	SRY-box containing gene 9
Spdef	SAM pointed domain containing Ets transcription factor
TA	Transit amplifying
TCF	T-Cell Factor
TGF	Tumour growth factors
TLE 1	Transducin-Like Enhancer 1
Tlr2	Toll-like receptor 2
TMCO1	Transmembrane coiled-coil domains 1
TNF	Faktor nekrotizující nádory
TNFRSF19	člen č.19 nadrodiny receptorů pro faktory nekrotizující nádory
TROY	člen nadrodiny receptorů pro faktory nekrotizující nádory exprimovaný v celém myším embriu
Wnt	wingless, int-1
Y2H	kvasinkový dvojhybridní systém

2. ABSTRAKT

Signální dráha Wnt je jednou z hlavních cest mezibuněčné komunikace zajišťujících úspěšnou embryogenezi³⁻⁵, regeneraci tkání⁶⁻⁸ a homeostázi^{2, 9} mnohobuněčných organismů. Mutace v této signální dráze tudíž vedou ke vzniku vrozených vad^{10, 11} a různých onemocnění¹², především rakoviny¹³⁻¹⁵.

β -katenin je hlavním vnitrobuněčným prostředníkem kanonické signalizace Wnt (tzv. signalizace Wnt/ β -katenin). V nestimulovaných buňkách je koncentrace β -kateninu udržována na velmi nízké úrovni neustálou degradací za pomoci multiproteinového komplexu a transkripce cílových genů proto neprobíhá. Naopak, po vazbě ligandu Wnt na receptorový komplex je degradační komplex inaktivován a hladina β -kateninu stoupá. β -katenin následně vstupuje do jádra, kde vytváří komplexy s transkripčními faktory rodiny TCF/LEF, pro tuto dráhu specifickými, a spouští tak expresi cílových genů^{16, 17}. Signální dráha Wnt je na všech svých úrovních regulována celkově až stovkou různých faktorů.

Podkladem pro předkládanou disertační práci jsou čtyři odborné články a dosud nepublikovaná data, jež mají za cíl lépe porozumět regulaci signální dráhy Wnt. První publikace se zaměřuje na pořadí posttranslačních úprav ligandů Wnt. Druhý článek pojednává o pozitivním vlivu jaderné bílkoviny Dazap2 na hladinu signalizace Wnt/ β -katenin. Třetí studie charakterizuje protein TROY jako nový inhibitor signální dráhy Wnt v kmenových buňkách střevního epitelu exprimujících LGR5. Poslední publikace popisuje proces vytvoření dvou myších kmenů s cílenou změnou v genu Hic1. Tyto myši umožňují studovat roli genu *Hic1* *in vivo*. Závěrečná kapitola obsahuje nepublikované údaje o dynamice jaderných tělisek HIC1, o interakci polypeptidu HIC1 se členy signální dráhy Wnt, o nových cílových genech transkripčního represoru HIC1 a v neposlední řadě o důsledku podmíněné ztráty genu Hic1 ve střevním epitelu, což má za následek nesprávnou diferenciaci sekrečních buněk a následně zvýšenou citlivost k rakovinnému bujení.

Věřím, že naše výsledky přispely k objasnění regulace této základní signální dráhy řídící vývoj živočichů.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Signální dráhy jsou molekulární nástroje, které hrají různé, na kontextu závislé, regulační role v nesmírně složitém procesu vývoje obratlovců. U dospělých jedinců stejně evolučně „konzervované“ cesty řídí každodenní obnovu tkání a regeneraci orgánů po zranění.

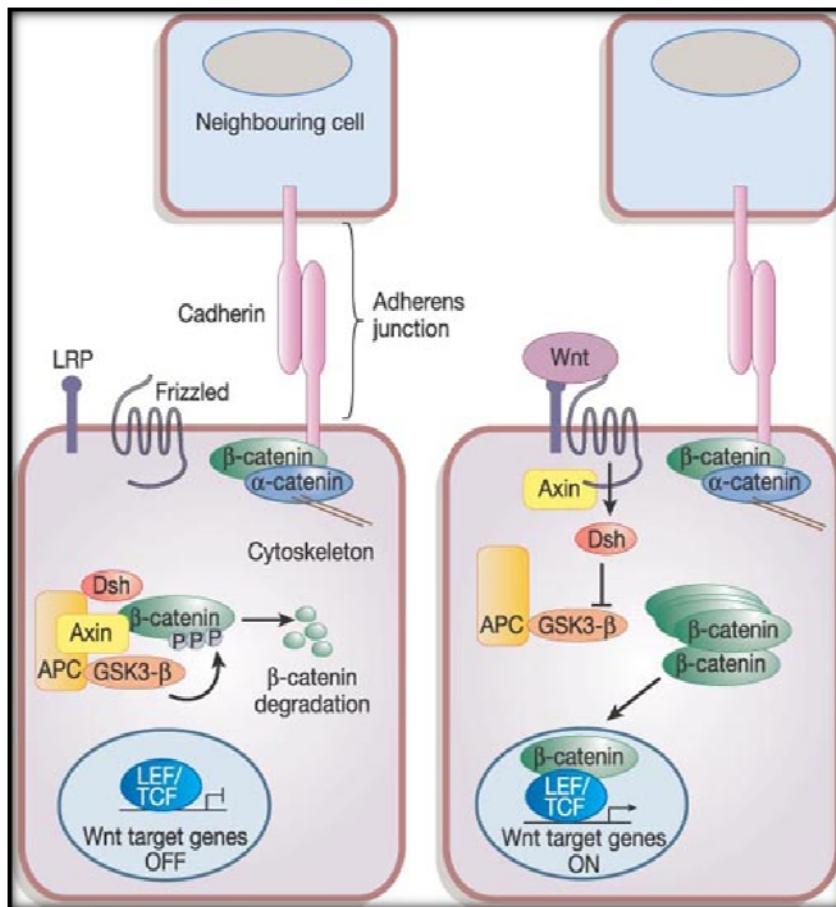
3.1. Signální dráha Wnt

Signální dráha Wnt je jednou z nejdůležitějších drah řídících buněčnou proliferaci a diferenciaci během embryonálního vývoje živočichů¹⁵ a její role je nezastupitelná i v dospělosti, např. pro obnovu somatických kmenových buněk⁹. Její důležitost dokládá i vysoká evoluční „konzervovanost“. Anomálie v této klíčové signální dráze vedou k vážným vývojovým poruchám¹¹ a její abnormální aktivace výrazně přispívá ke vzniku mnoha typů nádorů² a neurodegenerativních onemocnění¹⁶.

Signalizace Wnt se dělí na kanonické a nekanonické cesty na základě toho, zda se v dané kaskádě stabilizuje β -katenin, ústřední molekula kanonické signální kaskády Wnt. Ve své disertační práci se zaměřuje pouze na kanonickou dráhu, tzv. signalizaci Wnt/ β -katenin.

Ve své nejjednodušší formě je možné kanonickou signální dráhu Wnt popsat následovně: v buňkách, které nejsou vystaveny působení proteinů rodiny Wnt, je β -katenin neustále degradován v proteazomu prostřednictvím multiproteinového komplexu a transkripce cílových genů proto neprobíhá. Naopak, po vazbě ligandu Wnt na komplex receptorů Frizzled/LRP na povrchu buňky je degradační komplex složený ze dvou kináz (CKI a GSK3) a dvou adaptorových proteinů (Axin a APC) inaktivován a hladina β -kateninu stoupá. Stabilní β -katenin následně vstupuje do jádra, kde vytváří komplexy s transkripčními faktory rodiny TCF/LEF, jež jsou pro tuto dráhu specifické, a spouští tak expresi cílových genů jako je *c-myc* a *Cyklin D1 (CCND1)*² [Obr. 1]. Obecně je signální dráha Wnt přísně regulována na všech svých úrovních. První úrovní regulace je sama syntéza a zpracování ligandů Wnt. Aktivita glykoproteinů Wnt je v mezibuněčném prostoru podpořena nebo naopak oslabena různorodou skupinou antagonistů, pomocných faktorů a receptorů. V cytoplazmě je β -katenin nepřetržitě destabilizován velkým komplexem bílkovin. V jádře je transkripční stimulace cílových genů důsledkem souhry mezi rozličnými aktivátory, represory a jinými pomocnými faktory. Všechny podrobnosti o této signální dráze, včetně

historie klíčových objevů jsou k dispozici v aktuálních přehledných článcích^{2, 15, 16}, stejně tak na domovské stránce Wnt <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). Z četných modulátorů signální kaskády Wnt se dále zabývám proteiny Dazap2, Troy a Hic1.



Obr. 1. Signální dráha Wnt/β-katenin Je-li signální dráha Wnt neaktivní, β-katenin je fosforylován a označen k rozštěpení v proteazomu pomocí degradačního komplexu. Tento komplex obsahuje proteiny APC (Adenomatous polyposis coli), GSK3-β (Glycogen synthase kinase 3β), CKI (Casein kinase I) a Axin2. Přepis cílových genů v jádře buňky za tohoto stavu neprobíhá. K aktivaci dráhy dochází navázáním rozpustného ligantu z rodiny proteinů Wnt na transmembránový receptor buňky tvořený proteiny Frizzled a LRP, což aktivuje cytoplasmatický protein Dsh (Dishevelled). Dsh blokuje funkci degradačního komplexu a to má za následek stabilizaci molekul β-kateninu v cytoplasmě. Následně je β-katenin přesunut do jádra, kde tvoří komplexy s transkripčními faktory rodiny Tcf/Lef a společně aktivují cílové geny

3.2. Úloha signální dráhy Wnt ve střevě a při vzniku kolorektálního karcinomu

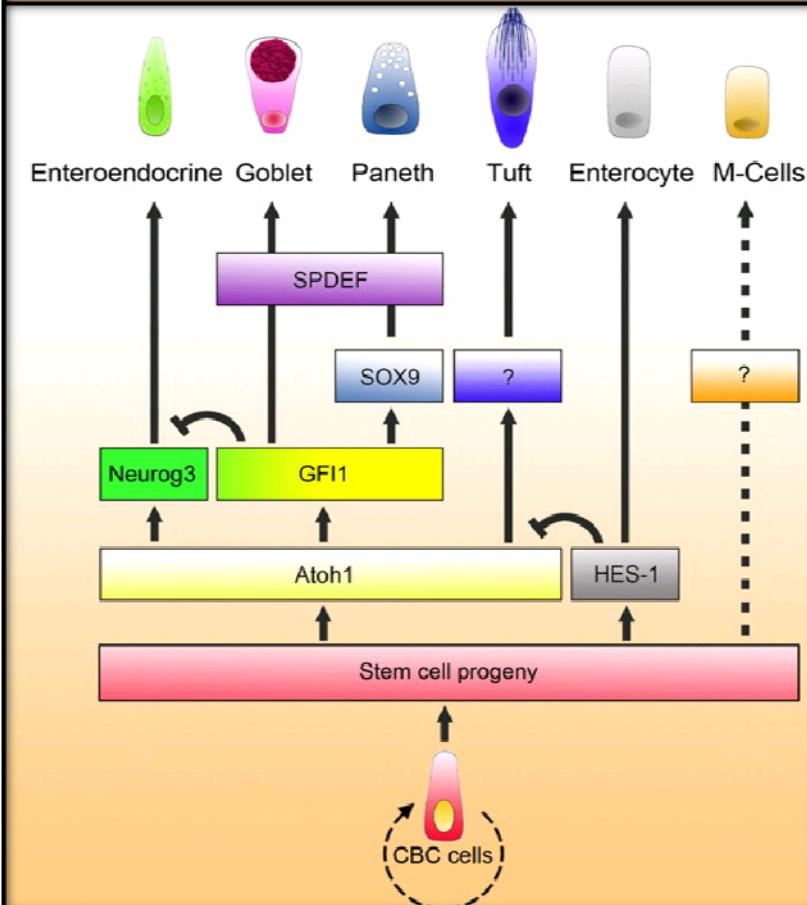
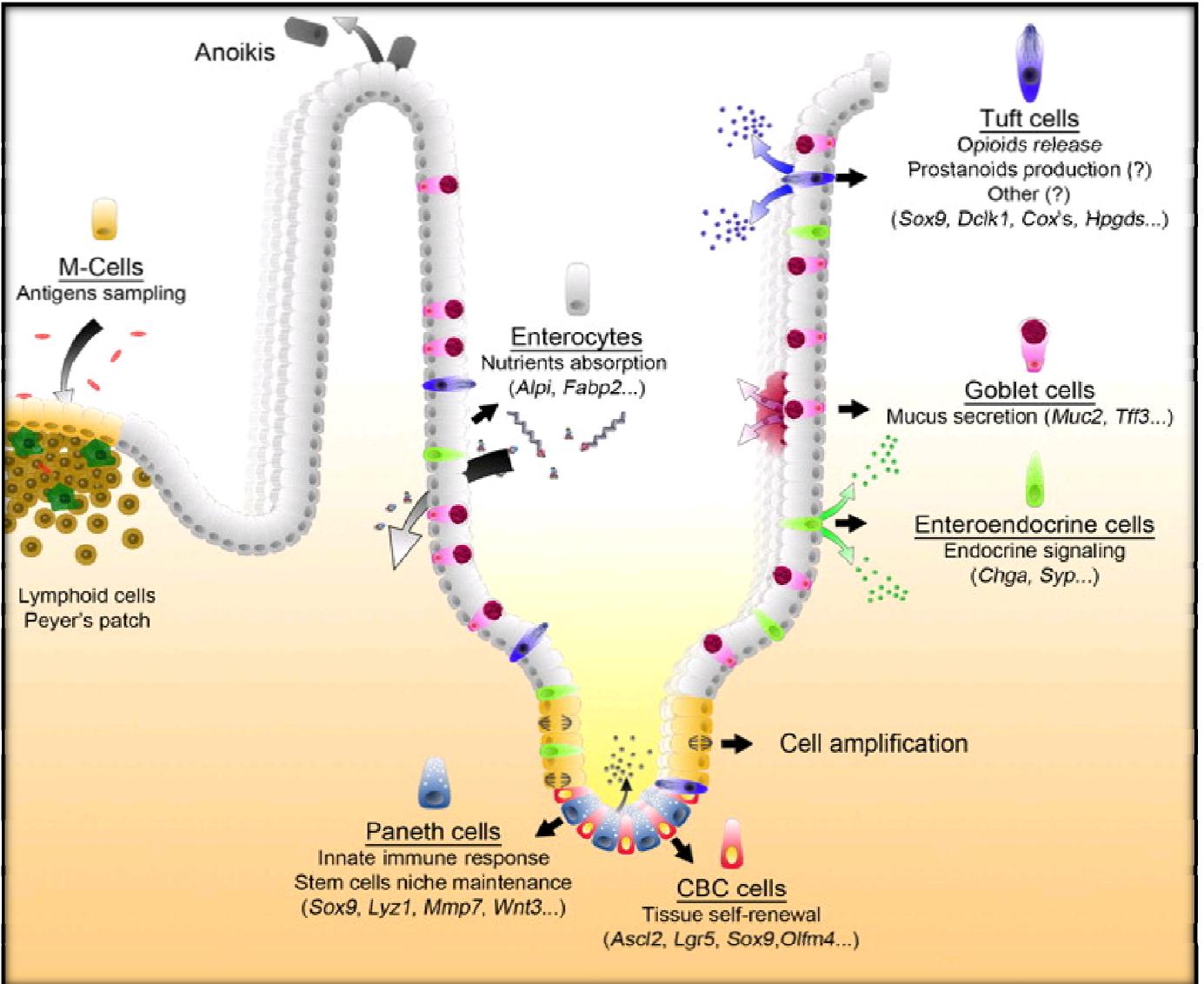
Střevní epitel je jedna z mnoha tkání, ve kterých se velice silně uplatňuje signální dráha spouštěná ligandy z rodiny Wnt. Výstelka střeva je tvořena jednovrstevným epitolem, pod ním se nachází mezenchymální vrstva a dohromady tvoří tzv. mukózu. Mukóza střeva je hlavním místem absorpce živin a hraje také podstatnou roli v imunitním systému. U savců je plocha výstelky tenkého střeva mnohonásobně zvětšena vytvořením výčnělků do lumen (vnitřního dutého prostoru) střeva, zvaných klky (latinsky villi, sg. villus), a vchlípenin, Lieberkühnových krypt (dále jen krypt). Situace v tlustém střevě je obdobná, ale povrch je plochý, bez villů.

Epitel střeva je jedna z nejrychleji se obnovujících tkání v savčím organismu. Jednotlivé buňky epitelu jsou vystaveny náročným podmínkám a prostředí uvnitř střeva a proto musí být neustále obnovovány. To se děje za pomoci kmenových buněk, které se nacházejí na dně krypt. Tyto kmenové buňky se neustále dělí a dávají vznik pásmu rychle se

dělících tzv. progenitorových buněk (transit amplifying cells), které se posouvají kryptou směrem vzhůru a v místě, kde přechází krypta ve villus, diferencují, tj. rozrůzňují se v samostatné buněčné typy. Většina diferencovaných buněk cestuje dále směrem k vrcholu villu, kde buňky odumírají a jsou vyloučeny do lumen střeva. Celý cyklus obnovy střevního epitelu trvá zhruba 3-5 dní. Progenitorové buňky ve střevním epitelu postupným procesem rozlišování vytváří absorpční a sekreční buňky. Absorpční buňky, enterocyty, jsou nejčastějším buněčným typem střevního epitelu a jejich funkcí je vstřebávání živin z potravy usnadněná vylučováním hydrolytických enzymů do lumen střeva. Sekreční buňky střevního epitelu se dělí do čtyř typů: (1) enteroendokrinní buňky produkující hormony, (2) pohárkové buňky produkující mucin, který usnadňuje posun natravené potravy střevem a chrání epitel před poškozením, (3) tzv. kartáčkové buňky (brush/tuft cells), které jsou charakteristické mikrovilly na svém povrchu, produkující do lumen střeva opioidy a vytvářející enzymy cyklooxygenázové rodiny a (4) Panethovy buňky¹⁸ [Obr. 2].

Panethovy buňky jako jediné po své diferenciaci cestují směrem ke spodu krypt ke kmenovým buňkám, které jsou vmezěny mezi zralými Panethovými buňkami. Cyklus obnovy Panethových buněk je 3-6 týdnů a funkce těchto buněk je přinejmenším dvojí: (1) sekrece antimikrobiálních peptidů (např. lysozym, kryptidiny) v rámci vrozené imunity, čímž chrání kmenové buňky; dále (2) spoluvtváří niku pro kmenové buňky na bázi střevních krypt tím, že jsou zdrojem EGF, TGF- α , kanonických ligandů rodiny Wnt a Dll4 (ligand signalizace Notch), což jsou faktory nezbytné pro udržení tzv. kmenovosti buněk¹⁹. V tlustém střevě najdeme mezi kmenovými buňkami tzv. CD24⁺ Paneth-like buňky, ekvivalenty Panethových buněk v tenkém střevě.

Většina cílových genů signalizace Wnt je exprimována v celých kryptách, což odráží vliv této signalizace na proliferaci progenitorových buněk a na diferenciaci Panethových buněk. Bylo však identifikováno několik genů specifických pro střevní kmenové buňky. Jedním z nich je i tzv. marker těchto buněk Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)³². Zdá se, že celkový počet kmenových buněk charakteristických přítomností molekuly Lgr5 na svém povrchu (dále jen Lgr5⁺) je určen počtem Panethových buněk, o jejichž dostupný povrch mezi sebou Lgr5⁺ kmenové buňky soutěží¹⁹. Počet Panethových buněk je tudíž přísně omezen, neboť při jejich zvýšeném jejich počtu může docházet ke zvětšení niky a tím i počtu kmenových buněk, což může mít pro organismus



Obr. 2. Model diferenciace epiteliaálních buněk tenkého střeva.

Horní panel představuje schéma základní jednotky epitelu střeva. CBC buňky (Crypt based columnar cells) představují epiteliální kmenové buňky, které dají vzniknout diferencovaným buňkám. U každého typu buněk jsou uvedeny jeho hlavní funkce a charakteristické genové produkty, tzv. markery. Spodní panel, Diagram genetické hierarchie uvnitř střevního epitelu. Znázorněny jsou jednotlivé transkripční faktory zodpovědné za vznik daného buněčného typu. Volba mezi absorpční nebo sekreční specializací je pod kontrolou genů *Hes1* a *Atoh1*. Gen *Neurog3* je nezbytný pro diferenciaci enteroendokrinních buněk. *Gfi1* předurčuje Panethovy a pohárkové buňky. Faktory *Sox9* a *Spdef* jsou nutné pro diferenciaci Panethových buněk, *Spdef* navíc i pro konečné vyzráni pohárkových buněk. Převzato z¹.

dalekosáhlé důsledky.

Jedním z takových důsledků je např. rakovinné bujení. Na rakovinu totiž může být nahlíženo, a v současné době tomu tak je u mnoha typů tzv. solidních nádorů i leukémií, jako na nemoc kmenových buněk. Podle teorie rakovinných kmenových buněk (cancer stem cells) je pouze malá část buněk nádoru schopna nádorové bujení nejen zahájit, ale i rozvinout a vytvořit obrovskou tzv. fenotypickou heterogenitu buněčných typů, kterou u nádorů pozorujeme²².

Proto jistě není překvapením, že signální dráha Wnt, která řídí fyziologickou obnovu střeva z kmenových buněk, je nejčastější a nejdříve mutovanou dráhou při vzniku kolorektálního karcinomu. Vůbec nejčastějším mutovaným genem je APC (Adenomatous Polyposis Coli), jehož mutace stojí za většinou dědičných i tzv. sporadických nádorů střeva^{23, 24}. Zcela zásadním faktem je, že mutace v APC se musí uskutečnit v kmenové buňce, aby dala za vznik malignímu onemocnění²⁵. Pokud totiž mutace zasáhne buňku progenitorovou nebo již plně diferencovanou, nebude dostatek času pro vytvoření dalších mutací, které jsou nutné pro vznik „úspěšné rakovinné buňky“, protože tyto buňka bude z těla vyloučena během několika dní v rámci obnovy střevního epitelu. Nárůstem počtu kmenových buněk se tudíž zvyšuje šance, že veskrze náhodné mutace zasáhnou právě tyto buňky a povedou ke vzniku maligního nádoru. V souladu s touto hypotézou jsou v myších i lidských nádorech střeva nalezeny zvýšené počty jak Panethových, tak Lgr5⁺ kmenových buněk.

3.3. Nádorový supresor HIC1

Gen *Hypermethylated In Cancer 1 (HIC1)* byl objeven v devadesátých letech jako potenciální nádorový supresor a získal své jméno podle toho, že lokus, ve kterém se nachází (17p13.3), je hypermetylován v mnoha typech nádorů, což vede k potlačení jeho exprese²⁶. Gen *HIC1* je v relativně nízké míře přepisován pravděpodobně ve všech zdravých tkáních dospělého organismu a kóduje jaderný protein o velikosti 85 kDa. Tento protein funguje jako transkripční represor a pokud jej experimentálně dodáme do nádorových linií, které ztratily jeho expresi, je výsledkem snížení klonálního charakteru růstu kultury a apoptóza²⁶.

Role HIC1 v potlačování vzniku nádorů byla potvrzena u myší zbavených tohoto genu (*Hic1* knock-out), kdy ztráta jedné alely v zárodečné linii (*Hic1*^{+/−}) vede ke zvýšenému výskytu maligních nádorů. Zajímavé je, že typy nádorů se liší podle pohlaví zvířete, u samců

převažují karcinomy, u samic sarkomy a lymfomy²⁸. Myši, kterým tento gen úplně chybí, (*Hic1*^{-/-}) se rodí mrtvé a vykazují mnoho vývojových vad²⁹.

Doposud bylo identifikováno pouze několik cílových genů HIC1, přičemž všechny jsou jeho působením reprimovány. Patří mezi ně geny podílející se na proliferaci, angiogenezi, odpovědi na poškození DNA, metastatické invazi a diferenciaci, což jsou všechno klíčové procesy při vzniku neoplázii²⁷.

Protein HIC1 se skládá ze tří hlavních domén: (1) N-koncové domény BTB/POZ (Broad complex, Tramtrack and Bric a brac/POx viruses and Zinc finger) zprostředkovávající interakce mezi proteiny, především oligomerizaci HIC1, (2) centrální domény, která je málo evolučně konzervovaná a (3) C-terminální domény, která obsahuje pět tzv. zinkových prstů pro specifickou vazbu na DNA v místech s HiRE (HIC1 Responsive Elements) typickou sekvencí nukleotidů v regulačních oblastech cílových genů. HIC1 je schopen blokovat transkripci svých cílových genů mechanismy nezávislými na deacetylázách histonů první a druhé třídy (HDAC I a II) pomocí autonomní domény BTB/POZ, zatímco represe zprostředkovaná centrální doménou je závislá na HDAC I a II²⁷.

V naší laboratoři bylo objeveno, že HIC1 se chová jako negativní regulátor signální dráhy Wnt a to tak, že shlukuje komplexy β-kateninu a faktorů TCF4 do HIC1 tělísek, čímž brání přepisu cílových genů, které jsou pod kontrolou těchto faktorů³⁰. Potlačení aktivace signální kaskády Wnt je tak dalším aspektem protinádorové funkce genu *HIC1*.

Přestože inaktivace HIC1 v nádorech je známa dlouho, ví se jen málo o jeho fyziologické roli, která se zdá být velice různorodá.

Několik poznatků nás přimělo rozšířit úspěšné *in vitro* studie funkce proteinu HIC1 do *in vivo* modelu. Zaprvé, unikátní způsob sebeobnovy střevního epitelu z něj vytváří ideální cíl pro testování funkcí nádorových supresorů. Za druhé, rychlý obrat střevního epitelu je pod kontrolou signální dráhy Wnt. Dále, gen *Atoh1* je cílovým genem *Hic1* v nervovém systému, navíc *Atoh1* je nezbytný i pro diferenciaci střevních sekrečních buněk. Proto jsme se rozhodli za pomoci námi vytvořených *Hic1*^{fl/fl} myší a dobře zavedených metodik objasnit roli *Hic1* ve střevním epitelu a to, jak jeho inaktivace přispívá k nádorovému zvrhnutí buněk.

4. VÝSLEDKY

Čtyři publikace rozkrývají některé aspekty molekulárních mechanismů regulujících signání dráhu Wnt.

1. Posttranslační modifikace proteinů Wnt1 a Wnt3a zbytkem mastné kyseliny na serinu je nezbytná pro následné připojení zbytku mastné kyseliny na cystein a zároveň je klíčová pro spuštění signalizace Wnt.
2. Dazap2 moduluje transkripci kontrolovanou dráhou Wnt/β-katenin.
3. TROY, membránový protein z nadrodiny receptorů TNF, interaguje s markerem kmenových buněk střeva, Lgr5, a snižuje úroveň signalizace Wnt.
4. Byly vytvořeny dva nové kmeny myší s modifikovanou alelou genu Hic1.

S cílem přispět k poznání role genu HIC1 v buňce studujeme HIC1 diferenciálními přístupy za pomoci pestré palety metodik. Pátá část práce obsahuje nepublikované údaje o transkripčním faktoru HIC1 získané během mého doktorského studia, které lze shrnout takto:

1. Jaderná tělíska HIC1 jsou dynamické, buněčným cyklem regulované struktury, které nekolokalizují s markery známých jaderných tělísek či struktur.
2. HIC1 se váže s několika komponentami Wnt signální dráhy, a to APC, Dvl3 a pravděpodobně s kinázami CKI, CKII a GSK3.
 - Neporušená vazebná doména pro CtBP u bílkoviny HIC1 je, na rozdíl od též domény v APC, nezbytná pro interakci mezi HIC1, CtBP a APC.
3. TMCO1 je nový cílový gen negativně regulovaný faktorem HIC1 v buňkách WI38.
 - Exprese dvou set genů je výrazně navýšena po snížení hladiny HIC1 v lidských primárních buňkách,
 - gen TMCO1 je utlumen faktorem HIC1 v lidských primárních fibroblastech, v buněčných liniích odvozených od lidského kolorektálního karcinomu a v MEFs,
 - HIC1 spolupracuje s CTBP v negativním regulaci TMCO1.
4. Celogenomové vyhledávání nových cílových genů Hic1 v myši ukázalo, že pouze sedm genů mění významně hladinu svého přepisu v důsledku podmíněné delece genu Hic1 v MEFs.
 - Nejzajímavějším kandidátem, který musí být ještě řádně ověřen, je Toll-like receptor 2 (Tlr2).

5. Homozygotní inaktivace genu *Hic1* u *Hic1^{cit}* a *Hic1^{delEx2}* myší vyústuje v časnovou embryonální letalitu, což je v rozporu s dříve zveřejněnými údaji o perinatální letalitě *Hic1^{-/-}* myší.
6. *Hic1* udržuje homeostázu střevního epitelu a podílí se na ustanovení sekrečních typů buněk.
 - hladina proteinu *Hic1* je efektivně snížena ve střevním epitelu myší kmenů *Hic1^{fl/fl}Villin1-CreER^{T2}* a *Hic1^{fl/fl}Lgr5-CreER^{T2}* po podání tamoxifenu,
 - snížení úrovně přepisu *Hic1* je provázeno zvýšeným vyjádřením jeho cílových genů *Atoh1*, *Sirt1* a *Sox9*, o kterých předpokládáme, že jsou zodpovědné za změny v diferenciaci sekrečních buněk,
 - krátkodobá absence *Hic1* ve střevním epitelu vede k chybné lokalizaci a zvýšenému množství Panethových buněk a ke zmnožení pohárkových buněk na úkor enteroendokrinních buněk,
 - dlouhodobé vyčerpání *Hic1* ve střevním epitelu vede k tvorbě abnormalních villů a dysplastických lézí, které jsou infiltrovány zánětlivými buňkami, jež zřejmě udržují chronický zánětlivý stav, který jednoznačně usnadňuje průběh kancerogenního procesu.
 - Hyperplastické léze jsou potenciálními místy dalších mutací a akumulací chyb a mohou být považovány za tzv. „mukózu v ohrožení“.
7. *Hic1* spolupracuje s tumorsupresorovým genem *Apc* v prevenci vzniku nádorů střeva.
 - Ztráta genu *Hic1* není sama o sobě dostatečná k navození vzniku nádorů,
 - delece genu *Hic1* podporuje kancerogenezi v zavedeném modelu střevních neoplázií.
 - Inaktivace genu *Hic1* v zárodečné linii vede k vážnějšímu nádorovému fenotypu než podmíněná inaktivace alely *Hic1* v dospělosti.

5. ZÁVĚR A DISKUZE

Tato disertační práce je založena na čtyřech odborných článcích a dosud nepublikovaných datech, které mají za cíl rozšířit naše znalosti o regulaci signální dráhy Wnt. Výsledky jsou shrnuty níže:

1. Ligandy Wnt, které spouštějí signální kaskádu, obsahují několik posttraslačních modifikací. V naší studii jsme se zaměřili na pořadí, ve kterém jsou tyto posttranslační modifikace uskutečňovány. Zjistili jsme, že nejdříve je protein Wnt glykosylován, následuje připojení palmitoolejové kyseliny na aminokyselinu serin, což je nutný krok pro připojení zbytku kyseliny palmitové na aminokyselinu cystein. Tyto lipidické adukty jsou nezbytné pro interakci proteinů Wnt s extracelulární matrix a k úspěšnému spuštění signalizace Wnt.
2. Dále jsme zkoumali signální dráhu Wnt na úrovni jádra buňky. Popsali jsme malou a evolučně velice silně konzervovanou bílkovinu Dazap2 jako nového vazebného partnera proteinu TCF4. Dazap2 stimuluje vazbu transkripčního faktoru TCF4 na jeho specifické cílové sekvence DNA a tudíž má snížení hladiny proteinu Dazap 2 negativní dopad na přepis genů, které jsou pod kontrolou dráhy Wnt/β-katenin.
3. Třetí článek se věnuje identifikaci a charakterizaci cílového genu dráhy Wnt/β-katenin kódujícího membránový protein z nadrodiny receptorů TNF s názvem TROY. Pomocí experimentů studujících diferenciaci buněk jsme prokázali, že TROY představuje - vedle LGR5 - další specifický marker rychle se dělících kmenových buněk střevního epitelu. Navíc jsme dokázali, že TROY spolupracuje s LGR5 a snižuje v těchto buňkách úroveň kanonické signalizace Wnt.
4. Poslední publikace dokumentuje vytvoření dvou modifikovaných alel genu *Hic1*. V prvním případě jsme vytvořili podmíněnou nulovou alelu genu *Hic1* pomocí *Cre/loxP* systému. Tento kmen *Hic1^{fl/fl}* řeší problém embryonální letality *Hic1^{-/-}* myší a umožňuje studovat funkci genu *Hic1* ve všech jednotlivých tkáních dospělého organismu, pro které je dostupný myší kmen exprimující Cre rekombinázu. V druhém případě jsme použili

přístup tzv. gene-targeting k nahrazení převážné části kódující sekvence genu *Hic1* sekvencí pro fluorescenční protein citrín. Výsledné *Hic1-citrín* reportérové myši umožňují jednoduché sledování aktivity genového lokusu *Hic1* pomocí fluorescence.

5. Za účelem studia funkce *Hic1* ve střevě byly *Hic1^{fl/fl}* myši zkříženy s jedinci exprimujícími Cre rekombinázu ve střevním epitelu (*Villin1-CreER^{T2}* a *Lgr5-CreER^{T2}*). Výsledky ukazují na důležitou roli *Hic1* pro udržení homeostáze epitelu střeva především tím, že řídí diferenciaci sekrečních buněk. Po inaktivaci genu *Hic1* dochází ke zvýšení počtu pohárkových buněk na úkor enteroendokrinních buněk. Dále jsme pozorovali zmnožení počtu a změnu lokalizace buněk s charakteristickými znaky Panethových buněk, jež vytváří a chrání niku epiteliálních kmenových buněk. V dlouhodobém hledisku se tato deregulace zřejmě podílí na zvětšení niky a počtu kmenových buněk, což vede k četnější kancerogenezi. Delece *Hic1* podporuje vznik dysplastických a morfologicky pozměněných villů a také vznik zánětlivých lézí ve střevním epitelu. Tyto léze je možno považovat za tzv. „mukózu v ohrožení“, což jsou místa s velkou pravděpodobností další progrese směrem k malignitě. *Hic1* navíc také spolupracuje s *Apc* v prevenci nádorového onemocnění střeva.

Dále náš tým zjistil, že jaderná tělíska HIC1 jsou dynamicky se měnící struktury v rámci buněčného cyklu a že HIC1 fyzicky interaguje s několika členy signální kaskády Wnt, zejména s APC a Dvl3. V neposlední řadě jsme popsali nový cílový gen HIC1 s názvem TMCO1a hledání dalších cílových genů nadále probíhá. Jejich identifikace je nezbytná pro vyřešení otázky biologické role nádorového supresoru HIC1.

6. LITERATURA

1. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* 2011;192:767-80.
2. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843-50.
3. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-305.
4. Cadigan KM, Peifer M. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002881.
5. Guder C, Philipp I, Lengfeld T, et al. The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 2006;25:7450-60.
6. Stoick-Cooper CL, Moon RT, Weidinger G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev* 2007;21:1292-315.
7. Ito M, Yang Z, Andl T, et al. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 2007;447:316-20.
8. Chen Y, Alman BA. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J Cell Biochem* 2009;106:353-62.
9. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:409-14.
10. Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 1999;22:361-5.
11. Niemann S, Zhao C, Pascu F, et al. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 2004;74:558-63.
12. Cotter D, Kerwin R, al-Sarraj S, et al. Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia--evidence for neurodevelopmental abnormality. *Neuroreport* 1998;9:1379-83.
13. Nygren MK, Dosen G, Hystad ME, et al. Wnt3A activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines. *Br J Haematol* 2007;136:400-13.
14. Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 2005;205:130-44.
15. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
16. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17:9-26.
17. Moon RT. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* 2005;2005:cm1.
18. Ahuja V, Dieckgraefe BK, Anant S. Molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:90-4.
19. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011;469:415-8.
20. Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes & development* 2008;22:1856-64.
21. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2010;469:415-8.
22. Eaves CJ. Cancer stem cells: Here, there, everywhere? *Nature* 2008;456:581-2.
23. de Sousa EM, Vermeulen L, Richel D, et al. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2011;17:647-53.
24. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001;10:721-33.
25. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009;457:608-11.
26. Wales MM, Biel MA, el Deiry W, et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1995;1:570-7.
27. Fleurie C, Touka M, Boulay G, et al. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:26-33.
28. Chen WY, Zeng X, Carter MG, et al. Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 2003;33:197-202.
29. Carter MG, Johns MA, Zeng X, et al. Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene Hic1 exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;9:413-9.
30. Valenta T, Lukas J, Doubravská L, et al. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *Embo J* 2006;25:2326-37.
31. Briggs KJ, Corcoran-Schwartz IM, Zhang W, et al. Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev* 2008;22:770-85.
32. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007;449:1003-7.

ŽIVOTOPIS

Jméno, příjmení, titul	Mgr. Vendula Pospíchalová
Datum narození	6. července 1984
Státní příslušnost	Česká Republika
E-mail	pospich 

VZDĚLÁNÍ

- 2008 – 2012 **Doktorské studium** - Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy; obor Imunologie
Téma disertační práce: Biologická role nádorového supresoru HIC1, inhibitoru signální dráhy Wnt; Školitel: RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.
- 2006 - 2008 **Navazující magisterské studium** - Přírodovědecká fakulta UK; obor Imunologie
Téma diplomové práce: Nádorový supresor HIC1, nový inhibitor signální dráhy Wnt
Školitel: RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.; Oponent: RNDr. Dominik Filipp, CSc.
- 2007 **Erasmus** - University of Wales, Bangor, Velká Británie;
obor Biomedical science
- 2003 - 2006 **Bakalářské studium** - Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy;
obor Biologie
Téma bakalářské práce: Signální dráha Wnt v rakovinných a kmenových buňkách
Školitel: RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.; Oponent: Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.
- 1999 – 2003 **Středoškolské studium** - Gymnázium, Jana Masaryka 1, Jihlava
-

LABORATORNÍ PRAXE

- 2005 – 2012 **Laboratoř buněčné a vývojové biologie**
vedoucí RNDr. Vladimír Kořínek, CSc., Ústav molekulární genetiky AVČR, v.v.i.
-

PUBLIKACE

Fafílek B, Krausová M, Vojtěchová M, Tůmová L, Pospíchalová V, Šloncová E, Huranová M, Chmelíková J, Sedláček R, Lukšan O, Oliverius M, Voska L, Jirsa M, Pačes J, Kolář M, Krivjanská M, Klimešová K, Tlaskalová-Hogenová H, Kořínek V. **TROY, the tumour necrosis receptor family member 19, interacts with stem cell marker Lgr5 and inhibits Wnt signalling.** *Gastroenterology*. Under revision.

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

Doubravská L, Krausová M, Grndl D, Vojtěchová M, Tůmová L, Lukáš J, Valenta T, Pospíchalová V, Fafílek B, Plachý J, Šebesta O, Kořínek V. **Fatty acid modification of**

Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. Cell Signal. 2011 May;23(5):837-48.

Pospíchalová V. Tumour suppressor HIC1 – novel inhibitor of Wnt signalling; On generating gene targeted (Hic1 conditional knock-out and Hic1-reporter) mouse strains. LAP Lambert Academic Publishing. 2010

ISBN 978-3-8383-6123-9, paperback, 112 stran.

Lukáš J, Mazna P, Valenta T, Doubravská L, Pospíchalová V, Vojtěchová M, Fafilek B, Ivánek R, Plachý J, Novák J, Kořínek V. **Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF-4.** Nucleic Acids Res. 2009 May;37(9):3007-20.

PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH

- 2011 **Conditional mutagenesis in the mouse intestine – a tool to study the role of Hic1 tumor suppressor gene in colorectal cancer** – plakátové sdělení
 The EMBO Meeting 2011, Vídeň, Rakousko
- Hic1 tumor suppressor gene and colorectal cancer** – přednáška
 Czech Wnt Network Workshop, Ondříkovice, Česká republika
- HIC1 – an ugly duckling among tumor suppressors** – přednáška oceněna jako nejlepší prezentace v sekci Molecular Biology of Cancer
 The Student Scientific Conference on Cancer Research, Brno, Česká republika
- 2010 **TMCO1: a novel target gene negatively regulated by tumor suppressor HIC1** – plakátové sdělení
 The EMBO Meeting 2010, Barcelona, Španělsko
- 2009 **Generating conditional knock-out mouse step by step** – přednáška
 PhD konference ÚMG AVČR, v.v.i., Praha, Česká republika
- Tumor suppressor HIC1 – a novel inhibitor of Wnt signaling** – přednáška
 Czech Wnt Network Workshop, Lednice, Česká republika

ZÁJMY

Sport především basketbal a kuželky, dále cyklistika, lyžování, in-line bruslení, fitness, tenis

Cestování poznávání krás a kultur v tuzemsku i zahraničí
