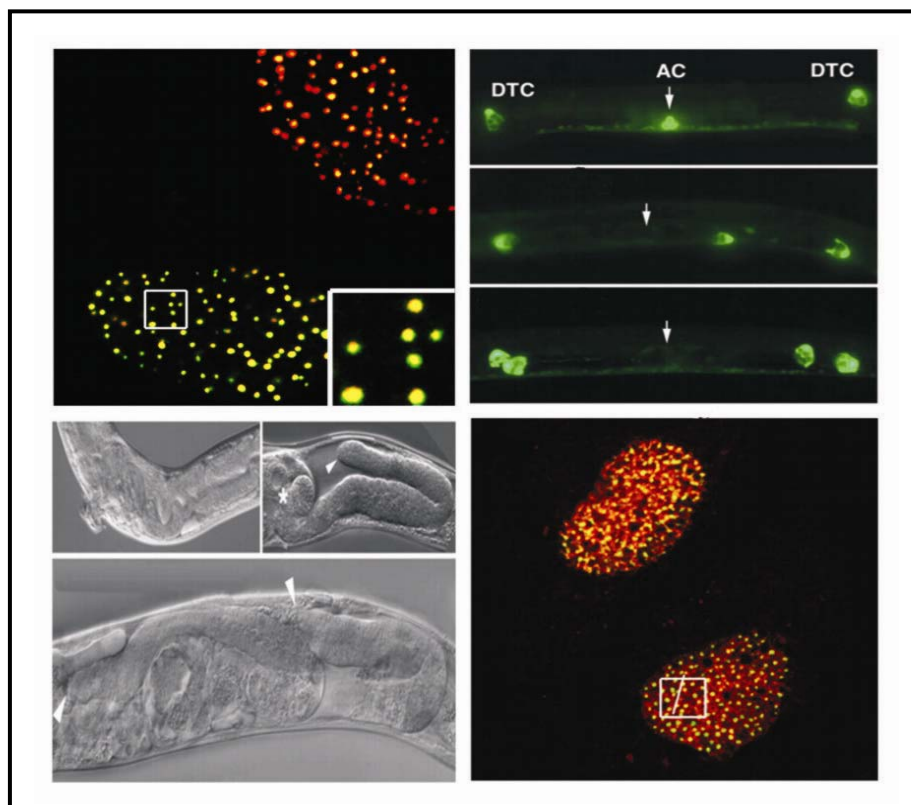


PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY

DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE

NOVÉ KOMPONENTY SIGNÁLNÍ DRÁHY WNT

Tomáš Valenta



ŠKOLITEL: RNDr. Vladimír Kořínek CSc.

Laboratoř buněčné a vývojové biologie
ÚMG AV ČR

Praha, 2007

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	3
1 ÚVOD	5
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1 Mechanismy kanonické signalizace Wnt (Wnt/ β -katenin)	8
2.1.1 Extracelulární a membránové komponenty kanonické signalizace Wnt.....	10
2.1.1.1 Ligandy Wnt.....	10
2.1.1.2 Biogeneze ligandů Wnt	11
2.1.1.3 Receptorový komplex.....	13
2.1.1.4 Extracelulární inhibitory a aktivátory signalizace Wnt	15
2.1.2 Cytoplazmatické komponenty kanonické Wnt-signalizace.....	16
2.1.2.1 β -katenin a jeho degradační komplex.....	16
2.1.2.2 Stabilizace β -kateninu jako rozhodující událost kanonické signalizace Wnt	19
2.1.3 Nukleární komponenty kanonické signalizace Wnt.....	21
2.1.3.1 Jaderný import β -kateninu.....	21
2.1.3.2 Transkripční faktory Lef/Tcf.....	21
2.1.3.3 Transkripce mediovaná β -kateninem a její modulace.....	22
2.1.3.4 Deaktivace transkripce mediované β -kateninem.....	25
2.1.3.5 Cílové geny kanonické signalizace Wnt.....	26
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	27
3.1 Interakce TCF-4, transkripčního faktoru obsahujícího HMG box, s korepresorem CtBP1 kontroluje expresi cílového genu signalizace Wnt Axin2/Konduktin v lidských embryonálních ledvinných buňkách	27
3.2 HIC1 snižuje aktivitu signalizace Wnt prostřednictvím strhávání TCF-4 a β -kateninu do jaderných tělísek	45
3.3 Interakce mezi nukleárním receptorem a β -kateninovou signalizací rozhoduje o osudu buněk v somatické gonádě <i>Caenorhabditis elegans</i>	66
3.4 Signalizace Wnt blokuje apoptózu indukovanou ligandem TRAIL v lidských maligních hematopoeitických buňkách	83
4 ZÁVĚR	122
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	123

SEZNAM ZKRATEK

AC	Anchor Cell
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AR	Androgen Receptor
Bcl-2, -9	B-cell lymphoma 2, -9
Brg-1	Brahma related gene 1
BTB/POZ	Broad-complex, Tramtrack, Bric à brac/Poxvirus, and Zinc finger
β -TrCP	β -Transducing repeat Containing Protein
CBP	CREB Binding Protein
Cdc 73	Cell division cycle 73
CK1 α , γ	Casein Kinase 1 α , γ
CK2	Casein Kinase 2
CRD	Cystein Rich Domain
CtBP	C-terminal Binding Protein
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DIX	Dishevelled-Axin
Dlp	Dally like protein
DR4, 5	Death Receptor 4, 5
Dsh	Dishevelled
DTC	Distal Tip Cell
Dvl	Dishevelled
ERK1	Extracellular signal Regulated Kinase
evi	evenness interrupted
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
Fz	Frizzled
GBP/Frat	GSK-Binding Protein/Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas
Grg	Groucho related gene
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HDAC	Histon Deacetylase
Hh	Hedgehog
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HMG	High Mobility Group
HMT	Histon Methyl Transferase
HSPG	Heparan Sulphate Proteoglycans
ICAT	Inhibitor of β -catenin and Tcf
int-1	integrated-1
LEF-1	Lymphoid Enhancer Factor 1
LRH-1	Liver Receptor Homolog 1
LRP	Low Density Lipoprotein Related Prorein
LSD1	Lysin Specific Demethylase 1
MEK1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MLL	Mixed Lineage Leukemia

MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
NAD	Nicotin Amide Dinucleotid
NHR-25	Nuclear Hormone Receptor 25
NLK	NEMO-Like Kinase
NLS	Nucler Localising Signal
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthetase
PAF-1	Polymerase Associated factor 1
PAK-1	p21 Activated Kinase 1
PIASz	Protein Inhibitor of Activated STAT y
PDZ	PDS-95, Dlg-A, ZO-1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
Ryk	Related to Y (tyrosin) kinase
SET	Su(var)3-9, Enhancer of zeste, Trithorax
SF-1	Steroidogenic Factor 1
sFRP	soluble Frizzled Related Protein
SGP	Somatic Gonad Precursor
SIRT1	Sirtuin 1
SUMO	Small Ubiquitin Modifier
SWI/SNF	Switch/Sucrose Non Fermenting
SYS	Symetrical Sisters
TBP	TATA-box Binding Protein
TCF-1, -3, -4	T-Cell Factor 1, -3, -4
TLE	Transducin-Like Enhancer
TRAIL	Tumor necrosis factor- Related Apoptosis-Inducing Ligand
TNF	Tumor Necrosis Factor
vps-35	vacuolar protein sorting 35
wg	wingless
WIF	Wnt Inhibitory Factor
wls	wntless

1 ÚVOD

Buněčné signalizační kaskády představují klíčový molekulární mechanismus, který koordinuje veškeré životní procesy v buňkách, a tím i v celém organismu. Aktivita signálních kaskád je nezbytná pro regulaci buněčného růstu, diferenciaci buněk či jejich řízené odumírání, a to jak v průběhu embryogeneze, tak v dospělém organismu. Signální dráhy zprostředkovávají odpověď buněk na okolní podněty, jsou nezbytné pro mezibuněčnou komunikaci a bez synchronizované aktivity složité signalizační mašinerie si nelze představit masivní buněčnou expanzi spojenou s tvorbou tkání během vývoje každého jedince. Jednou z těchto signalizačních kaskád je vysoce evolučně konzervovaná signalizační dráha Wnt. Předkládaná práce ve stručnosti uvádí do problematiky molekulárních mechanismů signalizace Wnt. Experimentální část byla zaměřena zejména na signalizaci Wnt v buněčném jádře a vztah mezi signalizací Wnt a jinými buněčnými regulačními drahami.

Základem této práce je soubor čtyř publikací, jejichž hlavním spojujícím motivem je studium komponent a mechanismů, které ovlivňují signalizaci Wnt.

1. **Valenta, T.**, Lukas, J. and Korinek, V. (2003) HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2369-2380.
2. **Valenta, T.**, Lukas, J., Doubravska, L., Fafílek, B. and Korinek, V. (2006) HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *Embo J*, **25**, 2326-2337.
3. Asahina, M., **Valenta, T.**, Silhankova, M., Korinek, V. and Jindra, M. (2006) Crosstalk between a nuclear receptor and beta-catenin signaling decides cell fates in the C. elegans somatic gonad. *Dev Cell*, **11**, 203-211.

4. Doubravska, L., Simova S., Cermak, L., **Valenta T.**, Korinek V., Andera L. (2006) Wnt signaling suppresses TRAIL-induced apoptosis of human pre-B cells (impact of beta catenin stabilization and MEK1/ERK activation). *Apoptosis*. submitted

Cílem uvedených prací bylo rozšíření našich poznatků o regulačních mechanismech signalizace Wnt, a to zejména na úrovni buněčného jádra. Hlavní důraz byl kladen na interakční partnery, kteří mají potenciál inhibovat signalizaci Wnt. Opomenuto nezůstalo ani studium vzájemné interference mezi signalizací Wnt a jinými signálními kaskádami.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Signální dráha iniciovaná sekretovanými ligandy Wnt patří mezi významné regulátory buněčné proliferace a diferenciace, a to jak v průběhu embryogeneze, tak v dospělém živočišném organizmu. Nepostradatelnost signalizace Wnt při regulaci buněčných procesů dokládá vysoká evoluční konzervovanost základních mechanismů této signalizace i jednotlivých proteinů, které se signalizace účastní [1, 2].

Příslušnost k rodině proteinů Wnt je určena spíše jejich strukturálními, než funkčními vlastnostmi. Není proto překvapivé, že zahájení signalizace vazbou ligandu Wnt na receptor (respektive receptorový komplex) může iniciovat několik, do jisté míry nezávislých procesů. Jedním z nich je signální dráha Wnt/ β -katenin, označovaná též jako kanonická signalizace Wnt. V případě kanonické signalizace dochází po interakci ligandu Wnt s receptorovým komplexem ke stabilizaci klíčového proteinu, β -kateninu, jeho kumulaci v cytoplazmě a následné translokaci do buněčného jádra. V jádře se β -katenin váže na transkripční faktory Lef/Tcf a zahajuje tak transkripci specifických genů [3].

Alternativu ke kanonické signalizaci Wnt představuje několik signálních drah, které jsou souhrnně známé jako nekanonická signalizace Wnt. Jedná se nejméně o tři rozdílné mechanismy, u kterých se na přenosu signálu významnou měrou podílejí proteiny známé z jiných signalizačních drah. Přestože se nekanonické signalizační dráhy významně účastní regulace řady vývojových procesů během embryogeneze (neurulace), nejsou zdaleka tak charakterizovány jako kanonická dráha [4, 5]. Protože další část předkládané práce je zaměřena především na studium procesů v rámci signalizace Wnt/ β -katenin, lze případné zájemce o detaily týkajících se ostatních typů signalizace Wnt odkázat na příslušnou literaturu [6, 7]. Průběžně aktualizované informace zaměřené na signalizaci Wnt lze rovněž nalézt na internetové stránce “The Wnt homepage“ (<http://www.stanford.edu/~rnutse/wntwindow.html>).

2.1 Mechanismy kanonické signalizace Wnt (Wnt/ β -katenin)

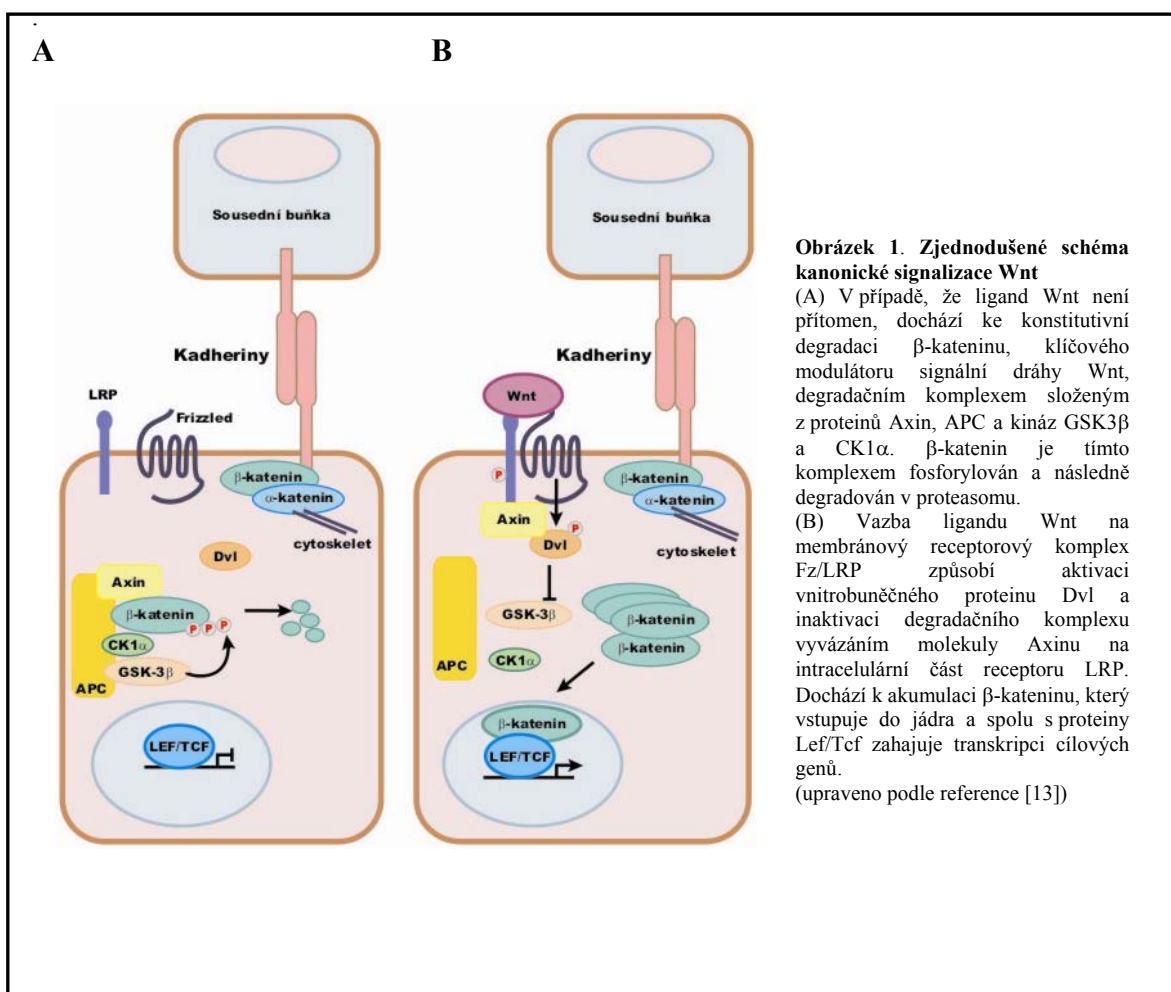
Kanonickou signalizaci Wnt (či jinak též signalizaci Wnt/ β -katenin) lze právem označit za jeden z rozhodujících signalizačních mechanismů ovlivňujících osud buňky (anglicky cell fate decision) u mnohobuněčných živočichů. Komponenty této signalizace se uplatňují při regulaci mnoha procesů u tak evolučně vzdálených organismů jako jsou žahavci (*Cnidaria*), hlístice *Caenorhabditis elegans*, octomilka (*Drosophila melanogaster*) a obratlovci včetně savců [8, 9]. Signalizace Wnt/ β -katenin hraje nezastupitelnou roli během řady dějů v průběhu embryonálního vývoje. U octomilky je kanonická signalizace nezbytná mimo jiné pro ustavení polaritý tělních segmentů nebo pro synaptogenezi během larválního vývoje [1, 10]. V případě obratlovců je zodpovědná například za určení tělní polaritý v průběhu gastrulace, či kontrolu tělní segmentace [11, 12]. V dospělém organismu je aktivita kanonické dráhy nezbytná pro udržení samoobnovujícího potenciálu kmenových buněk v řadě tkání [13-15]. Svou roli uplatňuje rovněž při některých regeneračních procesech. Nefyziologická aktivace signalizace Wnt je často spojena s nekontrolovaným růstem buněk, nádorovou transformací a vznikem nádorů [13, 14, 16, 17]

Jak již bylo výše zmíněno, klíčovou událostí v rámci přenosu signálu je v případě kanonické Wnt-signalizace stabilizace proteinu β -katenin v cytoplazmě cílové buňky. V situaci, kdy buňky nejsou stimulovány prostřednictvím ligandu Wnt, je většina β -kateninu lokalizována jako součást mezibuněčných spojů a β -katenin tak prakticky neuplatňuje svoji signalizační funkci, neboť hladina volného β -kateninu v cytoplazmě je posttranslačně udržována na nízké úrovni [18, 19]. Na udržení nízké hladiny cytoplazmatického β -kateninu se podílí multiproteinový degradační komplex, jehož součástí je strukturní protein Axin, nádorový supresor APC, proteinkinázy CK1 α , GSK3 β [20-24]. V nestimulovaných buňkách je β -katenin prostřednictvím těchto proteinkináz fosforylován. Fosforylovaný β -katenin je následně modifikován ubikvitinem, a poté degradován v proteazomu [25-27].

Vazba ligandu Wnt na receptorový komplex složený z receptoru Frizzled a koreceptoru LRP vede k interakci proteinu Dishevelled s intracelulární částí receptoru Frizzled [28-31]. Dishevelled se tímto krokem aktivuje a zahajuje dosud ne zcela přesně popsáný proces vedoucí zablokování aktivity degradačního komplexu. Výsledkem zmíněného procesu je pokles fosforylace β -kateninu a následné zastavení jeho degradace [32, 33]. Současně

dochází k vazbě Axinu na koreceptor LRP, což přispívá k rozpadu degradačního komplexu[34]. Výsledkem obou jmenovaných procesů je stabilizace cytoplazmatického β -kateninu, růst jeho koncentrace a jeho následná translokace do jádra. V buněčném jádře se β -katenin váže s transkripčními faktory z rodiny Lef/Tcf. Tyto transkripční faktory nemají samy o sobě schopnost zahájit transkripci a fungují tak jako transkripční represory. Avšak právě tvorba heterokomplexů s β -kateninem jim umožňuje iniciovat transkripci řady Wnt-specifických genů[35-37]. Mezi cílové geny signalizace Wnt patří mimo jiné geny pro významné regulační proteiny ovlivňující buněčný cyklus a buněčnou proliferaci [38-41].

Je ovšem potřeba zdůraznit, že kanonická signalizace Wnt je mnohem více komplexním procesem než představuje výše uvedené schéma základní kaskády dějů, ke kterým v buňce dochází po stimulaci ligandem Wnt. Ve skutečnosti je dráha Wnt také velmi regulovaným procesem, a to na všech úrovních – extracelulární, cytoplazmatické i jaderné. V rámci kanonické kaskády se významně uplatňuje řada proteinů, které tuto signalizaci usměrňují či přímo blokují.



2.1.1 Extracelulární a membránové komponenty kanonické signalizace Wnt

2.1.1.1 Ligandy Wnt

Název jak pro tyto proteiny, tak pro celou signální dráhu, v níž proteiny Wnt stojí na počátku jako ligandy zahajující signalizaci, vznikl již počátkem devadesátých let jako složenina z názvů pro dva původně nezávisle popsané geny, a to *wingless* a *int-1*. Gen *wingless* (*wg*) byl identifikován jako jeden z důležitých faktorů ovlivňujících polaritu tělních článků (segment polarity gene) u octomilky. Zatímco v případě normálních jedinců se u larvy octomilky střídají v epidermis ventrální kutikuly nahé a dentikulární segmenty, tak v případě mutantů *wingless* jsou všechny segmenty dentikulární. Některé z alelických forem tohoto genu se mohou projevit u mutantních jedinců bezkřídlým fenotypem [42, 43]. Druhý z genů byl popsán při studiu nádorů v epitelu mléčné žlázy u myši. V řadě těchto nádorů vyvolaných retrovirem MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) je často jako důsledek integrace proviru nefyziologicky aktivována transkripce přilehlého lokusu, který kóduje sekretovaný protein nazvaný Int-1 (název podle preferovaného místa integrace) [44-46]. Pozdější práce potvrdily homologii obou genů, čímž byl rovněž popsán první gen rodiny Wnt, a to v tomto případě gen *wnt1* [47].

V současné době je známo u obratlovců okolo dvaceti genů kódujících proteiny Wnt (člověk a myš jich mají 19, *Xenopus sp.* 16, *Gallus sp.* 11, *Danio sp.* 12), které můžeme rozdělit podle aminokyselinové sekvence do dvanácti nezávislých podskupin, z nichž má pouze šest své orthologní partnery u modelových bezobratlých (*Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*). Překvapivá je však skutečnost, že u primitivních mnohobuněčných živočichů můžeme nalézt spektrum genů *wnt* velmi podobné obratlovcům. Jako příklad lze uvést zástupce žahavců - mořskou sasanku rodu *Nematostella*, která ve svém genomu obsahuje dvanáct genů *wnt*, které nalézají své orthologní partnery u jedenácti z celkových dvanácti podskupin *wnt*-genů obratlovců. Recentní práce naznačují přítomnost genů *wnt* již v genomu živočišných hub (*Porifera*) [48]. Je tedy pravděpodobné, že relativně vysoká komplexita genů *wnt* je evolučně velmi stará. Zatímco u vývojové linie vedoucí k obratlovcům zůstala tato genetická komplexita zachována, v případě prvoústých živočichů došlo k její významné redukci. U rostlin a jednobuněčných organismů nebyla dosud exprese *wnt*-genů spolehlivě prokázána. Na základě fylogenetické analýzy můžeme tedy proteiny Wnt považovat za signální molekuly

specifické pro *Metazoa*, které se podílejí na kontrole organizace tělního plánu již více než 650 milionů let [8, 49, 50]

2.1.1.2 Biogeneze ligandů Wnt

Proteiny Wnt jsou hydrofobní, na cystein bohaté sekretované molekuly, které mohou působit na cílové buňky v blízkosti i ve větší vzdálenosti od místa sekrece (tzv. short-range nebo long-range signaling) [49, 51-53]. Přes svoji omezenou solubilitu působí podobně jako koncentrační morfogeny a významně tak ovlivňují vznikající tkáňovou polaritu v průběhu embryogeneze. Pro aktivitu ligandů Wnt je velmi důležitý způsob jejich biogeneze, v rámci níž hrají velkou roli proteinové modifikace. Proteiny Wnt jsou, tak jako ostatní sekretované molekuly, syntetizovány s N-koncovým signálním peptidem, který určuje lokalizaci nascentního Wnt-polypeptidu do endoplazmatického retikula, kde je poté signální peptid odštěpen působením peptidázy. V endoplazmatickém retikulu jsou proteiny Wnt modifikovány acylací. V tomto procesu hraje klíčovou roli protein porcupine. Porcupine je v membráně endoplazmatického retikula vázaná acyltransferáza, která je zodpovědná za kovalentní připojení palmitátu na konzervovaný cystein (případně více cysteinů) v N-koncové části Wnt-proteinu. Některé mutace v sekvenci proteinu porcupine způsobují poruchy v sekreci proteinů Wnt, což vede k jejich hromadění v cytoplazmě buněk. Modifikace palmitátem nejen zvyšuje hydrofobicitu proteinů Wnt, ale je rovněž nezbytná pro jejich další biogenezi, sekreci a správnou signalizační aktivitu. [54-56]. Další významnou modifikací proteinů Wnt, která následuje po acylaci, je N-glykosilace na asparaginech. Sekreční dráha Wnt-proteinů dále pokračuje v Golgiho komplexu, kde se uplatňuje role nedávno popsaného proteinu wntless (wls) nezávisle též popsaného jako Evi (Evenness interrupted). Wls/evi je membránový protein lokalizovaný do membrán Golgiho komplexu, který interaguje s proteiny Wnt. Je-li exprese Wls/evi experimentálně snížena prostřednictvím interferujících molekul RNA nebo pokud je jeho aktivita ovlivněna mutací, dochází k poruše v sekreci proteinů Wnt a k jejich akumulaci v buňkách, které tyto ligandy produkují. Ačkoliv přesná úloha proteinu wls/evi není dosud známá, je pravděpodobné, že tento protein specificky usměrňuje sekreci vznikajících ligandů. Wls/evi by rovněž mohl ovlivňovat tvorbu exportních váčků (exocytic vesicles), prostřednictvím kterých jsou proteiny Wnt transportovány ven z buňky [57, 58].

Pozoruhodná je skutečnost, že pravděpodobně již na úrovni těchto váček dochází k rozdělení proteinů Wnt na ty, které budou působit v blízkosti místa sekrece (short range signaling) a na ligandy, jejichž aktivita se uplatní ve větší vzdálenosti od místa sekrece (long range signaling). Pro morfogenní aktivitu na větší vzdálenosti je nezastupitelná role tzv. retromerového komplexu, což je konzervovaný multiproteinový komplex, který se uplatňuje při vnitrobuněčném proteinového transportu včetně transcytózy a transportu proteinů mezi endozómy a Golgiho komplexem. Mutace ovlivňující aktivitu retromerového komplexu, nebo nefyziologicky způsobená inaktivace komponent tohoto komplexu (například proteinu vps-35) ruší schopnost ligandů Wnt působit na větší vzdálenosti, a to jak v případě *C.elegans*, tak u obratlovců. Aktivita retromerového komplexu je nutná pouze u buněk produkujících ligandy Wnt, v nichž je retromerový komplex důležitý pro sekreci aktivních proteinů Wnt [59, 60].

Nedávno byl u octomilky popsán pod názvem Sprinter další transmembránový protein důležitý pro maturaci proteinů Wnt. Tento evolučně konzervovaný protein je lokalizován v plazmatické membráně, jeho inaktivace vede k zablokování sekrece ligandů Wg (ortholog Wnt1 u octomilky) a k hromadění Wg v produkujících buňkách. Tento fenotyp je tak velmi podobný situaci u Wls/evi [61].

Důsledkem proteinových modifikací v průběhu sekrece je skutečnost, že proteiny Wnt jsou sekretovány jako vysoce hydrofobní molekuly, což výrazně omezuje jejich solubilitu a schopnost volně difundovat k cílovým buňkám. Tyto proteiny se tak prakticky nevyskytují mimo buňku jako volné molekuly. Modifikace palmitátem navíc zvyšuje jejich schopnost vázat se do membránových struktur [56]. Jednou z membránových struktur důležitých pro transport ligandů Wnt mezi buňkami jsou lipoproteinové útvary označované jako argosomy. Původní představy, že argosomy jsou jakési exocytární váčky, které se tvoří z buněčné membrány v průběhu sekrece proteinů Wnt, byly recentně výrazně modifikovány. Argosomy (u octomilky známé též pod názvem lipoforiny) vznikají pravděpodobně až mimo buňku jako jednovrstevné fosfolipidové membránové váčky obsahující cholesterol a triglyceridy. Významnými komponenty argosómů jsou také apolipoproteiny, které zde fungují jako důležité strukturní proteiny. Ligandy Wnt jsou v argosomech lokalizovány právě prostřednictvím palmitátového zbytku. Nefyziologická inaktivace některých komponent argosómů silně omezuje transport ligandů Wnt k cílovým buňkám. Zablokování tvorby argosómů rovněž výrazně mění podobu gradientu proteinů Wnt (pravděpodobně nejen) u octomilky, čímž se rovněž mění charakter exprese (expression pattern) některých cílových genů [62-64].

Při transportu a tvorbě gradientu proteinů Wnt se také uplatňují některé složky extracelulární matrix. Heparan-sulfátové proteoglykany (HSPG) byly popsány jako jedna z komponent extracelulární matrix, která je schopna vázat proteiny Wnt. HSPG jsou rovněž schopny na sebe navázat lipoproteinové partikule, tedy pravděpodobně i argosómy. Dosud není přesně známo, zda jsou proteiny Wnt asociovány s HSPG přímo, či právě prostřednictvím argosómů. Genetické studie u octomilky prokázaly nezastupitelnost HSPG pro správnou tvorbu morfogenního gradientu proteinů Wnt. Absence proteoglykanů Dally nebo Dlp, či mutace v enzymech nezbytných pro biogenezi HSPG, vedou u octomilky k fenotypu, který připomíná mutanty octomilek bez funkčního proteinu Wg (ortholog lidského proteinu Wnt1). Recentní práce naznačují možnost, že se Dally a Dlp podílejí také na transportu ligandů Wnt. HSPG tedy mohou tvořit jakousi síť nutnou nejen pro distribuci proteinů Wnt, ale i pro formování jejich funkčního gradientu [65-68]. Aktivita proteoglykanů Dally a Dlp jako spolutvůrců gradientu Wnt může být dále modulována. Sekretovaný enzym Notum je schopen modifikovat podobu sacharidových řetězců u Dally a Dlp, čímž významně formuje charakter gradientu Wnt. Za normálních okolností koreluje u octomilky exprese *notum* s expresí *wnt*. Zvýšená hladina proteinu Notum vede k u octomilky k potlačení fyziologické aktivity proteinů Wnt, snížená exprese nebo některé mutace působí opačně [69, 70]. Přes menší množství dat lze konstatovat, že rovněž u obratlovců mohou HSPG výrazně modulovat signální dráhu Wnt [71-73].

Pozoruhodná je skutečnost, že se základní principy biogeneze, transportu a tvorby morfogenního gradientu proteinů Wnt uplatňují nejen v případě této signální dráhy. Sekreční mechanismus proteinů Wnt je velmi podobný biogenezi jiných významných signálních molekul – Hedgehog. Rovněž pro správnou funkci ligandů Hh je nutná modifikace palmitátem, při jejich transportu se uplatňují argosomy jejich gradient může být modifikován prostřednictvím HSPG. [63, 74, 75]

2.1.1.3 Receptorový komplex

Ligand Wnt se na cílových buňkách váže se specifickými receptory, respektive s receptorovým komplexem, a spouští tak samotnou signalizaci. Právě složení receptorového komplexu rozhoduje o tom, zda bude po vazbě ligandu zahájena kanonická

nebo nekanonická forma signalizace Wnt. Jeden typ ligandu Wnt může iniciovat jak signalizaci závislejší na β -kateninu, tak signalizaci na β -kateninu nezávislou, jak dokazují experimenty s využitím purifikovaného proteinu Wnt5a, který byl dříve považován za klasický případ iniciátora nekanonické signalizace [6, 76, 77]. Skutečnost, že v průběhu vývojových procesů stojí některé ligandy Wnt spíše na začátku kanonické, respektive nekanonické, signalizace bude tedy pravděpodobně určena rozdílným zastoupením komponent receptorových komplexů, či různou četností konkrétních forem těchto komplexů v cílových buňkách. Určitou roli může rovněž mít rozdílná afinita konkrétních typů ligandů Wnt ke konkrétním receptorům. Pro přesnější popis interakcí mezi ligandy Wnt a jejich receptory je potřeba získat více detailnějších experimentálních dat.

Genetická a biochemická data podporují hypotézu, že primárním receptorem pro ligandy Wnt je receptor Frizzled (Fz), přičemž se tento receptor uplatňuje v kanonické signalizaci Wnt i v jejích nekanonických formách. Receptory Frizzled patří do skupiny receptorů asociovaných s G-proteiny (G-Protein Coupled Receptors) a s ostatními zástupci tohoto typu receptorů sdílí několik charakteristických strukturních znaků. V případě receptorů Frizzled můžeme rozeznat tři základní strukturně-funkční oblasti. Glykosilovaná N-koncová část receptoru je extracelulární a obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci charakteristickou doménu bohatou na cystein (CRD). Ta je schopna s vysokou afinitou vázat ligandy Wnt. Střední část receptoru Frizzled obsahuje ve své proteinové sekvenci sedm hydrofobních α -helixů, které sedmkrát procházejí cytoplazmatickou membránou a jsou tak rozhodující pro membránovou lokalizaci receptoru. C-konec receptoru je orientován cytoplazmaticky, je mimo jiné asociován s heterotrimerními G-proteiny a zprostředkuje přenos signálu k dalším komponentám signalizace Wnt [28, 78, 79]. Genetická komplexita genů *wnt* má svůj protějšek v počtu genů pro receptory Frizzled. Savčí genom obsahuje přibližně deset genů *frizzled*, genom octomilky čtyři geny. Přestože postrádáme detailnější biochemická data, zdá se, že jednotlivé receptory Frizzled se chovají poněkud "promiskuitně", tedy že jeden konkrétní receptor Fz může vázat více různých typů ligandů Wnt a naopak. [28, 30, 79, 80]. Například u octomilky, kde je ovšem redundance jak v případě ligandů Wnt, tak receptorů Fz nižší, interagují s jedním typem ligandu Wnt (konkrétně s Wg) dva ze čtyř možných Fz receptorů (Fz1 a Fz2). Aby došlo k zablokování signalizace iniciované Wg musí být oba receptory mutovány nebo inaktivovány, přičemž výsledný fenotyp je totožný s fenotypem *wg* mutantů [80].

Receptor Frizzled ovšem není schopen aktivovat kanonickou signalizaci sám. Pro její zahájení je nutná kooperace s koreceptorem LRP (Low density lipoprotein Related Protein).

V případě obratlovců známe dva členy proteinů LRP, a to LRP5 a LRP6. U octomilky existuje jeden zástupce Arrow [81]. Koreceptory LRP jsou transmembránové proteiny s jednou transmembránovou doménou, jejich extracelulární část je poměrně velká a je schopna vázat ligandy Wnt, avšak s výrazně nižší afinitou než CRD doména receptorů Fz. Cytoplazmatická doména proteinů LRP je relativně krátká, má ale nezastupitelnou roli při procesech vedoucích ke stabilizaci β -kateninu, jak bude popsáno později. Nezbytnost této domény pro aktivaci signalizace dokládají experimenty založené na expresi mutantních forem LRP5 a LRP6 postrádajících intracelulární doménu. Tyto formy LRP se chovají jako tzv. dominantně negativní, to znamená, že zcela blokují kanonickou signalizaci [31, 81, 82].

2.1.1.4 Extracelulární inhibitory a aktivátory signalizace Wnt

Signální dráha Wnt může být inhibována již na extracelulární úrovni, a to nejen prostou regulací exprese receptorových proteinů Fz a LRP, ale také prostřednictvím specifických antagonistických molekul. Takovými molekulami jsou například solubilní proteiny sFRP (soluble Frizzled Related Proteins). Podobně jako receptory Frizzled obsahují proteiny sFRP ve své sekvenci doménu CRD. Prostřednictvím této domény sFRP váží ligandy Wnt a brání tak jejich asociaci s membránovými receptory Fz a LRP. Proteiny sFRP tedy působí jako inhibiční receptory. Proteiny sFRP jsou specifické pro obratlovce, kde mají důležitou roli při modulaci signalizace Wnt v průběhu embryogeneze [83, 84].

Jiným typem solubilních antagonistů jsou proteiny Dickkopf. Tyto molekuly jsou schopny se přímo vázat na receptory LRP. Proteiny Dickkopf rovněž interagují s jiným membránovým proteinem Kremen a ve spolupráci s ním iniciují internalizaci receptorů LRP, a tak výrazně limitují aktivitu signalizace Wnt. Zajímavé je, že proteiny Dickkopf se vyskytují pouze u obratlovců a primitivních bezobratlých (*Cnidaria*), u pokročilejších forem bezobratlých nebyly dosud nalezeny. [85, 86].

Svoji vazbou na receptor LRP blokuje signalizaci Wnt také sekretovaný protein Wise [87, 88].

Protein WIF (Wnt Inhibitory Factor) je solubilním antagonistou, který funguje podobně jako sFRP. WIF je schopen vázat ligandy Wnt na svoji specifickou doménu, která je ovšem odlišná od domény CRD, a působí tak jako inhibiční solubilní receptor. Strukturně

podobnou Wnt-vázající doménu jako WIF obsahují ve své extracelulární části receptorové tyrosin kinázové ze skupiny Ryk (Related to tyrosine kinase). Některé práce naznačují, že by kináza Ryk mohla fungovat v případě savčích buněk jako alternativní (ko-)receptor signalizace Wnt/ β -katenin. Ovšem tato hypotéza je pro omezené množství dat stále otevřená [89, 90].

Existuje několik proteinů odlišných od ligandů Wnt, které jsou schopny aktivovat receptorový komplex Fz/LRP. Jedním z nich je na cystein bohatý protein Norrin, který je schopen se vázat na některé receptory Frizzled, mediovat asociaci Frizzled/LRP a zahájit tak kanonickou signalizaci Wnt [91]. Jinými agonistickými molekulami jsou R-spondiny. R-spondiny jsou schopny působit synergicky s ligandy Wnt. V některých případech působí samy o sobě jako aktivátory cílových genů pro Wnt, a zahajují signalizaci podobným způsobem tedy vazbou na receptory Frizzled a LRP [92-94].

2.1.2 Cytoplazmatické komponenty kanonické Wnt-signalizace

2.1.2.1 β -katenin a jeho degradační komplex

Klíčovou molekulou v rámci kanonické signalizace Wnt je β -katenin. β -katenin má v buňkách dvě základní funkce. Jako strukturním protein je součástí mezibuněčných adhezivních spojení (adherent junctions). β -katenin je základním vazebným partnerem pro cytoplazmatické části různých kadherinů, jako například pro membránově vázaný E-kadherin a podílí se tak na tvorbě základní kostry adhezivních spojů. Prostřednictvím modulace své vazby na α -katenin, může β -katenin významně ovlivňovat podobu aktinového cytoskeletu. [95-98]. Neméně významná je signalizační funkce β -kateninu, která byla poprvé popsána při genetických studiích na octomilce. Jedinci s mutací v genu *armadillo* (muší ortholog obratlovčího genu pro *β -katenin*) nevykazovali žádné významnější poruchy v mezibuněčné adhezi, přesto však umírali v průběhu vývoje na defekty, které se fenotypově shodovaly s poruchami způsobenými mutantním genem *wingless* [99, 100]. Signalizační role β -kateninu/armadilla jako aktivátoru transkripce v rámci signalizace Wnt byla později potvrzena nejen u octomilky, ale i u obratlovců [36, 101].

Charakteristická struktura β -kateninu je tvořena N-terminální regulační oblastí, centrální částí, která obsahuje 12 tzv. armadillo-repetic (Armadillo repeats). Většina níže popisovaných interakcí β -kateninu s ostatními proteiny (včetně E-kadherinu, APC a transkripčních faktorů Lef/Tcf) je lokalizována právě do této oblasti, a navíc jsou některé z těchto interakcí vzájemně exkluzivní. C-terminální část β -kateninu obsahuje silnou transaktivační doménu [102]. Signalizační a strukturní aktivita jsou na sobě nezávislé a od sebe odělitelné, respektive se alespoň částečně vzájemně vylučují. Existují mutantní formy proteinu Armadillo, které mají vliv pouze na adhezivní funkci tohoto proteinu a neovlivňují funkci signalizační, respektive *vice versa* [103, 104]. Přirozeně došlo k oddělení adhezivní a signalizační funkce v případě *Caenorhabditis elegans*, který má několik různých β -kateninů, z nichž se jeden (HMP-2) uplatňuje pouze jako součást adhezivních spojů, zatímco ostatní (WRM-1, BAR-1, SYS-1) fungují v rámci signalizace Wnt [105-107].

V situaci, kdy buňky nejsou stimulovány prostřednictvím ligandu Wnt, je většina β -kateninu lokalizována jako součást adherentních spojů (v heterokomplexech s α -kateninem a E-kadherinem). β -katenin tak prakticky neuplatňuje svoji signalizační funkci, neboť hladina volného monomerního β -kateninu v cytoplazmě je posttranslačně udržována na nízké úrovni [18, 19]. Na udržení nízké hladiny cytoplazmatického β -kateninu se podílí multiproteinový degradační komplex, jehož součástí je strukturní protein Axin, tumor supresor APC, proteinkinázy z rodiny kasein kináz ($CK1\alpha$ $-\delta$, $-\epsilon$), a proteinkináza GSK3 β (nebo GSK3 α) [20-24]. V nestimulovaných buňkách je β -katenin fosforylován nejprve prostřednictvím kasein kinázy (nejčastěji $CK1\alpha$) na N-koncovém serinu 45, poté následuje rozhodující fosforylace pomocí kinázy GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) na N-koncových serinech 33 a 37 a na threoninu 41 [108, 109]. Dvoukroková fosforylace β -kateninu je signálem pro jeho ubikvitinaci, na které se podílí ubikvitin ligáza β -TrCP (β -Transducing repet Containing Protein). Takto označený β -katenin je následně degradován v proteazomu [25-27].

Přestože rozhodujícím signálem pro degradaci β -kateninu je jeho fosforylace prostřednictvím proteinkináz, strukturní funkce Axinu a APC je esenciální pro správný průběh celého procesu. Axin je schopen interagovat nejen se všemi ostatními členy β -katenin-degradačního komplexu, ale prostřednictvím tzv. DIX domény s proteinem Dishevelled [33, 110]. Relativní exprese *axinu* v buňkách je obvykle nízká. Axin je tedy

pravděpodobně rozhodujícím limitním faktorem, který ovlivňuje rychlou agregaci nebo naopak destabilizaci degradačního komplexu [20, 21]. Axin sám o sobě může být fosforylován prostřednictvím asociovaných kináz, tato fosforylace je nezbytná pro interakci Axinu s β -kateninem [111, 112]. V savčích buňkách byly nalezeny dva geny pro axinové proteiny, a to *axin1/axil* a *axin2/konduktin*. Zatímco *axin1* je exprimován konstitutivně, transkripce genu *axin2* je přímo stimulována signalizací Wnt, což je typický příklad negativní zpětné vazby v rámci signalizace Wnt. V situacích *in vivo* jsou přítom oba proteiny funkčně ekvivalentní [113].

Další strukturní protein β -katenin-degradačního komplexu je nádorový supresor APC (Adenomatous Polyposis Coli). Gen pro *apc*, který kóduje obrovitý protein (u člověka 2843 aminokyselin) je často mutován ve většině tzv. sporadických tumorů tlustého střeva, germinální mutace jedné alely genu *apc* se vyskytuje u pacientů s tzv. rodinnou polypózou tlustého střeva (FAP, Familiar Adenomatous Polyposis) [114, 115]. APC je dynamický adaptorový protein, který zprostředkovává interakce s jinými regulátory signalizace Wnt nejen v cytoplazmě, ale i v buněčném jádře. Strukturně je APC tvořen několika funkčními motivy. Obsahuje deset opakujících se 15-20 aminokyselinových motivů, které váží β -katenin. Mezi těmito repeticemi jsou střídavě lokalizována tři místa interagující s Axinem. Na molekule β -kateninu je vazebné místo pro APC lokalizováno do takřka stejných armadillo-repetic jako vazebné místo pro E-cadherin. β -katenin se tak nemůže současně vázat na molekuly degradačního komplexu a komponenty mezibuněčných spojů [116]. Rovněž APC může být fosforylován, a tato fosforylace umožňuje uvolnění ubikvitinem modifikovaného β -kateninu z degradačního komplexu. Jak nefosforylovaný β -katenin, tak nefosforylovaný APC se váží na Axin, dochází k dvoukrokové fosforylaci β -kateninu, a zároveň $CK1\alpha$ fosforyluje APC. Fosforylace zvyšuje afinitu APC k β -kateninu, a současně vede k uvolnění Axinu z degradačního komplexu. Axin pak může okamžitě vázat další volný β -katenin. Jednou z důležitých rolí pro APC by tedy mohlo být uvolnění fosforylovaného β -kateninu z degradačního komplexu [20, 21, 117, 118]. Defekty ve funkci APC lze u některých nádorových buněčných linií alespoň částečně kompenzovat zvýšenou expresí genu pro *axin* [21].

Na stabilitu cytoplazmatického β -kateninu mohou mít vliv také proteinfosfatázy, působící antagonisticky proti aktivitě kináz $CK1\alpha$ a $GSK3\beta$. Je známo, že se fosfatáza PP2A podílí na zvýšení hladiny cytoplazmatického β -kateninu po stimulaci Wnt. Fosfatáza PP2A má navíc schopnost se vázat na Axin a APC. Přestože nejsou přesně

známy mechanismy regulující aktivitu PP2A je možné, že fosforylační status β -kateninu je za určitých okolností výsledkem protichůdných aktivit kinázy GSK3 β a fosfatázy PP2A [119-121].

2.1.2.2 Stabilizace β -kateninu jako rozhodující událost kanonické signalizace Wnt

Kanonická signalizace Wnt je zahájena, jak bylo výše uvedeno vazbou ligandu Wnt na receptor Frizzled a koreceptor LRP. Experimenty založené na transfekcích různých forem chimérních receptorů Frizzled a LRP naznačují, že ligandy Wnt by mohly účinkovat jako jakýsi svorník přibližující k sobě oba tyto receptory. Ačkoli přímý experimentální důkaz chybí, zdá se, že blízká asociace obou receptorů je nezbytným krokem, jenž iniciuje kanonickou dráhu [122, 123]. Vzájemné přiblížení obou receptorů však není dostačující podmínkou. Pro iniciaci signalizace je nutná endocytóza receptorového komplexu. Pokud dojde k blokaci endocytózy, je rovněž zablokována signalizace Wnt v cílových buňkách [124, 125]. Prakticky okamžitě po vazbě ligandu Wnt na receptorový komplex následuje několik dějů, jejichž výsledkem je destabilizace β -katenin-degradačního komplexu. Vazba ligandu Wnt vede během několika minut k fosforylaci intracelulární části koreceptoru LRP, která obsahuje pět charakteristických fosforylačních motivů PPP(S/T)P, jež jsou fosforylovány prostřednictvím kinázy GSK3 β . Současně dochází k fosforylaci sousedních motivů kinázou CK1 γ . Tato členka rodiny kasein kináz je zvláštní tím, že je díky palmytylaci asociována s plazmatickou membránou. Pro aktivaci signalizace Wnt je nutná fosforylace oběma kinázami. Na takto fosforylovaný protein LRP se váže s vysokou afinitou Axin, což je jednou z příčin destabilizace β -katenin-degradačního komplexu. Jak je patrné, v tomto případě se CK1 γ a GSK3 β uplatňují nikoliv jako blokátory signalizace Wnt, ale přesně naopak. Velmi důležitou roli zde hraje membránová lokalizace uvedených kináz [82, 108, 126].

Další děje vedoucí k blokaci aktivity β -katenin-degradačního komplexu, jsou (současně s předchozími) iniciovány prostřednictvím receptoru Frizzled (Fz). Receptor Frizzled aktivuje po vazbě ligandu Wnt fosforylaci proteinu Dishevelled. Dishevelled je stěžejní modulátor jak kanonické signalizace Wnt, tak jejích nekanonických forem. Savčí genom obsahuje tři geny pro *Dishevelled* (*Dvl-1,-2,-3*) u octomilky je gen jeden (*Dsh*). Fosforylovaný Dvl se stává aktivním a prostřednictvím své PDZ domény se váže na

receptor Fz. Aktivní, a zároveň prostřednictvím receptoru Fz s membránou asociovaný Dvl, působí jako adaptorový protein, který váže další komponenty. Dvl prostřednictvím své DIX (Dishevelled-Axin) domény váže Axin, je také schopen vázat CK1, a tak přispívá k blokaci β -katenin-degradačního komplexu. Dvl rovněž asociuje s vnitrobuněčným inhibítorem kinázy GSK3 β , proteinem GBP/Frat [33, 110, 127]. Zatím není přesně známo jakým mechanismem je Dvl aktivován. Epistatická analýza u octomilky naznačuje, že by určitou roli mohly hrát G-proteiny asociované s receptorem Fz [128]. Roli G-proteinů v kanonické signalizaci Wnt potvrzují i experimenty provedené na buněčných liniích. Zvýšená exprese nebo konstitutivní aktivita proteinu G α_0 vede k aktivaci transkripce cílových genů signalizace Wnt [129]. Jako možné kinázy aktivující Dvl byly dále popsány CK1 ϵ a kináza Par-1 [130-132].

Výsledkem výše popsaných procesů je zablokování degradace β -kateninu a růst koncentrace volného monomerního β -kateninu. Následuje jeho translokace do buněčného jádra, kde β -katenin asociuje s transkripčními faktory Lef/Tcf. [36, 101, 133].

V řadě laboratoří bylo dokumentováno, že pokud je proces degradace β -kateninu narušen mutací, dochází k nefyziologické aktivaci signální dráhy Wnt. Mimořádně důležité je, že tato aberantní signalizace velmi často vede ke vzniku nádorů v různých typech tkání [13, 134]. K relativně nejlépe prozkoumaným nádorovým onemocněním souvisejícím s patologicky zvýšenou transkripční aktivitou β -kateninu jsou již zmíněné dědičné nebo sporadické nádory tlustého střeva, které jsou iniciovány mutacemi v nádorovém supresoru APC [37]. Mutace blokující aktivitu jiné komponenty degradačního komplexu, Axin1, byly popsány v mnoha typech karcinomů jater [135, 136]. Některé melanomy, nádory vaječníků a také malé procento nádorů střeva obsahuje specifické mutantní formy β -kateninu. Jedná se většinou o mutace v N-koncových serinech nebo threoninech, díky nimž takto mutovaný protein vykazuje vysokou stabilitu, hromadí se v jádře buňky a spouští tak transkripci závislou na faktorech Lef/Tcf. V těchto případech pak β -katenin působí jako konstitutivně aktivní onkogen. [137, 138].

2.1.3 Nukleární komponenty kanonické signalizace Wnt

2.1.3.1 Jaderný import β -kateninu

Mechanismus jakým se nefosforylovaný β -katenin dostává z cytoplazmy do buněčného jádra není dosud přesně objasněn. K problematice importu β -kateninu do buněčného jádra a na druhé straně rovněž i k jeho exportu zpět do cytoplazmy existuje řada vzájemně si odporujících prací. Zdá se pravděpodobné, že jaderný import β -kateninu je nezávislý na mechanismu, který vyžaduje transportní systém NLS-importin/karyopterin. β -katenin sám o sobě vykazuje jistou podobnost s karyopteriny a pravděpodobně je schopen přímo interagovat s komponenty jaderných pórů. Pro tuto interakci a rovněž pro jaderný import je důležitá přítomnost posledních tří armadillo-repetic a C-konce β -kateninu [139-142]. β -katenin může být rovněž exportován ven z jádra, a to způsobem závislým na vlastní „exportní“ doméně [143].

V momentě, kdy je β -katenin v jádře, může být jeho jaderná lokalizace fixována prostřednictvím některých proteinů, se kterými β -katenin interaguje. Jedním z nich je Pygopus a dalšími jsou transkripční faktory Lef/Tcf. Existuje ovšem také celá řada proteinů, jež mají schopnost zadržovat β -katenin, a to buď v jádře nebo naopak v cytoplazmě. Mezi tyto tzv. retenční proteiny patří především Axin a APC, které se mohou mimo cytoplazmu nacházet poměrně často rovněž v buněčném jádře, obzvláště v situaci, kdy je β -katenin-degradační komplex neaktivní [116, 144-146]. Na to, v jakém buněčném kompartmentu dojde k retenci β -kateninu pomocí těchto proteinů, má největší vliv jejich lokální koncentrační gradient (jádro/cytoplazma) [142].

2.1.3.2 Transkripční faktory Lef/Tcf

Jak již bylo zmíněno β -katenin má na svém C-konci transaktivační doménu, postrádá ale doménu DNA-vazebnou, která by β -kateninu umožnila iniciovat transkripci specifických cílových genů. Proto se β -katenin váže s transkripčními faktory Lef/Tcf, které β -katenin lokalizují k příslušným cílovým promotorům.

Zatímco genomy bezobratlých kódují vždy jeden transkripční faktor *Lef/Tcf* (*POP-1* v případě *Caenorhabditis elegans*, *Pangolin* u octomilky), genom obratlovců obsahuje čtyři geny: *Lef-1* (Lymphoid enhancer factor), *Tcf-1*, *Tcf-3*, *Tcf-4* (T-cell factor-1, -3, -4) [147]. Přestože se u savců dramaticky liší exprese jednotlivých typů Lef/Tcf během embryonálního vývoje i v dospělosti, jejich biochemická aktivita je vysoce podobná. Tato skutečnost je podepřena poznatky získanými u myši při inaktivaci jednotlivých transkripčních faktorů Lef/Tcf pomocí homologní rekombinace (tzv. knock out). Ze získaných výsledků vyplývá, že například transkripční faktory TCF-1 a LEF-1 jsou částečně redundantní a mohou vzájemně kompenzovat ztrátu své funkce [148]. Oba tyto faktory jsou významné pro růst a diferenciaci hematopoietických buněk (TCF-1 hlavně pro T-lymfocyty, LEF-1 pro B-lymfocyty) [149-151]. TCF-4 je nezbytný pro obnovu epitelu střevních buněk, kde je exprimován v epiteliálních kmenových buňkách střevních krypt. Z jiných typů tkání je možné zmínit epitel mléčné žlázy, kde je TCF-4 rovněž významně exprimován. [152, 153]. TCF-3 je důležitým regulátorem polaritu tělní osy během embryonálního vývoje [154, 155].

Všechny transkripční faktory Lef/Tcf sdílí několik základních společných charakteristických rysů. V promotorové oblasti cílových genů se váží prostřednictvím své DNA vazebné domény označované jako HMG-box na vysoce konzervovaný sekvenční motiv A/T A/T CAAA(G) [133, 156]. HMG-box se váže do malého žlábků v rámci DNA-šroubovice. Transkripční faktory Lef/Tcf nemají žádnou transaktivací doménu, nejsou tedy samy o sobě schopny iniciovat transkripci. Transkripci zahajují pouze ve formě komplexu s β -kateninem, přičemž se β -katenin váže svojí centrální částí (přibližně armadillo-repetice 3 až 10) na N-koncovou oblast faktorů Lef/Tcf. Další charakteristickou vlastností je jejich poměrně vysoká míra alternativního sestřihu pre-mRNA na 3'- konci, a to obzvláště v případě obratlovců [157, 158].

2.1.3.3 Transkripce mediovaná β -kateninem a její modulace

V situaci, kdy není aktivována signalizace Wnt, a tudíž nedochází k vazbě β -kateninu na Lef/Tcf, fungují tyto transkripční faktory spíše jako transkripční represory. Proteiny Lef/Tcf tvoří represivní komplex s proteiny Groucho/Grg/TLE. Tyto proteiny se váží na N-koncovou oblast Lef/Tcf, přibližně do stejných míst jako β -katenin. Groucho/Grg/TLE

patří mezi transkripční korepresory, které jsou schopny interagovat s chromatinem prostřednictvím asociovaných histon deacetyláz (HDAC1, HDAC3). Histon-deacetylázy remodelují strukturu chromatinu do velmi kompaktní podoby, a tím jej mění do transkripčně inaktivního stavu [159-161].

V případě, že došlo k aktivaci signalizace Wnt, β -katenin je translokován do jádra, kde vytlačuje proteiny Groucho/Grg/TLE z jejich vazby na transkripčních faktorech Lef/Tcf. β -katenin se sám na tyto transkripční faktory váže a mění je tak z represorů v transkripční aktivátory. Vazba β -kateninu je spojena s rozsáhlou remodelací chromatinu a jeho přeměnou do transkripčně aktivního stavu. C-konec β -kateninu je asociován s řadou chromatin remodelujících proteinů. Váží se na něj mimo jiné histon acetyláza CBP/p300 a protein Brg-1 spolu s dalšími komponentami chromatin remodelujícího komplexu SWI/SNF. [162-165]. Velmi významná je schopnost β -kateninu rekrutovat k místům transkripce komponenty trithoraxového HMT (histone methyl transferase) komplexu, a to konkrétně proteiny MLL1/MLL2 (mixed lineage-leukemia), které patří ke skupině SET-1 methyltransferáz. Proteiny ze skupiny SET-1 jsou schopny zprostředkovat trimethylaci histonu H3 na jeho čtvrtém lysinu (H3K4Me3). Tato chromatinová modifikace je typická pro otevřenou chromatinovou strukturu, a takový chromatin je transkripčně vysoce aktivní [166]. β -katenin také přivádí k místu transkripce obecné transkripční faktory jako například TBP [167]. Navíc β -katenin prostřednictvím proteinu Parafibromin/Hyrax (jeho kvasinkový homolog je znám jako Cdc73), který je integrální součástí aktivačního komplexu Paf-1, interaguje s proteiny iniciačního a elongačního komplexu RNA-polymerázy II [168]. Na C-konec β -kateninu se rovněž váží komponenty mediátorového systému (MED 12), který byl původně popsán u kvasinek jako komplex, který propojuje aktivitu transkripčních regulátorů s obecnými transkripčními faktory a s RNA-polymerázou II [169-171]. Transkripční faktory Lef/Tcf jsou tedy spíše než klasickými transkripčními faktory jakýmsi spojovníky, které přivádějí transkripční aktivátory nebo represory k cílovým místům [172].

Proteinový komplex Tcf/ β -katenin (nebo Lef/ β -katenin) je pravděpodobně plně transkripčně kompetentní již sám o sobě, ale v buněčném jádře existuje celá řada proteinů, které jsou schopny ovlivňovat jím mediovanou transkripci. Tyto proteiny asociují buď s β -kateninem nebo s Lef/Tcf, a svojí aktivitou mohou úroveň transkripce zesilovat nebo reprimovat. Klasickým příkladem transkripčních aktivátorů je dvojice proteinů Legless (lidský ortholog je znám jako Bcl9) a Pygopus. Tato proteinová dvojice byla popsána

poprvé u octomilky při genetické analýze zaměřené na hledání modulátorů signalizace Wnt. Fenotyp octomilek s inaktivovaným genem *legless* nebo *pygopus* velmi připomíná některé z mutantních fenotypů *wingless*. Protein Legless se váže na první čtyři armadillo-repetice β -kateninu, na Legless se připojuje protein Pygopus. Oba proteiny významně ovlivňují schopnost β -kateninu aktivovat transkripci. Pygopus je schopen zesilovat β -kateninem mediovanou transkripci, zároveň je proteinem určujícím lokalizaci proteinu Legless. Molekulární mechanismus jakým Legless a Pygopus realizují svoji aktivitu není dosud známý, určitou roli by mohla hrát jejich interakce s dalšími modulátory transkripce, nebo přímá aktivační úloha některé z funkčních domén těchto proteinů [173-176]. Inhibičně působí proteiny Chibby a ICAT (Inhibitor of β -catenin and Tcf). Malý jaderný protein Chibby se specificky váže na β -katenin a brání jeho vazbě s transkripčními faktory Lef/Tcf [177]. ICAT funguje obdobným způsobem, ale navíc brání interakci β -kateninu s některými chromatin-remodelačními proteiny (CBP/p300) [178].

Jiným represivním mechanismem působí proteiny, které posttranslačně modifikují transkripční faktory Lef/Tcf, a tím ovlivňují jejich aktivitu. Fosforylace transkripčního faktoru TCF-4 (rovněž tak LEF-1) na serinových a threoninových zbytcích prostřednictvím kinázy NLK (NEMO-Like Kinase) snižuje schopnost komplexu TCF-4/ β -katenin vázat DNA a NLK tak inhibuje kanonickou signalizaci Wnt. V případě *Caenorhabditis elegans* vede dokonce fosforylace transkripčního faktoru POP-1 kinázou LIT-1 (ortholog NLK) k jeho exportu ven z jádra prostřednictvím 14-3-3 proteinu Par-5 [179, 180]. Na druhou stranu fosforylace transkripčních faktorů Lef/Tcf nemá vždy represivní efekt. Fosforylace proteinu LEF-1 na jeho N-koncových serinech kinázou CK2, v tomto případě lokalizovanou v jádře, výrazně zvyšuje schopnost LEF-1 vázat β -katenin, a navíc brání vazbě represorů Groucho/Grg/TLE na LEF-1. CK2 tedy svým působením v tomto případě zvyšuje transkripční aktivitu [181]. Další proteinovou modifikací proteinů Lef/Tcf, jež má vliv na transkripční aktivitu je sumoylace, čili modifikace prostřednictvím SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier). Tento typ modifikace je velmi podobný ubikvitinaci, ale enzymy, které sumoylaci katalyzují jsou substrátově specifické. Modifikace sumoylací ovlivňuje buněčnou lokalizaci, funkci a stabilitu takto modifikovaných proteinů. Sumo E3 ligázový protein PIASy (Protein Inhibitor of Activated STAT y) se podílí na sumoylaci proteinů LEF-1 a TCF-4. Zatímco v případě LEF-1 má tato modifikace represivní efekt na transkripci mediovanou β -kateninem, tak v případě TCF-4 je sumoylace stimulatorem transkripce. Sumoylace proteinů Lef/Tcf je ovšem procesem velmi dynamickým, a tyto

transkripční faktory mohou být opět de-sumoylovány prostřednictvím proteinu Axam [182, 183].

2.1.3.4 Deaktivace transkripce mediované β -kateninem

Pro regulaci řady buněčných procesů je velmi důležitý dynamický přechod od transkripčně aktivního k transkripčně inaktivnímu stavu a naopak. V případě transkripce mediované β -kateninem se obě situace liší, jak již bylo naznačeno, rozdílným zastoupením transkripčních aktivátorů a represorů. Zatímco transkripční faktor LEF-1 je permanentně vázaný na příslušné promotory, složení regulačních proteinů se periodicky mění. Práce Sierry a kol. naznačuje, jakým způsobem k takové změně dochází v situaci, kdy dojde k zablokování kanonické signalizace Wnt, a tím blokaci transkripce na předtím aktivních promotorech. Při studiu dějů na promotoru cílového genu signalizace Wnt, a sice *c-myc*, byla překvapivě demonstrována významná jaderná aktivita proteinu APC při blokaci transkripce. Protein APC je rekrutován do místa specifického promotoru. Zde APC asociuje s proteinem LEF-1, a iniciuje výměnu transkripčních aktivátorů za represory. APC pravděpodobně vytěsňuje β -katenin z vazby na LEF-1 a zároveň s sebou rekrutuje dva důležité proteiny: ubikvitin ligázu β -TrCP a transkripční korepresor CtBP (C-terminal Binding Protein). Transkripční korepresor CtBP poté transientně interaguje s proteinovým komplexem na transkripčním faktoru LEF-1. Represivní aktivita CtBP má zřejmě rozhodující roli na blokaci transkripce. CtBP může asociovat s histon deacetylázami, a tak modifikovat chromatin v transkripčně neaktivní. Již dříve byla popsána schopnost CtBP být také v komplexu s demetylázou LSD1 (Lysin Specific Demethylase 1) a předpokládá se, že právě aktivita tohoto enzymu ruší modifikaci H3K4Me3, což opět vede k transkripční represi. Tuto hypotézu podporuje skutečnost, že asociace CtBP na LEF-1-specifický promotor koreluje s výrazným poklesem trimethylace lysinu na histonu H3. CtBP později z promotorové oblasti disociuje a je nahrazen represory Groucho/Grg/TLE [166].

2.1.3.5 Cílové geny kanonické signalizace Wnt

Výsledným efektem, všech událostí v průběhu kanonické signalizace Wnt, je transkripce specifických genů. Řada z těchto genů kóduje buněčné protoonkogeny (*c-jun*) nebo naopak nádorové supresory. Mezi cílové geny patří významné regulátory proliferace (*c-myc*, *cyklinD1*). Kanonická signalizace je charakteristická velkou mírou autoregulace, nepřekvapí proto, že mezi cílové geny patří také řada negativních a pozitivních regulačních proteinů, které se uplatňují v této signální dráze. Jako příklad lze uvést *Axin2*, *Frizzled*, β -*TrCP*. Aktivace transkripce různých cílových genů signalizace Wnt je ovšem značně závislá na buněčném typu, a tak stejný ligand Wnt může stimulovat v různých buňkách transkripci různých genů. Svou roli zde může hrát různá míra komplexity promotorových oblastí a rovněž také aktivita jiných transkripčních faktorů na promotorech integrujících signály z více různých typů signálních kaskád [38, 40, 41, 184-188].

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Interakce TCF-4, transkripčního faktoru obsahujícího HMG box, s korepresorem CtBP1 kontroluje expresi cílového genu signalizace Wnt Axin2/Konduktin v lidských embryonálních ledvinných buňkách

Transkripční faktory Lef/Tcf rozeznávají v oblasti cílového promotoru stejný vysoce konzervovaný sekvenční motiv. To samozřejmě platí také pro všechny čtyři zástupce těchto transkripčních faktorů, které se uplatňují v případě regulace transkripce u savců, včetně člověka (LEF-1, TCF-1, TCF-3, TCF-4). Jak naznačují experimenty založené na aberantní inaktivaci genů *Lef/Tcf* u myších modelů, je aktivita těchto transkripčních faktorů často redundantní a jeden transkripční faktor může alespoň částečně kompenzovat absenci jiného transkripčního faktoru, jako je to v případě LEF-1 a TCF-1 [148, 189]. Je tedy otázkou, zda jsou všechny transkripční faktory Lef/Tcf shodné, nebo jestli je jejich aktivita specificky místně a časově regulována v různých buněčných typech. Odpovědí by mohla být existence proteinů, které by specificky interagovaly s jednotlivými proteiny Lef/Tcf, a tak by byly schopny modulovat aktivitu konkrétních transkripčních faktorů Lef/Tcf.

V této práci jsme se pokusili nalézt takové proteiny, které by specificky interagovali pouze s transkripčním faktorem TCF-4 a ovlivňovali by tak jen jeho aktivitu. Porovnání sekvencí všech lidských zástupců Lef/Tcf ukázalo největší rozdíly v C-koncové sekvenci těchto proteinů. Navíc některé práce naznačovaly, že exprese některých TCF-4-specifických genů je závislá na přítomnosti specifické C-koncové oblasti tohoto proteinu [190]. Proto byla testována právě tato oblast proteinu TCF-4. Na základě dat získaných prostřednictvím kvasinkového dvouhybridního systému byl identifikován proteinem, který specificky interaguje s C-koncem faktoru TCF-4, transkripční korepresor CtBP.

CtBP (C-terminal Binding Protein) byl původně popsán jako protein který interaguje s adenovirovým onkoproteinem E1A a významně ovlivňuje jeho aktivitu [191, 192]. Role CtBP je však v buňce velmi komplexní a CtBP moduluje transkripci mnoha důležitých proteinů, které hrají roli při regulaci buněčného cyklu nebo buněčné adhezivity [193]. CtBP je transkripční korepresor se slabou NAD/NADH dehydrogenázovou aktivitou, která má vliv na jeho represivní funkci a ovlivňuje rovněž schopnost CtBP interagovat s jinými proteiny. Represivní aktivita CtBP je zprostředkována převážně aktivitou s ním asociovaných histon deacetyláz (HDAC class I, HDAC class II). CtBP je také schopen

rekrutovat k cílovým genům komponenty chromatin remodelujícího komplexu známého jako Polycomb, který způsobuje transkripční inaktivaci chromatinu [194-196]. CtBP rovněž zabraňuje interakci chromatinu s histon methyltransferázami (CBP/p300), které pak nemohou stimulovat transkripci [197]. Genom octomilky obsahuje jeden gen pro *CtBP*. V genomu savců se vyskytují dva geny *CtBP1* a *CtBP2*, které kódují funkčně totožné a strukturně velice podobné proteiny. Protein CtBP2 se liší přítomností krátké N-terminální sekvence. Oba proteiny jsou spolu schopny dimerizovat. Je pozoruhodné, že se aberantní inaktivace genu *CtBP2* projevuje u myši fenotypem, který velmi připomíná fenotyp myši s mutacemi v komponentách signalizace Wnt [192, 198].

CtBP1 a také CtBP2 se váží na specifický krátký interakční motiv PXDLS (PLDLS, PXSLXXX). Jak ukázala analýza sekvence proteinů Lef/Tcf, tento motiv se dvakrát vyskytuje v C-koncové oblasti TCF-3 a rovněž tak TCF-4. Zdá se tedy, že proteiny CtBP by mohly být specifickými regulátory pro tyto dva reprezentanty transkripčních faktorů Lef/Tcf. Již dříve byla popsána interakce CtBP a TCF-3 *in vitro*. Relevance této interakce byla potvrzena u *Xenopus laevis*, kde je aktivita XCtBP nutná pro represivní působení XTcf-3 [199]. TCF-3 je charakteristický tím, že v buňce funguje převážně jako transkripční represor, a to nejspíše i v případě, kdy tvoří heterokomplex s β -kateninem. [155, 200, 201]. Položili jsme si tedy otázku, zda CtBP může modulovat také aktivitu TCF-4, který je ve formě heterokomplexu s β -kateninem transkripčně vysoce aktivní.

Následné experimenty potvrdily schopnost CtBP1 i CtBP2 (nepublikováno) interagovat specificky s TCF-4 *in vitro*. Pro interakci je nezbytně nutná přítomnost C-konce proteinu TCF-4, který obsahuje dvě potenciální CtBP-vazebná místa. Pokud byla tato část proteinu TCF-4 odstraněna nebo vyměněna za C-konec proteinu LEF-1, který neobsahuje žádná předpokládaná CtBP-vazebná místa, pak k vazbě CtBP1 na TCF-4 nedochází.

Dále jsme sledovali vliv CtBP1 na transkripci zprostředkovanou transkripčním faktorem TCF-4. Jako základní modelový systém pro testování aktivity CtBP jsme použili buněčnou linii odvozenou z lidských embryonálních ledvin, HEK293. Tyto buňky exprimují v dostatečné míře transkripční faktor TCF-4, jak jsme potvrdili pomocí imunoblotu. Jsou-li tyto buňky stimulovány ligandem Wnt1, dochází k aktivaci transkripce z promotorů obsahujících vazebná místa pro Lef/Tcf. Intenzitu této transkripce lze kvantifikovat pomocí luciferázového reportéru pTOPFLASH, u něž je exprese Luciferázy kontrolována syntetickým promotorem, který obsahuje tandem šesti optimálních Lef/Tcf-vazebných míst (kontrolní reportér pFOPFLASH má tato místa mutovaná) [37]. Pomocí zmíněných reportérů jsme prokázali, že zvýšená exprese CtBP1 v buňkách HEK 293

inhibuje transkripci iniciovanou ligandem Wnt1. Pro detailnější studium mechanismů této represe jsme připravili buňky s regulovatelnou expresí CtBP1 (293-EGFP-CtBP1), kde je možné v homogenní buněčné populaci exprimovat CtBP1 na úrovni blízké přirozené situaci v buňkách. Je-li v těchto buňkách exprimován CtBP1, dochází opět k represí transkripce u specifického reportéru. Represivní působení CtBP na transkripci Lef/Tcf-specifického promotoru je spojeno s aktivitou histon deacetyláz. Pokud byly buňky 293-EGFP-CtBP1 kultivovány s inhibítozem histon deacetyláz Trichostatinem A, zvýšená exprese CtBP1 nevede k represí transkripce iniciované ligandem Wnt1. CtBP1 je rovněž schopen reprimovat transkripci přirozených cílových genů signalizace Wnt v buňkách 293-EGFP-CtBP1. Jak jsme ukázali v případě genu *Axin2*, dochází po stimulaci ligandem Wnt1 k několikanásobnému zvýšení hladiny mRNA pro *Axin2*. Pokud ovšem buňky exprimují CtBP1, transkripce genu *Axin2* je výrazně reprimována.

Zjištění, že CtBP1 je schopen reprimovat transkripci indukovanou ligandem Wnt bylo později potvrzeno jinými laboratořemi. Je otázkou, zda je základem represivního působení CtBP přímá interakce s transkripčním faktorem TCF-4. Ani v naší laboratoři jsme totiž nebyli schopni prokázat přímou interakci CtBP1 s TCF-4 *in vivo*. Hamada a Bienz předpokládají, že CtBP1 interaguje s tumor supresorem APC a společně vytěsňují β -katenin z vazby na transkripčním faktoru [202]. V nedávné době byla rovněž popsána úloha CtBP při deaktivaci β -kateninem mediované transkripce. V tomto případě protein APC přivádí CtBP a β -TrCP spolu s ostatními proteiny k heterokomplexu LEF-1/ β -katenin a mění jej z transkripčně aktivního v transkripčně inaktivní. CtBP je ovšem součástí represivního komplexu jen transientně [166]. V tomto případě by to mohlo být, pochopitelné, neboť se zde autoři zaměřili na transkripční faktor LEF-1, který neobsahuje CtBP-vazebný motiv. Je samozřejmě možné, že i v případě represe transkripce mediované komplexem TCF-4/ β -katenin je role přímé interakce mezi TCF-4 a CtBP jen aditivní a CtBP blokuje transkripci mechanismem založeným na APC. Na druhou stranu byla prokázána přímá kolokalizace CtBP1 a TCF-4 v některých typech střevních nádorů, respektive v buňkách z nich odvozených. Navíc byla u těchto nádorů popsána mutantní forma TCF-4, která postrádá CtBP-vazebný motiv. Pokud je tato forma TCF-4 v buňkách exprimována, CtBP1 není schopen reprimovat transkripci iniciovanou signalizací Wnt. Tento výsledek by potvrzoval důležitost přímé interakce mezi CtBP a TCF-4 pro represivní aktivitu CtBP [203]. Role proteinů CtBP při regulaci signalizace Wnt může být velmi komplexní, jak ukazují studie popisující aktivitu CtBP na přirozených cílových genech

signalizace Wnt u octomilky. CtBP zde může transkripci nejen reprimovat, ale může mít také překvapivě svůj podíl při transkripční aktivaci [204].

1
2
3
4
5
6
7 **ABSTRACT**
8

9 The Wnt signaling pathway is essential for the regulation of proliferation and
10 maintenance of hematopoietic stem cells, progenitors as well cells at various stages of
11 differentiation. During B cell development Wnt-induced signaling is involved in the pre-
12 pro B transition and is apparently important for B cell survival. Wnt1- and Wnt3a-
13 expressing Rat2 fibroblasts efficiently suppressed apoptosis of human pre-B cell-derived
14 cell lines KM3 and REH induced by the cytotoxic ligand TRAIL while apoptosis of more
15 mature Ramos lymphoma or myeloid cells remained unaffected. Wnt-expressing
16 fibroblasts induced in KM3 cells β -catenin stabilization, downregulation of the TRAIL
17 receptors DR4/DR5 and suppression of caspase-8 and Bid processing. The antiapoptotic
18 effect was partly dependent on the activity of MEK1/ERK kinases and was unaffected by
19 the PI3K inhibitor wortmannin. Interestingly, the recombinant Wnt3a and Wnt5a ligands,
20 Wnt3a-producing L cells or GSK3 β inhibitor were considerably less effective or
21 completely ineffective in inhibiting apoptosis of KM3 cells. These results imply the
22 existence of an additional antiapoptotic signal mediated by Wnt1- or Wnt3a-transformed
23 Rat2 fibroblasts. This signaling in conjunction with the Wnt-triggered cascade of cellular
24 events suppresses TRAIL-induced apoptosis of pre-B cells. Such composed antiapoptotic
25 signaling could be of importance during B cell differentiation as well as malignant
26 transformation.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7 **INTRODUCTION**
8

9 Regulation of apoptosis is interconnected with cell proliferation and a number of pro-
10 proliferative signals were shown to influence the apoptotic status of the affected cell. A
11 large family of secreted lipid-modified glycoproteins, the Wnt ligands, participate in the
12 regulation of cell proliferation, differentiation and survival (1, 2). Interaction of the Wnt
13 proteins with their receptor complex - transmembrane polypeptides of the Frizzled
14 family together with LPR 5/6 co-receptors - results in the activation of so-called
15 canonical and non-canonical signaling in the target cell (3-5). β -catenin is the key player
16 of the canonical Wnt pathway. In unstimulated cells β -catenin is marked for
17 ubiquitylation and degradation by action of a large multiprotein complex that includes
18 Ser/Thr kinase GSK3 β and two “scaffold” proteins Axin1/2 and APC. Canonical
19 signaling inhibits activity of the GSK3 β /Axin1/2/APC complex and stabilized β -catenin
20 accumulates in the cytoplasm and also in the cell nucleus. Nuclear β -catenin associates
21 with the transcription factors of the Tcf/Lef family and activates transcription of their
22 target genes. Non-canonical Wnt signaling leads to the mobilization of intracellular
23 calcium or to activation of kinases of the JNK family and small GTPases of the Rho
24 family (6). In the hematopoietic system the Wnt proteins participate in maintenance and
25 differentiation of hematopoietic stem cells and progenitors (7). Wnt signaling is also
26 required during maturation of the thymic T cells (8, 9) and for the survival of the B
27 cells at the pre-B-cell stage (10, 11). Furthermore, the active Wnt pathway suppresses
28 apoptosis of the serum-deprived hematopoietic CD34⁺ progenitors. The pro-proliferative
29 and anti-apoptotic function of Wnt signaling was observed not only in the hematopoietic
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 cells but also in other cell types. It was reported that Wnt-activated signaling inhibits
5
6 serum-withdrawal-induced apoptosis of osteoblasts, preadipocytes, and fibroblasts (12-
7
8 15). Potential anti-apoptotic function of Wnt signaling was also supported by inhibition
9
10 of Wnt1 or Wnt2 signaling with monoclonal antibodies or with Wnt antagonist Dickkopf-
11
12 1. These treatments induced apoptosis of malignant melanoma or mesothelioma cells (16-
13
14
15
16 18).

17
18
19 In contrast to the Wnt ligands, death ligands of the TNF family induce apoptosis
20
21 mainly of target cells (19-21). Among them TRAIL is known to induce apoptosis namely
22
23 of transformed cells and thus seems to be a promising anti-tumor agent of a new
24
25 generation (22-24). TRAIL interacts with its pro-apoptotic receptors TRAIL-R1/DR4 or
26
27 TRAIL-R2/DR5, induces formation of the intracellular Death-Inducing Signaling
28
29 Complex (DISC) and subsequent activation of the initiator caspases-8 or -10. These
30
31 activated caspases cleave Bid, proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family.
32
33 Truncated Bid (tBid) then translocates to mitochondria where it co-activates
34
35 mitochondrial apoptotic signaling (25). TRAIL-induced apoptosis can be affected at a
36
37 number of regulatory check points at the level of pro- and anti-apoptotic (TRAIL-R3 and
38
39 TRAIL-R4) expression and cell surface localization, expression of caspase-8 competitor
40
41 FLIP, postranslational modification of Bid or enhanced expression of anti-apoptotic
42
43 proteins from the Bcl-2 and IAP families. Receptor-mediated activation of PI3K/Akt, Erk
44
45 or protein kinase C signaling pathways or tumor elevated activity of casein kinase II can
46
47 also negatively influence the outcome of TRAIL-induced apoptosis (26-30).
48
49
50
51
52
53
54

55 Here we report that Wnt signaling suppresses TRAIL-induced apoptosis of human
56
57 pre-B leukemia cells. The efficient inhibition of apoptosis requires a direct contact of
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 leukemic cells with the Rat2 fibroblast feeder cells expressing the Wnt1 or Wnt3a
5
6 ligands. The anti-apoptotic action of the Wnt1/Wnt3a transgenic Rat2 feeders is only
7
8 partially substituted by either recombinant soluble Wnt3a or Wnt3a-expressing murine L
9
10 cells. This indicates that an additional stimulus provided specifically by Wnt-transformed
11
12 Rat2 fibroblasts is required for more efficient suppression of TRAIL-induced apoptosis in
13
14 attached pre-B leukemia cells.
15
16
17
18
19
20

21 **MATERIALS AND METHODS**

22 **Cell lines, reagents and antibodies**

23
24 Human hematopoietic cell lines KM3, REH (pre-B cells); Ramos (B- cells); ML-1, HL-
25
26 60, THP-1 (myeloid cells); Jurkat, CEM, MOLT-4 (T cells); NK3 (NK cells) and TF-1
27
28 (erythromyeloid cells) were cultured in RPMI medium with 10% FCS. Mock-infected
29
30 and Wnt1- or Wnt3a-infected immortalized rat fibroblast Rat2, wild-type embryonic
31
32 mouse fibroblasts L and mouse L fibroblasts with stably transfected Wnt3a (L-Wnt3a)
33
34 (ATCC) were cultured in DMEM medium with 10% FCS. Following kinase inhibitors
35
36 were used: inhibitor of GSK-3, BIO and inactive inhibitor of GSK-3, MethylBIO was
37
38 kindly provided by Dr. Brivanlou, MEK1 inhibitor PD-98059 and PI3kinase inhibitor
39
40 wortmannin were purchased from Sigma. Recombinant mouse Wnt3a and human
41
42 Dickkopf-1 were purchased from R&D Systems. Human N-terminally His-tagged
43
44 recombinant TRAIL (amino acids 95-281) was affinity-purified in our laboratory after its
45
46 overexpression in E.coli(BL-21) and deprived of contaminating E.coli endotoxins by
47
48 Endotrap chromatography (Profos AG). AnnexinV-FITC was donated by Apronex Ltd.,
49
50 Czech Republic. Hoechst 33258 was purchased from Molecular Probes. Commercially
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 available antibodies were purchased from indicated suppliers: mouse monoclonal Myc
5 tag (Roche Molecular Biochemicals), mouse monoclonal phospho-ERK (Upstate
6 Biotechnology), mouse monoclonal α -tubulin (Exbio), rabbit polyclonal caspase-8 and
7 caspase-3 (BD Biosciences), rabbit polyclonal Bid (Santa Cruz), rabbit polyclonal
8 polyADP-ribose polymerase (PARP) (Calbiochem), rabbit polyclonal ERK (Cell
9 Signaling). Anti-TRAIL receptors flow cytometry set was purchased from Alexis.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21 **Co-cultivation of hematopoietic cells on a layer of feeder cells**

22
23 Rat fibroblasts Rat2 [transduced with retroviral constructs expressing mouse Wnt1,
24 Wnt3a (Rat2Wnt1, Rat2Wnt3a) or with empty retrovirus (Rat2MV7)] (31) or mouse
25 fibroblast L cells (wild-type or Wnt3a-expressing) were seeded to form a monolayer at
26 80% confluency. Next day, hematopoietic cells were spread on the feeder cells and co-
27 cultivated for 8 hours. After this incubation, cells were used for further experiments.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Proliferation assays**

39
40 KM3 cells (3×10^5 cfu) were spread in triplicates onto 90%-confluent cultures of feeder
41 cells (Rat2MV7 or Rat2Wnt1) in 24-well plates and after 8 hours of co-culture were
42 pulsed with 2 μ Ci of [3 H]thymidine (each well). Cells were incubated for another 18
43 hours before harvesting. Feeder cells without KM3 cells were treated under the same
44 conditions and were used as background of proliferation. KM3 cells were, together with
45 Rat2 feeders, harvested by scraping and after washing, the incorporated radioactivity was
46 measured by liquid scintillation counting.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 For the CFSE cell proliferation assay KM3 cells were preincubated with CFSE at 37°C
5
6 for 8 minutes, washed with PBS containing 2% FCS, co-cultured on 90% confluent
7
8 feeder cells for 24 hours and analyzed by flow cytometry.
9

10 11 12 13 14 **Western blotting**

15
16 Cell lysates were separated by SDS PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes
17
18 (Amersham). Membranes were blocked with 5% nonfat milk in PBS containing 0.05%
19
20 Tween-20 (PBS/Tween), incubated with specific primary antibodies and then after
21
22 several washes with appropriate peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse
23
24 secondary antibodies (BioRad). After washing three times with PBS/Tween, the blots
25
26 were visualized by enhanced chemoluminescence (ECL, Pierce).
27
28
29
30
31
32

33 34 **Flow cytometry and apoptosis assays**

35
36 Hematopoietic cells were separated from the layer of the feeder fibroblasts by gentle
37
38 pipetting, washed with ice-cold PBS and incubated with the blocking solution (PBS
39
40 containing 20% human serum, 1% gelatin and 0.1% azide) on ice for 15 min. Cells were
41
42 then washed once with the wash buffer (PBS containing 1% gelatin and 0.1% azide),
43
44 incubated with appropriate primary monoclonal antibodies, washed twice with ice-cold
45
46 wash buffer and finally incubated with the secondary goat anti-mouse antibodies coupled
47
48 to phycoerythrin (IgG1-PE) (SouthernBiotech). After two final washes the surface
49
50 expression of the receptors on live cells (negatively stained with Hoechst 33258) was
51
52 analyzed by flow cytometry on LSRII (BD Biosciences).
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

For the apoptosis assays, cells were either mock-treated or treated with TRAIL (200 ng/ml) for indicated times. After the treatment, cells were harvested from the feeder cells, washed with ice-cold PBS and stained with AnnexinV-FITC and Hoechst 33258. Stained cells were analyzed by flow cytometry.

RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNA was prepared using Trizol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and reversely transcribed with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) using oligo dT primer. The cDNA was amplified using SYBR-Green PCR Master Mix (Roche) and human specific primers (sequences available upon request) in MX3000® (Stratagene) or LightCycler® 480 System (Roche). Normalizations across samples were performed using geometric average of constitutive gene expression of the *SDHA* or *BACT* genes.

1
2
3
4 **RESULTS**
5

6 **TRAIL-induced apoptosis of several hematopoietic cell lines is suppressed by Wnt1-**
7 **expressing fibroblasts**
8
9

10 The cytotoxic ligand TRAIL can efficiently induce apoptosis of a number of cell lines
11 derived from hematopoietic malignancies and the ligands of Wnt family act as essential
12 factors in T and B cell differentiation and proliferation. We were interested whether these
13 two signaling pathways crosstalk and how they could affect each other. We tested the
14 effect of Wnt1-expressing Rat2 fibroblasts used as cushion/feeder cells on TRAIL-
15 induced apoptosis using a panel of hematopoietic cell lines of various origin (Table 1).
16 Co-cultivation of some cell lines with Rat2Wnt1 feeder cells but not with the mock-
17 transfected cells promoted partial (Jurkat or CEM T-cell lines) or almost complete (KM3
18 and REH B-cell lines) resistance to TRAIL-induced apoptosis. In contrast, TRAIL-
19 induced cell death of myeloid cell lines was virtually unaffected by Rat2Wnt1 feeders. In
20 follow-up detailed analysis of this phenomenon we analyzed pre-B cell line KM3. First,
21 we examined whether Rat2Wnt1 fibroblasts could possibly enhance proliferation of KM3
22 cells and in this indirect way “balance” TRAIL-induced apoptosis. Thymidine
23 incorporation assay and CFSE analysis (not shown) revealed that neither Wnt1- nor
24 Wnt3a-expressing Rat2 fibroblasts enhanced proliferation of co-cultivated KM3 cells
25 (Table 2). Thus, we assumed that Rat2Wnt-induced signaling can interfere directly with
26 the cellular mechanisms of TRAIL-induced apoptosis in selected hematopoietic cell lines.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 **Rat2Wnt1 fibroblasts suppress the proximal events in TRAIL apoptotic signaling in**
56 **KM3 pre-B cells**
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Direct comparison of Rat2Wnt1-responding KM3 cells with ML-1 cells, i.e. with control
5 cells unaffected by the type of the feeders (Fig. 1A), revealed clear downregulation of the
6 pro-apoptotic TRAIL receptor DR5 from the surface of the Rat2Wnt1-treated KM3
7 cells (Fig. 1B). Although the additional pro-apoptotic TRAIL receptor DR4 was only
8 marginally expressed on both ML-1 and KM3 cells, Rat2Wnt1 feeder cells also induced
9 its downregulation in KM3 and not in ML-1 cells (Fig. 1B). This implied that the
10 diminished sensitivity to TRAIL could be at least in part related to the reduced surface
11 expression of the corresponding TRAIL receptors in KM3.
12
13

14 Proximal events in TRAIL-induced apoptosis are DISC-mediated activation of caspase-8
15 followed up by caspase-8-mediated processing of the proapoptotic BH3-only sentinel Bid
16 to its truncated form (tBid). Caspase-8 activation and Bid processing were almost
17 completely inhibited in KM3 cell cultivated on Rat2Wnt1 fibroblasts (Fig. 1C). Similarly,
18 processing of the effector caspase-3 and cleavage of its target proteins PARP and cFlip
19 was at 6 hr time point significantly attenuated and at the later time point completely
20 suppressed.
21
22

23 Rat2Wnt1-induced downregulation of DR4 and DR5 cell surface expression is
24 possibly regulated at transcriptional and/or posttranscriptional levels. Using quantitative
25 real-time RT PCR (RT-qPCR) we examined Rat2Wnt1-induced changes in transcription
26 of *DR4* and *DR5* as well as several other apoptosis- and proliferation-related genes in
27 KM3 cells (Fig. 2). Indeed, transcription of both *DR4* and *DR5* mRNAs was significantly
28 attenuated by Rat2Wnt1 fibroblasts. Furthermore, expression of *c-myc* and
29 *p21/WAF1/CIP1* was also reduced in Rat2Wnt1-treated KM3 cells (Fig. 2). In agreement
30 with the RT-qPCR data, Wnt1-mediated downregulation of *c-myc* mRNA was also
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 reflected in a reduced expression of the corresponding protein as evidenced by Western
5 blotting (Fig. 1C, compare the zero time points). The decrease in the c-Myc expression
6 was rather surprising as c-Myc was reported previously as a direct target of canonical
7 Wnt signaling (32). Nevertheless, we detected upregulation of another known target of
8 the Wnt/ β -catenin pathway, *c-MYB*, in Rat2Wnt1-stimulated KM3 cells as well as in
9 KM3 cells treated with Rat2Wnt3a feeders or with the recombinant Wnt3a protein (not
10 shown). Expression of additional Wnt-responsive genes *cyclin D*, *Axin2*, and survivin
11 was unaffected by the type of the feeder cells. Similarly, *bcl-2* mRNA remained
12 unchanged during the experiment (Fig. 2 and data not shown).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **Direct Wnt-induced signaling does not provide full protection against TRAIL-** 30 **induced apoptosis of KM3 cells** 31

32 Direct Wnt-induced signaling was shown to provide protection against serum withdrawal
33 or drug-induced apoptosis in osteoblasts and fibroblasts (12, 14). These effects were
34 examined either autonomously in Wnt1-transformed cells or using the exogenous
35 recombinant Wnt3a protein. In order to dissect the relation between anti-apoptotic action
36 of Rat2Wnt1 cells and Wnt-induced signaling in KM3 cells we compared anti-apoptotic
37 effects of several different Wnt signaling-triggering systems and reagents. In addition to
38 Rat2Wnt1 fibroblasts we also employed Rat2Wnt3a fibroblasts, murine Wnt3a-
39 expressing L cells, conditioned medium from these cells, recombinant and commercially
40 available Wnt3a and Wnt5a, and shortcut activator of canonical Wnt signaling BIO (an
41 inhibitor of GSK3 β) (33). Wnt-induced stabilization of β -catenin is a hallmark of the
42 initiation of the canonical Wnt signaling pathway. The treatment of KM3 cells with all
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 indicated cell lines or reagents (except Wnt5a that is known as the non-canonical
5
6 pathway activator) induced accumulation of β -catenin in responding KM3 cells (Fig.
7
8
9 3A). As expected, mock-transfected feeder cells and the inactive variant of the GSK3 β
10
11 inhibitor MetBIO were unable to induce an increase in the β -catenin protein levels (Fig.
12
13
14 3A).

15
16
17 Although all the relevant stimuli presumably activated the canonical Wnt
18
19 signaling in KM3 cells (the most efficient “stabilizer” of β -catenin appeared to be L-
20
21 Wnt3a cells), the individual stimuli greatly differed in the ability to suppress TRAIL-
22
23 induced apoptosis. Co-cultivation of KM3 cells on Rat2 fibroblasts expressing Wnt1 or
24
25 Wnt3a efficiently attenuated their apoptosis (albeit with a weaker effect of Wnt3a), but L-
26
27 Wnt3a feeders, despite strong accumulation of β -catenin, suppressed apoptosis to a lesser
28
29 extent (Fig. 3B). Similarly, priming the KM3 cells with recombinant Wnt3a, Wnt5a or
30
31 with a Wnt3a-conditioned medium attenuated TRAIL-induced apoptosis of KM3 cells
32
33 either relatively weakly (Wnt3a, Wnt3a-conditioned medium) or not at all (Wnt5a) (Fig.
34
35
36 3B). In agreement with these results, recombinant Dickkopf-1, a direct inhibitor of Wnt
37
38 signaling, only partially suppressed the anti-apoptotic effect of Rat2Wnt1 fibroblasts (not
39
40 shown). In a sharp contrast to the natural inducers of Wnt signaling, the synthetic
41
42 inhibitor of GSK3 β activity, BIO, did not protect KM3 cells against TRAIL-induced
43
44 apoptosis. Moreover, BIO eliminated the protective effect of Rat2Wnt1 feeders and it
45
46 even enhanced the overall efficacy of TRAIL-induced apoptosis (Fig. 3B). The inactive
47
48 analog MetBIO had only a minor effect on the anti-apoptotic signaling of Rat2Wnt1
49
50 fibroblasts (Fig. 3B). RT-qPCR analysis of the effect of selected treatments on the
51
52 expression of Wnt target genes and TRAIL receptors revealed that both LWnt3a medium
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 and BIO affected expression of *c-myb* and *myc* genes in KM3 cells in a similar way as
5
6 did Rat2Wnt1 feeders (Fig. 3.C). However, in a sharp contrast to Rat2Wnt1 feeders none
7
8 of these treatments was reflected in suppression of the TRAIL receptor DR4 and DR5
9
10 expression. Thus, apparently, the activation of the canonical Wnt signaling pathway
11
12 provides only a partial protection against TRAIL-induced apoptosis to KM3 cells and
13
14 additional factor(s) produced specifically by Wnt1- or Wnt3a-transformed fibroblasts are
15
16 required for a more efficient anti-apoptotic protection of KM3 cells, i.e. for example for
17
18 the downregulation of the DR4/DR5 receptors. This conclusion was further supported
19
20 experimentally using TRAIL-sensitive B cell line Ramos (Burkitt lymphoma). Co-
21
22 cultivation of these cells on Rat2Wnt1 fibroblasts induced accumulation of β -catenin
23
24 (Fig. 4.A). However, in contrast to KM3, neither Rat2Wnt1 nor Rat2Wnt3a feeder cells
25
26 protected Ramos cells against TRAIL-induced apoptosis (Fig. 4.B and not shown).
27
28 Additionally, the downregulation of DR4/DR5 expression was not detected in Ramos
29
30 cells incubated with Rat2Wnt1 or Rat2Wnt3a feeders (not shown). Taken together, these
31
32 results indicate that: (1) activation of canonical Wnt signaling *per se* is not sufficient to
33
34 inhibit the TRAIL-induced apoptosis; (2) co-stimulatory, anti-apoptotic signals
35
36 originating from Rat2Wnt1/Wnt3a fibroblasts are not possibly relayed to Ramos cells.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Rat2Wnt1 fibroblasts protect KM3 cells against TRAIL-induced apoptosis via** 49 50 **MEK1/ERK-dependent signaling**

51
52 The Wnt ligands can, under certain conditions, trigger activation of MEK1/ERK1/2 and
53
54 PI3K/Akt signaling. These signaling pathways are also implicated in inhibiting apoptosis
55
56 induced by various stimuli (34, 35). Therefore, we examined whether these signaling
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 pathways could also participate in the Wnt-mediated protection of KM3 cells against
5
6 TRAIL-induced apoptosis. Co-cultivation of KM3 cells on Rat2Wnt1 feeders did not
7
8 result in an observable phosphorylation of ERK or Akt kinases (not shown). However,
9
10 pre-treatment of KM3 cells cultivated on Rat2 or Rat2Wnt1 feeder cells with MEK1
11
12 inhibitor PD-98059 strongly suppressed Wnt1-related protection of KM3 cells against
13
14 TRAIL (Fig. 5) although it did not inhibit Rat2Wnt1-induced stabilization of β -catenin
15
16 (not shown). In contrast, wortmannin, an inhibitor of PI3-kinase, only marginally
17
18 attenuated the anti-apoptotic effect of Rat2Wnt1 feeder cells (Fig. 5). Neither PD98059
19
20 nor wortmanin had an adversary effect on Rat2Wnt1-induced changes in c-myc or DR5
21
22 expression (not shown). This implicates that in addition to Rat2Wnt1-related changes in
23
24 the expression of the proapoptotic DR4 and DR5 receptors (Figs. 1B and 2),
25
26 MEK1/ERK-mediated modifications of the TRAIL signaling pathway could be involved
27
28 in the regulation of TRAIL-induced apoptosis of KM3 cells.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **DISCUSSION**
5

6 Wnt signaling is essential for pre-B-cell proliferation and survival and also participates in
7 the augmentation of proliferation and survival of B cell chronic leukemias (10, 36). Initial
8 screening of a panel of human hematopoietic TRAIL-sensitive cell lines revealed an
9 unequal response to the apoptosis-modulating effect of Wnt1-transformed Rat2
10 fibroblasts. In the co-cultivation experiments the Rat2Wnt1 fibroblasts attenuated
11 TRAIL-induced apoptosis of several T- and B-cell-derived cell lines but not cells of the
12 myeloid or NK origin. This observation is in agreement with the proposed role of Wnt
13 signaling in the regulation of B- a T-cell survival (9, 10).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 The canonical, i.e. TCF/ β -catenin-dependent, Wnt pathway mediates the anti-
27 apoptotic signaling in Rat-1 fibroblasts, osteoblasts and rat intestinal RIE cells (12, 38,
28 39). There are partly conflicting data about the Wnt-mediated activation of anti-apoptotic
29 proteins Bcl-2 and Bcl-XL. Wnt1 expression does not stimulate expression of Bcl-
30 2/Bcl-XL in RIE cells, but it was reported that Wnt3a upregulates the Bcl-2 production
31 in osteoblasts (12, 39). Our quantitative real-time PCR analysis of mRNA isolated from
32 Rat2Wnt1-stimulated KM3 cells does not support apparent Wnt-mediated upregulation of
33 Bcl-2 or BclXL expression. Moreover, although c-Myc was described as a direct target
34 gene of the canonical Wnt pathway in colorectal cells (40), we reproducibly observed
35 downregulation of this gene in KM3 cells stimulated with Rat2Wnt1 fibroblasts, GSK3 β
36 inhibitor BIO or with LWnt3a-conditioned medium (see Figs. 2 and 3). Nevertheless,
37 expression of another Wnt-responsive gene, *c-myb* (40), was elevated in KM3 cells
38 primed by various Wnt signaling-related stimuli (Rat2Wnt1/Wnt3a, L-Wnt3a cells,
39 recombinant Wnt, BIO, etc.; Fig. 3C and data not shown). Myc expression enhanced
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 TRAIL-induced apoptosis in kidney epithelial cells HA1E via upregulation of the DR5
5
6 receptor (41) and, consequently, its downregulation in KM3 cell could be anti-apoptotic.
7
8 We further observed suppression of DR4 and DR5 expression at both mRNA and protein
9
10 levels in Rat2Wnt1-treated KM3 cells (see Figs. 1C and 2). The decrease in the
11
12 expression of the TRAIL receptors suggests that the block of TRAIL-induced apoptosis
13
14 occurs at the proximal stage of TRAIL signaling, especially at the DISC level. Indeed, we
15
16 detected very weak activation of the DISC caspase-8 and negligible processing of its
17
18 downstream effector Bid (Fig. 1B). However, a residual caspase-8 activity led most
19
20 probably to direct caspase-3 activation and to the cleavage of its downstream substrates
21
22 PARP and cFlip.
23
24
25
26
27

28
29 Recombinant Wnt3a or Wnt1- and Wnt3a-enriched medium were shown to
30
31 suppress serum withdrawal-induced apoptosis of fibroblasts, preadipocytes and
32
33 osteoblasts (12-14). Our extensive analysis of Rat2-independent Wnt signaling provided
34
35 us with several ambiguous and surprising results. Recombinant Wnt3a, Wnt3a-enriched
36
37 medium or mouse L fibroblast-expressing Wnt3a were, despite effective activation of
38
39 Wnt signaling in target KM3 cells, approximately 2-3-fold less efficient inhibitors of
40
41 TRAIL-induced apoptosis than Rat2 fibroblasts expressing Wnt1 or Wnt3a. In contrast,
42
43 a shortcut activator of Wnt signaling, GSK3 β inhibitor BIO, completely abrogated the
44
45 anti-apoptotic effect of RatWnt1 fibroblasts; thus, presumably, the GSK3 β activity is
46
47 antiapoptotic in KM3 cells. This conclusion is supported by observations that deletion
48
49 of *GSK3 β* or inhibition of its function enhances TNF α - or TRAIL-induced apoptosis of
50
51 mouse embryonic fibroblasts or prostate cancer cells (42, 43). A comparison of the
52
53 Rat2Wnt-1 action on two different B-cell derived cell lines, i.e. KM3 (pre-B ALL) and
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Ramos (Burkit lymphoma), revealed a further unexpected finding. Although we detected
5
6 increased levels of the β -catenin protein in both cell lines upon stimulation with the
7
8 Rat2Wnt-1 feeder cells, only KM3 cells gained the resistance to TRAIL-induced
9
10 apoptosis. Furthermore, a subsequent RT-qPCR analysis did not show any decrease in
11
12 transcriptional levels of proapoptotic TRAIL receptors DR4 and DR5 in Ramos cells
13
14 (Fig. 4.C and data not shown). These results clearly suggest that activation of canonical
15
16 Wnt signaling is not sufficient to inhibit the TRAIL-induced apoptosis. We further
17
18 hypothesized that putative co-stimulatory, anti-apoptotic signals originating from
19
20 Rat2Wnt1 fibroblasts were possibly relayed to KM3 pre-B cells and not to more
21
22 advanced Ramos cells. Conditioned media harvested from Rat2Wnt1/Wnt3a cells cannot
23
24 provide the apoptotic resistance to TRAIL in KM3 cells and the presence of the feeder
25
26 cells in mixed cultures is essential for the full inhibition of TRAIL-induced apoptosis
27
28 (data not shown). Thus, we presume that Wnt-transformed Rat2 fibroblasts (which
29
30 respond to the Wnt signals – see ref. 31) express an identified anti-apoptotic, membrane
31
32 or extracellular matrix-associated factor. One of the potential candidates might be the
33
34 Wnt1-activated, secreted and extracellular matrix-associated protein WISP-1 (45). As
35
36 WISP-1 inhibits p53- and myc-induced apoptosis (39, 46), it could also participate by
37
38 an unknown mechanism in repressing TRAIL-induced apoptosis of KM3 cells.
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 Interestingly, the Wnt ligands activate antiapoptotic MEK/ERK- and PI3K/Akt-
49
50 related cascades in fibroblasts and osteoblasts (12, 44). Both ERK and Akt mediated
51
52 signaling were reported to be inhibitory for TRAIL-induced apoptosis of various tumor
53
54 cells (27, 29), nevertheless, only PD-98059-mediated inhibition of the ERK signaling
55
56 pathway but not the suppression of PI3K by wortmannin countered Rat2Wnt1-induced
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 anti-apoptotic signaling in KM3 cells. Thus, apparently, PI3K/Akt signaling is not
5
6 essential as a provider of anti-apoptotic signaling in KM3 cells.
7
8

9 The results presented in this study indicate that in one cell type, Wnt-signaling
10 can trigger a molecular response that might effectively influence the behavior of the “by-
11 standing” cell. Unraveling the molecular mechanisms of anti-apoptotic action of the Wnt
12 pathway would not only enhance our present knowledge about the way how cells
13 communicate, but could possibly be useful in setting up anti-tumor drug treatment
14 strategies.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 **CONCLUSION**

27
28 In this communication we show that Wnt1 or Wnt3a can both directly and indirectly
29 suppress TRAIL-induced apoptosis of several hematopoietic cell lines. This signaling
30 attenuates apoptosis of both pre-T and pre-B-derived cell lines but not cells of myeloid
31 origin. The most efficient anti-apoptotic signaling originates from Wnt1-transformed
32 Rat2 fibroblasts and apparently is composed of direct Wnt-induced signaling in the target
33 hematopoietic cells and of indirect signaling transduced by an unknown signaling
34 mechanism from Wnt-transformed Rat2 fibroblasts but not similarly transformed murine
35 L cells. This combined effect leads to the downregulation of TRAIL receptor expression
36 both at mRNA and protein levels and to inefficient caspase-8 and Bid processing.
37
38 Rat2Wnt-mediated anti-apoptotic signaling towards responsive cells is partially
39 suppressed through the inhibition of MEK1/ERK signaling but not via the PI3K/Akt
40 pathway. This combined anti-apoptotic effect of certain Wnt1- or Wnt3a-expressing cells
41 might be one of the reasons for an enhanced survival of hematopoietic malignancies.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Brivanlou for providing us with GSK3 β inhibitor BIO. We thank S. Takacova and J. Lukas for critically reading the manuscript. This work was supported by the GACR grant 312/99/0348 (V.K.), Center of Molecular and Cellular Immunology (1M6837805001), and in part by the institutional grant (AV0Z50520514).

1
2
3
4
5
6
7 **TABLES AND FIGURES**
8

9 **Table 1. Rat2Wnt1-mediated suppression of TRAIL-induced apoptosis of selected**
10 **hematopoietic cell lines.**
11

12 Hematopoietic cells (10^6 /well of 12-well plate) were grown either without feeder cells
13 (plastic) or co-cultivated on the cushion of Rat2MV7 or Rat2Wnt1 fibroblasts for 8 hrs,
14 and then TRAIL was added to the concentration of 200 ng/ml and the cultivation
15 continued for another 15 hrs. Cells were gently released from the feeder fibroblasts by
16 pipetting, stained with propidium iodide and the portion of dead, PI-positive cells was
17 determined by flow cytometry.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28
29
30
31 **Table 2. Co-cultivation of pre-B KM3 cells on feeder cells marginally inhibits their**
32 **proliferation.**
33

34 KM3 cells were cultivated without feeder cells (plastic) and on Rat2MV7 or Rat2Wnt1,
35 L_{TK}^- and $LWnt3a$ fibroblasts for 8 hours, then [3H]thymidine was added and cells were
36 cultivated for another 18 hours before harvesting. The incorporation of [3H]thymidine
37 was quantified by liquid scintillation.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Figure 1. Rat2Wnt1 feeder cells suppress cell surface expression of TRAIL**
49 **receptors and processing of caspase-8 and Bid in KM3 cells.**
50

51 KM3 and ML-1 cells were cultivated for 8 hours on feeder Rat2MV7 or Rat2Wnt1
52 fibroblasts and then with TRAIL (200 ng/ml) for additional 15 hrs. Cells were gently
53 harvested by pipetting and analyzed for apoptosis using propidium iodide staining (A) or
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63

1
2
3
4 for the cell surface expression of TRAIL receptors DR4 and DR5 (**B**) by flow cytometry.
5
6 **C**, Western blots of total cell lysates prepared from KM3 cells grown on Rat2MV7 or
7 Rat2Wnt1 fibroblasts for 6 hrs and subsequently incubated with TRAIL as indicated. α -
8 tubulin: a loading control. Arrows show cleaved forms of c-Flip, caspase-8, Bid, caspase-
9 3 and polyadenylate ribose polymerase (PARP).
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 **Figure 2. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of Rat2Wnt1-induced**
20 **changes of gene expression in KM3 cells**

21
22
23 KM3 cells were cultivated on Rat2MV7 or Rat2Wnt1 cells for 8 hrs and TRISOL-
24 purified RNAs were analyzed by RT-qPCR. Colors indicate the ratio of transcript
25 abundance according to color bar scale. Normalizations across samples were performed
26 using geometric average of constitutive gene expression of *SDHA*. Diagram shows
27 relative expression profiles of selected genes involved in the regulation of apoptosis and
28 cell cycle (based on *SDHA*-normalized median ratios of three repeats) in Rat2Wnt1-
29 versus Rat2MV7-treated KM3 cells.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **Figure 3. Diverse effects of various feeder cells and other reagents on β -catenin**
44 **stabilization and TRAIL-induced apoptosis of KM3 cells.**

45
46
47 **A**, KM3 cells were incubated on different feeder cells (Rat2 or mouse L fibroblasts), with
48 the conditioned medium (CM), with recombinant Wnt3a (50 ng/ml) or Wnt5a (0.5 μ g/ml)
49 and with BIO (2 μ M) and MetBIO (2 μ M), respectively. After 8 hrs the cells were
50 harvested and lysed. The total cell lysates were analyzed by Western blotting using anti-
51 β -catenin or anti- α -tubulin (loading control) antibody. **B**, KM3 cells were pre-incubated
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 with the feeder cells, recombinant ligands/conditioned media, or GSK3 β inhibitors for 8
5
6 hrs and then treated with recombinant TRAIL (200 ng/ml) for additional 12 hrs. TRAIL-
7
8 induced apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC surface staining and flow
9
10 cytometry. C, KM3 cells were treated as in A with the indicated agents and purified RNA
11
12 was analyzed by RT-qPCR as described in Fig. 2A.
13
14
15
16
17
18

19 **Figure 4. B cell-derived cell lines KM3 and Ramos differ in their response to**
20 **Rat2Wnt1 fibroblasts.**
21
22

23
24 KM3 or Ramos cells were cultivated either on Rat2MV7 or Rat2Wnt1 for 8 hours, and
25
26 then were either analyzed for β -catenin levels using Western blotting of the whole cell
27
28 lysates (A) or for TRAIL-induced apoptosis (B) (Annexin V-FITC staining/flow
29
30 cytometry).
31
32
33
34
35

36 **Figure 5. MEK1 inhibitor PD98059 attenuates the antiapoptotic effect of RatWnt1**
37 **on KM3 cells.**
38
39

40
41 KM3 cells were treated as indicated in Fig.1. Ninety minutes before TRAIL addition,
42
43 PD98059 or wortmannin were added to the final concentration of 50 μ M and 1 μ M,
44
45 respectively. The cells were grown for additional 15 hrs. Cells were stained for Annexin
46
47 V-FITC and analyzed by flow cytometry.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **Table 1**
5
6

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Cell line	Origin	Propidium iodide-positive cells			
		<i>Untreated cells</i>	<i>Plastic dish</i>	<i>Rat2MV7</i>	<i>Rat2Wnt1</i>
KM3	pre-B cell	3 ± 2	43 ± 3	53 ± 4	4 ± 1
REH	pre-B cell	2 ± 2	42 ± 4	49 ± 3	3 ± 2
ML-1	myeloid	3 ± 1	53 ± 3	48 ± 2	43 ± 3
HL-60	myeloid	5 ± 2	34 ± 3	31 ± 5	35 ± 3
THP-1	myeloid	2 ± 1	25 ± 2	30 ± 3	23 ± 4
Jurkat	T cell	3 ± 1	43 ± 4	41 ± 3	23 ± 2
CEM	T cell	5 ± 2	70 ± 4	73 ± 3	43 ± 3
Molt-4	T cell	4 ± 2	46 ± 4	21 ± 2	7 ± 2
NK 3.3	NK cell	4 ± 1	38 ± 3	54 ± 4	46 ± 3
TF-1	erythromyeloid	3 ± 2	54 ± 4	43 ± 3	39 ± 3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 2

KM3 on	Relative proliferation (%)
plast	100±14
Rat2MV7	93,2±8,2
Rat2Wnt1	77,8±4
Rat2Wnt3a	77,4±20,4
L _{TK} -	74,2±15,1
LWnt3a	77,3±11,8

1
2
3
4 **REFERENCES**
5

- 6
7 1. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005; 15: 28-32.
8
9 2. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434:
10 843-850.
11
12 3. Moon RT. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* 2005; 2005: cm1.
13
14 4. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006
15 119: 395-402.
16
17 5. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors and
18 multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006; 281: 22429-22433.
19
20 6. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent
21 pathways. *Cell Calcium* 2005; 38: 439-446.
22
23 7. Staal FJ, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT
24 situation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 21-30.
25
26 8. Gounari F, Aifantis I, Khazaie K, et al. Somatic activation of beta-catenin
27 bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat*
28 *Immunol* 2001; 2: 863-869.
29
30 9. Ioannidis V, Beermann F, Clevers H, Held, W. The beta-catenin--TCF-1 pathway
31 ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol* 2001; 2: 691-697.
32
33 10. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte
34 proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 2000; 13: 15-24.
35
36 11. Dosen G, Tenstad E, Nygren MK, Stubberud H, Funderud S, Rian E. Wnt
37 expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis.
38 *BMC Immunol* 2006; 7: 13.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
12. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem* 2005; 280: 41342-41351.
 13. Longo KA, Kennell JA, Ochocinska MJ, Ross SE, Wright WS, MacDougald O. A. Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *J Biol Chem* 2002; 277: 38239-38244.
 14. Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, et al. Wnt/beta-catenin signaling suppresses apoptosis in low serum medium and induces morphologic change in rodent fibroblasts. *Int J Cancer* 2002; 99: 681-688.
 15. Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 2005 24: 2410-2420.
 16. Grotewold L, Ruther U. The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* 2002; 21: 966-975.
 17. He B, You L, Uematsu K, et al. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia* 2004; 6: 7-14.
 18. You L, He B, Xu Z, et al. An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res* 2004; 64: 5385-5389.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
19. Fas SC, Fritzsching B, Suri-Payer E, Krammer PH. Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmun* 2006 9: 1-17.
 20. Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Takada Y, Aggarwal BB. Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 482-496.
 21. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004; 16: 139-144.
 22. Bouralexis S, Findlay DM, Evdokiou A. Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis* 2005; 10: 35-51.
 23. Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 2004; 14: 359-372.
 24. Duiker EW, Mom CH, de Jong S, et al. The clinical trail of TRAIL. *Eur J Cancer* 2006; 2: 2233-2240.
 25. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481-490.
 26. Harper N, Hughes MA, Farrow SN, Cohen GM, MacFarlane M. Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 44338-44347.
 27. Nesterov A, Lu X, Johnson M, Miller GJ, Ivashchenko Y, Kraft AS. Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 10767-10774.

- 1
2
3
4 28. Ortiz-Ferron G, Tait SW, Robledo G, de Vries E, Borst J, Lopez-Rivas A. The
5 mitogen-activated protein kinase pathway can inhibit TRAIL-induced apoptosis
6 by prohibiting association of truncated Bid with mitochondria. *Cell Death Differ*
7 2006; 13:1857-1865.
8
9
10
11
12
13
14 29. Soderstrom TS, Poukkula M, Holmstrom TH, Heiskanen KM, Eriksson JE.
15 Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in
16 activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the
17 mitochondrial amplification loop and caspase-8. *J Immunol* 2002; 169: 2851-
18 2860.
19
20
21
22
23
24
25
26 30. Wang G, Ahmad KA, Ahmed K. Modulation of death receptor-mediated
27 apoptosis by CK2. *Mol Cell Biochem* 2005; 274: 201-205.
28
29
30
31 31. Jue SF, Bradley RS, Rudnicki JA, Varmus HE, and Brown AM. The mouse Wnt-
32 1 gene can act via a paracrine mechanism in transformation of mammary
33 epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 321-328.
34
35
36
37
38 32. He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC
39 pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512.
40
41
42
43 33. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of
44 pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt
45 signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; 10: 55-
46 63.
47
48
49
50
51
52
53 34. Cheng JQ, Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV. The Akt/PKB
54 pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* 2005; 24: 7482-
55 7492.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
35. Panka DJ, Atkins MB, Mier JW. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2371s-2375s.
 36. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, et al. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3118-3123.
 37. Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudikoff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 2003; 22: 1536-1545.
 38. Chen S, Guttridge DC, You Z, et al. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol* 2001; 152: 87-96.
 39. You Z, Saims D, Chen S, et al. Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2002; 157: 429-440.
 40. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002; 111: 241-250.
 41. Rottmann S, Wang Y, Nasoff M, Deveraux QL, Quon KC. A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 15195-15200.
 42. Liao X, Zhang L, Thrasher JB, Du J, Li B. Glycogen synthase kinase-3beta suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1215-1222.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 43. Takada Y, Fang X, Jamaluddin MS, Boyd DD, Aggarwal BB. Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3beta abrogates activation of IkappaBalpha kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 2004; 279: 39541-39554.
- 44. Yun MS, Kim SE, Jeon SH, Lee JS, Choi KY. Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J Cell Sci* 2005; 118: 313-322.
- 45. Xu L, Corcoran RB, Welsh JW, Pennica D, Levine AJ. WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev* 2000; 14: 585-595.
- 46. Su F, Overholtzer M, Besser D, Levine AJ. WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase. *Genes Dev* 2002; 16: 46-57.

Table 1

Cell line	Origin	Propidium iodide-positive cells			
		<i>Untreated cells</i>	<i>Plastic dish</i>	<i>Rat2MV7</i>	<i>Rat2Wnt1</i>
KM3	pre-B cell	3 ± 2	43 ± 3	53 ± 4	4 ± 1
REH	pre-B cell	2 ± 2	42 ± 4	49 ± 3	3 ± 2
ML-1	myeloid	3 ± 1	53 ± 3	48 ± 2	43 ± 3
HL-60	myeloid	5 ± 2	34 ± 3	31 ± 5	35 ± 3
THP-1	myeloid	2 ± 1	25 ± 2	30 ± 3	23 ± 4
Jurkat	T cell	3 ± 1	43 ± 4	41 ± 3	23 ± 2
CEM	T cell	5 ± 2	70 ± 4	73 ± 3	43 ± 3
Molt-4	T cell	4 ± 2	46 ± 4	21 ± 2	7 ± 2
NK 3.3	NK cell	4 ± 1	38 ± 3	54 ± 4	46 ± 3
TF-1	erythromyeloid	3 ± 2	54 ± 4	43 ± 3	39 ± 3

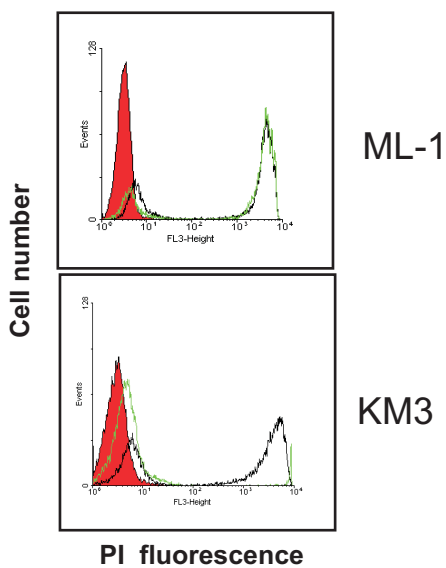
Table 2

KM3 on	Relative proliferation (%)
plast	100±14
Rat2MV7	93,2±8,2
Rat2Wnt1	77,8±4
Rat2Wnt3a	77,4±20,4
L _{TK-}	74,2±15,1
LWnt3a	77,3±11,8

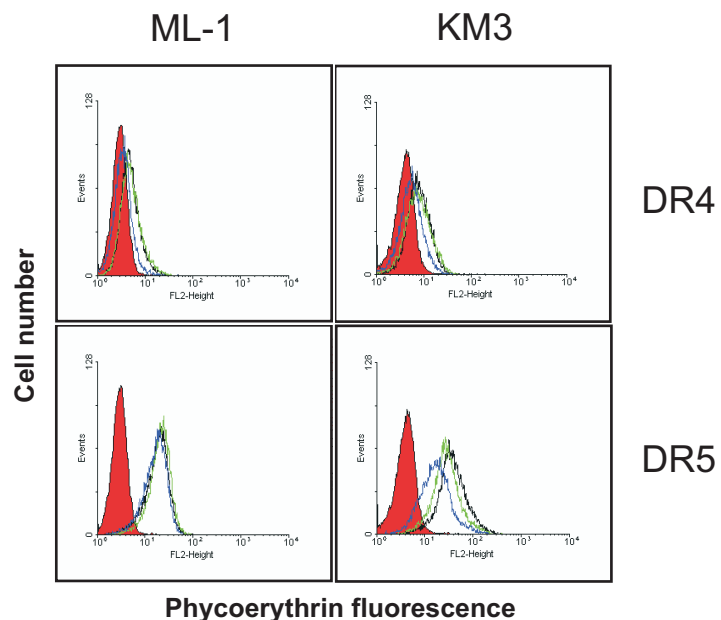
Figure

[Click here to download Figure: Figure 1.eps](#)

Figure 1A



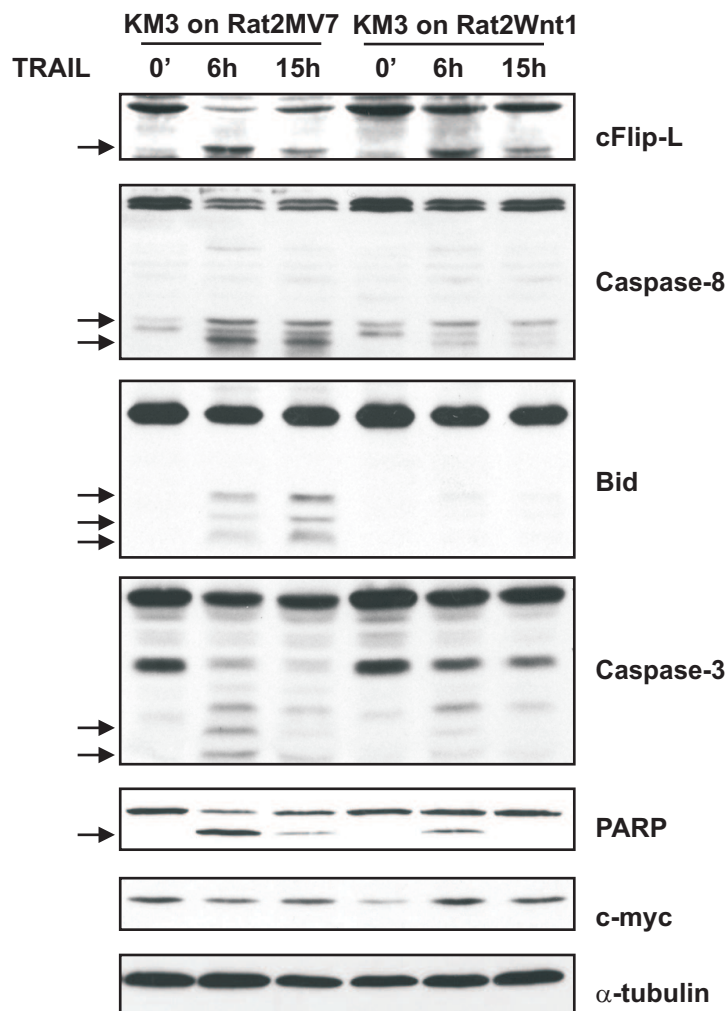
1B



— Untreated
 — Cells on Rat2MV7 + TRAIL
 — Cells on Rat2Wnt1 + TRAIL

— GAM-PE
 — Cells on plast
 — Cells on Rat2MV7
 — Cells on Rat2Wnt1

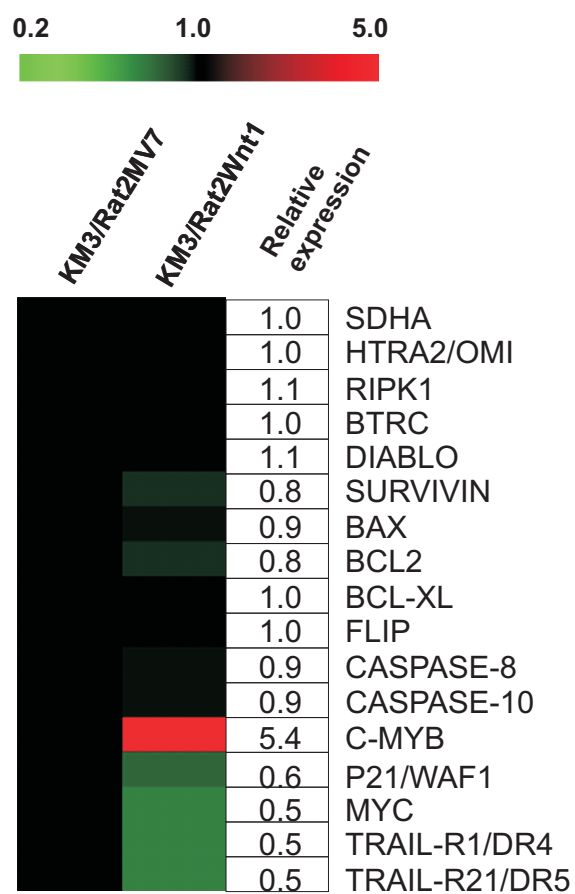
1C



Figure

[Click here to download Figure: Figure 2.eps](#)

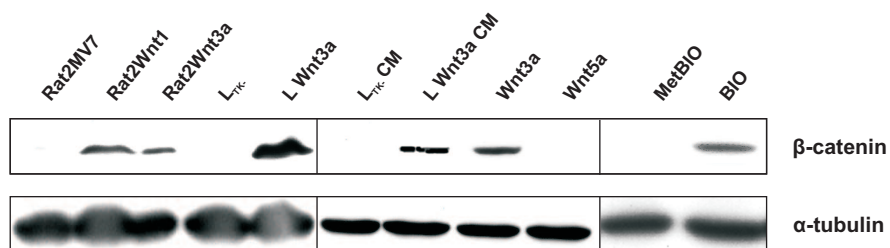
Figure 2



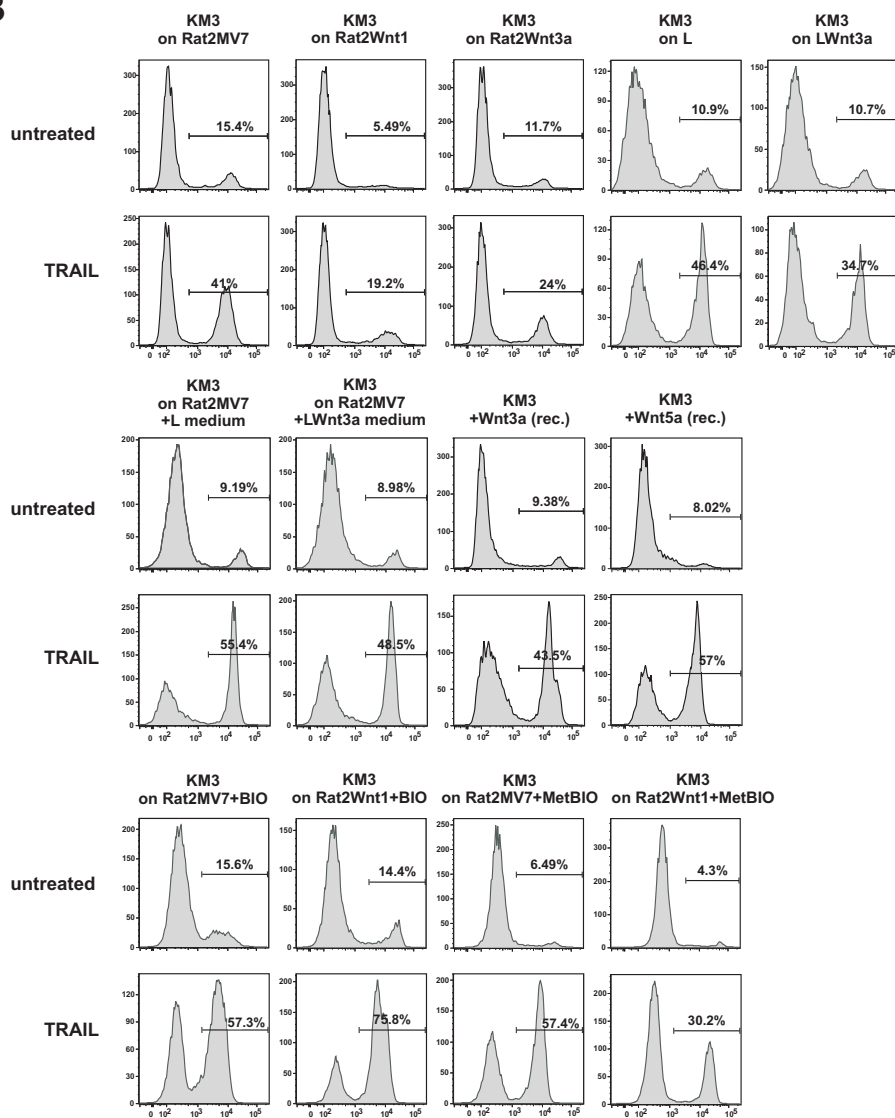
Figure

[Click here to download Figure: Figure 3.eps](#)

Figure 3A



3B



3C

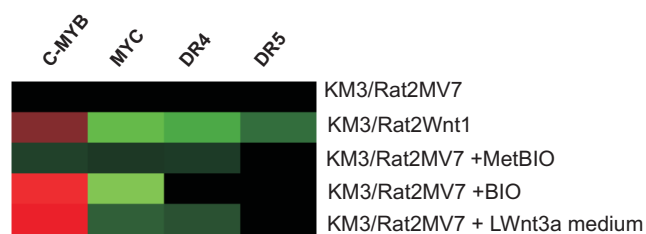
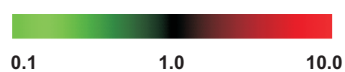
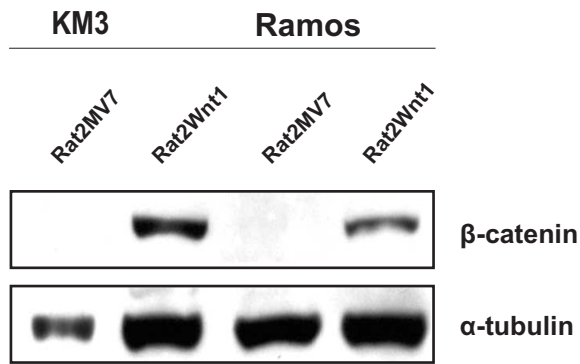


Figure 4A



4B

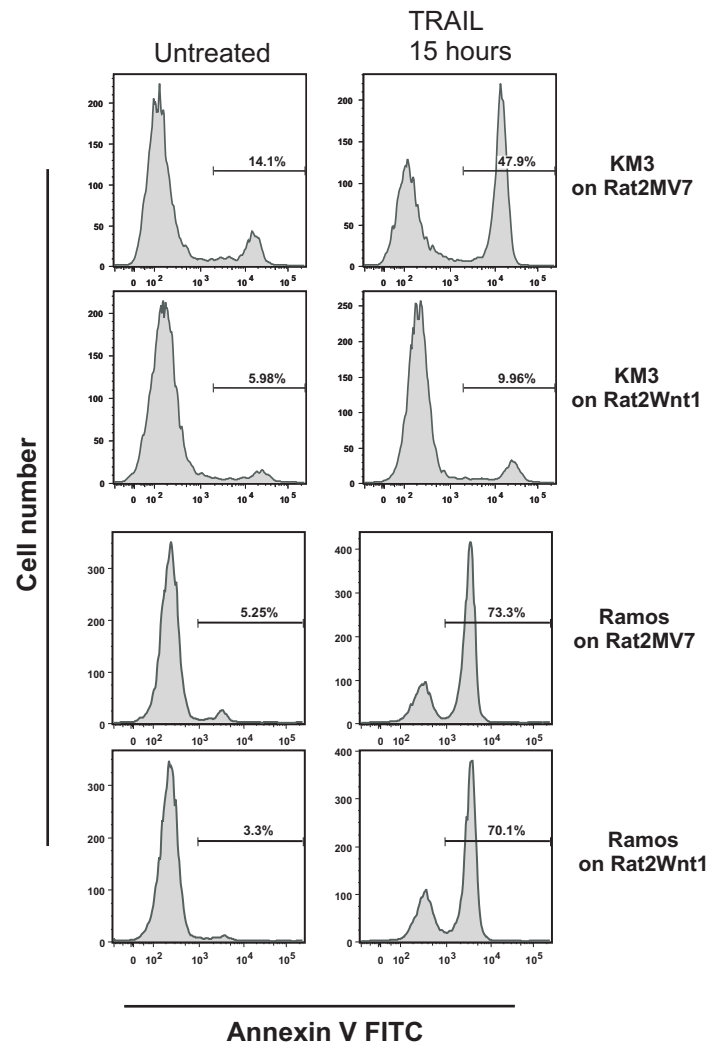
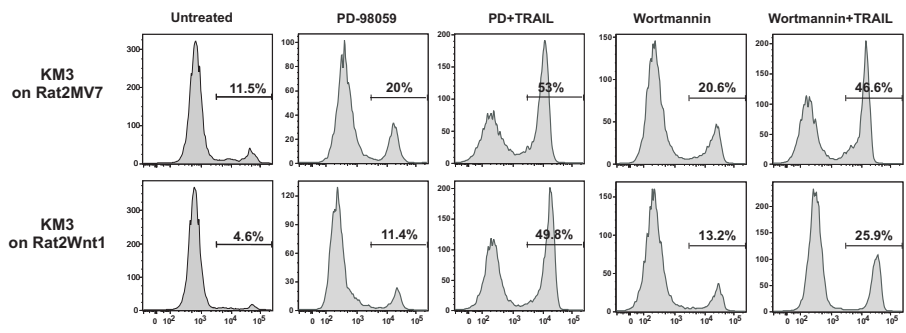


Figure 5



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4 ZÁVĚR

Cílem předkládané práce bylo přispět k poznání mechanismů, které ovlivňují aktivitu signalizace Wnt v buněčném jádře. Hlavní výsledky lze shrnout do následujících bodů:

1. Zjistili jsme, že transkripční korepresor CtBP1 má schopnost blokovat signalizaci Wnt, a to prostřednictvím inhibice transkripce cílových genů této signalizace. Represivní působení proteinu CtBP je podmíněno aktivitou s ním asociovaných histon deacetyláz.
2. Identifikovali jsme nádorový supresor HIC1 jako nový inhibitor signální dráhy Wnt. HIC1 přímo interaguje s klíčovým proteinem signalizace Wnt transkripčním faktorem TCF-4 a tato interakce je základem pro inhibičního působení proteinu HIC1. HIC1 relokuje transkripční komplexy TCF-4/ β -katenin do specifických jaderných struktur a brání tak jejich vazbě na specifické cílové promotory, čímž dochází k zablokování transkripce. Pro efektivní relokaci komplexů TCF-4/ β -katenin je důležitá strukturní funkce proteinu CtBP.
3. Nukleární recetor NHR-25 je shopen v buňkách prekurzorů gonády hlístice *Caenorhabditis elegans* interagovat s β -kateniny WRM-1 a SYS-1. Interakce s těmito β -kateniny moduluje transkripci cílových genů signalizace Wnt. Vzájemná interference mezi aktivitou signální dráhy Wnt a proteinem NHR-25 je rozhodujícím dějem, který determinuje osud somatických buněčných prekurzorů gonády. Zatímco signalizace Wnt je klíčová pro určení distálního vývoje buněk, tak NHR-25 řídí osud buněk proximálních.
4. Signální dráha Wnt má potenciál blokovat u některých hematopoietických buněčných linií apoptózu indukovanou ligandem TRAIL, zástupcem ligandů příbuzných TNF. Inhibiční působení signalizace Wnt je založeno především na snížení exprese specifických proapoptických receptorů DR4 a DR5, aditivní efekt pro inhibici apoptózy má indukce kinázové kaskády MEK1/ERK1, která rovněž blokuje apoptózu indukovanou ligandem TRAIL.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Cadigan, K.M. and R. Nusse, *Wnt signaling: a common theme in animal development*. Genes Dev, 1997. **11**(24): p. 3286-305.
2. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
3. Moon, R.T., et al., *The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1644-6.
4. Kuhl, M., *Non-canonical Wnt signaling in Xenopus: regulation of axis formation and gastrulation*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(3): p. 243-9.
5. Ciruna, B., et al., *Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 220-4.
6. Kohn, A.D. and R.T. Moon, *Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 439-46.
7. Saburi, S. and H. McNeill, *Organising cells into tissues: new roles for cell adhesion molecules in planar cell polarity*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 482-8.
8. Kusserow, A., et al., *Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone*. Nature, 2005. **433**(7022): p. 156-60.
9. Cox, R.T. and M. Peifer, *Wingless signaling: the inconvenient complexities of life*. Curr Biol, 1998. **8**(4): p. R140-4.
10. Packard, M., D. Mathew, and V. Budnik, *Wnts and TGF beta in synaptogenesis: old friends signalling at new places*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(2): p. 113-20.
11. Wang, J. and A. Wynshaw-Boris, *The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/differentiation*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(5): p. 533-9.
12. Weaver, C. and D. Kimelman, *Move it or lose it: axis specification in Xenopus*. Development, 2004. **131**(15): p. 3491-9.
13. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
14. Radtke, F., H. Clevers, and O. Riccio, *From gut homeostasis to cancer*. Curr Mol Med, 2006. **6**(3): p. 275-89.
15. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-14.
16. Moon, R.T., et al., *WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(9): p. 691-701.
17. Gregorieff, A. and H. Clevers, *Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer*. Genes Dev, 2005. **19**(8): p. 877-90.
18. Bienz, M., *beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling*. Curr Biol, 2005. **15**(2): p. R64-7.
19. Brembeck, F.H., M. Rosario, and W. Birchmeier, *Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(1): p. 51-9.
20. Xing, Y., et al., *Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex*. Genes Dev, 2003. **17**(22): p. 2753-64.
21. Lee, E., et al., *The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway*. PLoS Biol, 2003. **1**(1): p. E10.
22. Salic, A., et al., *Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in Xenopus egg extracts*. Mol Cell, 2000. **5**(3): p. 523-32.

23. Hart, M.J., et al., *Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta*. *Curr Biol*, 1998. **8**(10): p. 573-81.
24. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 7): p. 1175-86.
25. Marikawa, Y. and R.P. Elinson, *beta-TrCP is a negative regulator of Wnt/beta-catenin signaling pathway and dorsal axis formation in Xenopus embryos*. *Mech Dev*, 1998. **77**(1): p. 75-80.
26. Hart, M., et al., *The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell*. *Curr Biol*, 1999. **9**(4): p. 207-10.
27. Fuchs, S.Y., V.S. Spiegelman, and K.G. Kumar, *The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer*. *Oncogene*, 2004. **23**(11): p. 2028-36.
28. Huang, H.C. and P.S. Klein, *The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways*. *Genome Biol*, 2004. **5**(7): p. 234.
29. Pinson, K.I., et al., *An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice*. *Nature*, 2000. **407**(6803): p. 535-8.
30. Bhanot, P., et al., *A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor*. *Nature*, 1996. **382**(6588): p. 225-30.
31. Tamai, K., et al., *LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction*. *Nature*, 2000. **407**(6803): p. 530-5.
32. Lee, J.S., A. Ishimoto, and S. Yanagawa, *Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(30): p. 21464-70.
33. Wallingford, J.B. and R. Habas, *The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity*. *Development*, 2005. **132**(20): p. 4421-36.
34. Mao, J., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway*. *Mol Cell*, 2001. **7**(4): p. 801-9.
35. Brannon, M., et al., *A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus*. *Genes Dev*, 1997. **11**(18): p. 2359-70.
36. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
37. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma*. *Science*, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.
38. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. *Nature*, 1999. **398**(6726): p. 422-6.
39. Shtutman, M., et al., *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(10): p. 5522-7.
40. Mann, B., et al., *Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1603-8.
41. Willert, J., et al., *A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells*. *BMC Dev Biol*, 2002. **2**: p. 8.
42. Baker, N.E., *Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in Drosophila: the spatial distribution of a transcript in embryos*. *Embo J*, 1987. **6**(6): p. 1765-1773.
43. Cabrera, C.V., et al., *Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene*. *Cell*, 1987. **50**(4): p. 659-63.

44. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome*. Cell, 1982. **31**(1): p. 99-109.
45. van Ooyen, A. and R. Nusse, *Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact*. Cell, 1984. **39**(1): p. 233-40.
46. Nusse, R., et al., *The Wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4170-9.
47. Nusse, R., et al., *A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family*. Cell, 1991. **64**(2): p. 231.
48. Nichols, S.A., et al., *Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006.
49. Miller, J.R., *The Wnts*. Genome Biol, 2002. **3**(1): p. REVIEWS3001.
50. Miller, D.J., E.E. Ball, and U. Technau, *Cnidarians and ancestral genetic complexity in the animal kingdom*. Trends Genet, 2005. **21**(10): p. 536-9.
51. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Wnt genes*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1073-87.
52. Zecca, M., K. Basler, and G. Struhl, *Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient*. Cell, 1996. **87**(5): p. 833-44.
53. Smolich, B.D., et al., *Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(12): p. 1267-75.
54. Willert, K., et al., *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 448-52.
55. Linder, M.E. and R.J. Deschenes, *Model organisms lead the way to protein palmitoyltransferases*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 4): p. 521-6.
56. Zhai, L., D. Chaturvedi, and S. Cumberledge, *Drosophila wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33220-7.
57. Bartscherer, K., et al., *Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein*. Cell, 2006. **125**(3): p. 523-33.
58. Banziger, C., et al., *Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells*. Cell, 2006. **125**(3): p. 509-22.
59. Coudreuse, D.Y., et al., *Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells*. Science, 2006. **312**(5775): p. 921-4.
60. Prasad, B.C. and S.G. Clark, *Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in C. elegans*. Development, 2006. **133**(9): p. 1757-66.
61. Goodman, R.M., et al., *Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling*. Development, 2006. **133**(24): p. 4901-11.
62. Panakova, D., et al., *Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 58-65.
63. Eaton, S., *Release and trafficking of lipid-linked morphogens*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(1): p. 17-22.
64. Cadigan, K.M., *Regulating morphogen gradients in the Drosophila wing*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(2): p. 83-90.
65. Tsuda, M., et al., *The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in Drosophila*. Nature, 1999. **400**(6741): p. 276-80.
66. Lin, X., *Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development*. Development, 2004. **131**(24): p. 6009-21.

67. Franch-Marro, X., et al., *Glypicans shunt the Wingless signal between local signalling and further transport*. Development, 2005. **132**(4): p. 659-66.
68. Han, C., et al., *Drosophila glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc*. Development, 2005. **132**(4): p. 667-79.
69. Giraldez, A.J., R.R. Copley, and S.M. Cohen, *HSPG modification by the secreted enzyme Notum shapes the Wingless morphogen gradient*. Dev Cell, 2002. **2**(5): p. 667-76.
70. Gerlitz, O. and K. Basler, *Wingful, an extracellular feedback inhibitor of Wingless*. Genes Dev, 2002. **16**(9): p. 1055-9.
71. De Cat, B., et al., *Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling, and gastrulation movements*. J Cell Biol, 2003. **163**(3): p. 625-35.
72. Capurro, M.I., et al., *Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6245-54.
73. Song, H.H., et al., *The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2116-25.
74. Nusse, R., *Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface*. Development, 2003. **130**(22): p. 5297-305.
75. Miura, G.I. and J.E. Treisman, *Lipid modification of secreted signaling proteins*. Cell Cycle, 2006. **5**(11): p. 1184-8.
76. Kuhl, M., et al., *Antagonistic regulation of convergent extension movements in Xenopus by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling*. Mech Dev, 2001. **106**(1-2): p. 61-76.
77. Mikels, A.J. and R. Nusse, *Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context*. PLoS Biol, 2006. **4**(4): p. e115.
78. Hsieh, J.C., *Specificity of WNT-receptor interactions*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 1333-8.
79. Wang, H.Y., T. Liu, and C.C. Malbon, *Structure-function analysis of Frizzleds*. Cell Signal, 2006. **18**(7): p. 934-41.
80. Bhanot, P., et al., *Frizzled and Dfrizzled-2 function as redundant receptors for Wingless during Drosophila embryonic development*. Development, 1999. **126**(18): p. 4175-86.
81. He, X., et al., *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way*. Development, 2004. **131**(8): p. 1663-77.
82. Tamai, K., et al., *A mechanism for Wnt coreceptor activation*. Mol Cell, 2004. **13**(1): p. 149-56.
83. Hoang, B., et al., *Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 26131-7.
84. Kawano, Y. and R. Kypta, *Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2627-34.
85. Glinka, A., et al., *Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 357-62.
86. Mao, B., et al., *Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling*. Nature, 2002. **417**(6889): p. 664-7.
87. Itasaki, N., et al., *Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling*. Development, 2003. **130**(18): p. 4295-305.

88. Semenov, M., K. Tamai, and X. He, *SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 26770-5.
89. Hsieh, J.C., et al., *A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities*. Nature, 1999. **398**(6726): p. 431-6.
90. Lu, W., et al., *Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth*. Cell, 2004. **119**(1): p. 97-108.
91. Xu, Q., et al., *Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair*. Cell, 2004. **116**(6): p. 883-95.
92. Kazanskaya, O., et al., *R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis*. Dev Cell, 2004. **7**(4): p. 525-34.
93. Kim, K.A., et al., *Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium*. Science, 2005. **309**(5738): p. 1256-9.
94. Nam, J.S., et al., *Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13247-57.
95. Kemler, R., *From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion*. Trends Genet, 1993. **9**(9): p. 317-21.
96. Drees, F., et al., *Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly*. Cell, 2005. **123**(5): p. 903-15.
97. Yamada, S., et al., *Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex*. Cell, 2005. **123**(5): p. 889-901.
98. Birchmeier, W., *Cell adhesion and signal transduction in cancer. Conference on cadherins, catenins and cancer*. EMBO Rep, 2005. **6**(5): p. 413-7.
99. Peifer, M. and E. Wieschaus, *The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1167-76.
100. Peifer, M., et al., *The segment polarity gene armadillo interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation*. Development, 1991. **111**(4): p. 1029-43.
101. Molenaar, M., et al., *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. Cell, 1996. **86**(3): p. 391-9.
102. Huber, A.H., W.J. Nelson, and W.I. Weis, *Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin*. Cell, 1997. **90**(5): p. 871-82.
103. Orsulic, S. and M. Peifer, *An in vivo structure-function study of armadillo, the beta-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling*. J Cell Biol, 1996. **134**(5): p. 1283-300.
104. Hoffmans, R. and K. Basler, *Identification and in vivo role of the Armadillo-Legless interaction*. Development, 2004. **131**(17): p. 4393-400.
105. Korswagen, H.C., M.A. Herman, and H.C. Clevers, *Distinct beta-catenins mediate adhesion and signalling functions in C. elegans*. Nature, 2000. **406**(6795): p. 527-32.
106. Korswagen, H.C., *Canonical and non-canonical Wnt signaling pathways in Caenorhabditis elegans: variations on a common signaling theme*. Bioessays, 2002. **24**(9): p. 801-10.
107. Kidd, A.R., 3rd, et al., *A beta-catenin identified by functional rather than sequence criteria and its role in Wnt/MAPK signaling*. Cell, 2005. **121**(5): p. 761-72.
108. Zeng, X., et al., *A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 873-7.

109. Liu, C., et al., *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell, 2002. **108**(6): p. 837-47.
110. Park, T.J., et al., *Subcellular localization and signaling properties of dishevelled in developing vertebrate embryos*. Curr Biol, 2005. **15**(11): p. 1039-44.
111. Yamamoto, H., et al., *Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10681-4.
112. Willert, K., et al., *A Drosophila Axin homolog, Daxin, inhibits Wnt signaling*. Development, 1999. **126**(18): p. 4165-73.
113. Chia, I.V. and F. Costantini, *Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent in vivo*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4371-6.
114. Huang, J., et al., *APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9049-54.
115. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-70.
116. Brocardo, M., I.S. Nathke, and B.R. Henderson, *Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies*. EMBO Rep, 2005. **6**(2): p. 184-90.
117. Xing, Y., et al., *Crystal structure of a beta-catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 523-33.
118. Harris, T.J. and M. Peifer, *Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(5): p. 234-7.
119. Li, X., et al., *Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in Xenopus*. Embo J, 2001. **20**(15): p. 4122-31.
120. Seeling, J.M., et al., *Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A*. Science, 1999. **283**(5410): p. 2089-91.
121. Ikeda, S., et al., *GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin*. Oncogene, 2000. **19**(4): p. 537-45.
122. Cong, F., L. Schweizer, and H. Varmus, *Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP*. Development, 2004. **131**(20): p. 5103-15.
123. Holmen, S.L., et al., *Wnt-independent activation of beta-catenin mediated by a Dkk1-Fz5 fusion protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(2): p. 533-9.
124. Yamamoto, H., H. Komekado, and A. Kikuchi, *Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin*. Dev Cell, 2006. **11**(2): p. 213-23.
125. Blitzer, J.T. and R. Nusse, *A critical role for endocytosis in Wnt signaling*. BMC Cell Biol, 2006. **7**: p. 28.
126. Davidson, G., et al., *Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 867-72.
127. van Amerongen, R. and A. Berns, *Re-evaluating the role of Frat in Wnt-signal transduction*. Cell Cycle, 2005. **4**(8): p. 1065-72.
128. Katanaev, V.L., et al., *Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila*. Cell, 2005. **120**(1): p. 111-22.
129. Liu, X., J.S. Rubin, and A.R. Kimmel, *Rapid, Wnt-induced changes in GSK3beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Alpha proteins*. Curr Biol, 2005. **15**(22): p. 1989-97.
130. Ossipova, O., et al., *Distinct PAR-1 proteins function in different branches of Wnt signaling during vertebrate development*. Dev Cell, 2005. **8**(6): p. 829-41.

131. Cong, F., L. Schweizer, and H. Varmus, *Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 2000-11.
132. Hino, S., et al., *Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14066-73.
133. van de Wetering, M., et al., *Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF*. Cell, 1997. **88**(6): p. 789-99.
134. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1837-51.
135. Park, J.Y., et al., *Mutations of beta-catenin and AXIN 1 genes are a late event in human hepatocellular carcinogenesis*. Liver Int, 2005. **25**(1): p. 70-6.
136. Satoh, S., et al., *AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1*. Nat Genet, 2000. **24**(3): p. 245-50.
137. Behrens, J., *Control of beta-catenin signaling in tumor development*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **910**: p. 21-33; discussion 33-5.
138. Pinto, D. and H. Clevers, *Wnt, stem cells and cancer in the intestine*. Biol Cell, 2005. **97**(3): p. 185-96.
139. Yokoya, F., et al., *beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 1119-31.
140. Fagotto, F., U. Gluck, and B.M. Gumbiner, *Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin*. Curr Biol, 1998. **8**(4): p. 181-90.
141. Koike, M., et al., *beta-Catenin shows an overlapping sequence requirement but distinct molecular interactions for its bidirectional passage through nuclear pores*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 34038-47.
142. Stadeli, R., R. Hoffmans, and K. Basler, *Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin*. Curr Biol, 2006. **16**(10): p. R378-85.
143. Wiechens, N. and F. Fagotto, *CRMI- and Ran-independent nuclear export of beta-catenin*. Curr Biol, 2001. **11**(1): p. 18-27.
144. Cong, F. and H. Varmus, *Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2882-7.
145. Kriehhoff, E., J. Behrens, and B. Mayr, *Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 7): p. 1453-63.
146. Xiong, Y. and Y. Kotake, *No exit strategy? No problem: APC inhibits beta-catenin inside the nucleus*. Genes Dev, 2006. **20**(6): p. 637-42.
147. van Noort, M. and H. Clevers, *TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer*. Dev Biol, 2002. **244**(1): p. 1-8.
148. Galceran, J., et al., *Wnt3a-/- like phenotype and limb deficiency in Lef1(-/-)Tcf1(-/-) mice*. Genes Dev, 1999. **13**(6): p. 709-17.
149. Verbeek, S., et al., *An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation*. Nature, 1995. **374**(6517): p. 70-4.
150. Huang, Z., et al., *Transcriptional regulation of CD4 gene expression by T cell factor-1/beta-catenin pathway*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4880-7.
151. Reya, T., et al., *Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 15-24.
152. Korinek, V., et al., *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 379-83.

153. Barker, N., et al., *Restricted high level expression of Tcf-4 protein in intestinal and mammary gland epithelium*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 29-35.
154. Korinek, V., et al., *Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1248-56.
155. Merrill, B.J., et al., *Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo*. Development, 2004. **131**(2): p. 263-74.
156. Clevers, H. and M. van de Wetering, *TCF/LEF factor earn their wings*. Trends Genet, 1997. **13**(12): p. 485-9.
157. Van de Wetering, M., et al., *Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 745-52.
158. Duval, A., et al., *The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines*. Cancer Res, 2000. **60**(14): p. 3872-9.
159. Roose, J., et al., *The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors*. Nature, 1998. **395**(6702): p. 608-12.
160. Cavallo, R.A., et al., *Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity*. Nature, 1998. **395**(6702): p. 604-8.
161. Gasperowicz, M. and F. Otto, *Mammalian Groucho homologs: redundancy or specificity?* J Cell Biochem, 2005. **95**(4): p. 670-87.
162. Barker, N., et al., *The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation*. Embo J, 2001. **20**(17): p. 4935-43.
163. Hecht, A., et al., *The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates*. Embo J, 2000. **19**(8): p. 1839-50.
164. Takemaru, K.I. and R.T. Moon, *The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression*. J Cell Biol, 2000. **149**(2): p. 249-54.
165. Teo, J.L., et al., *Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12171-6.
166. Sierra, J., et al., *The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 586-600.
167. Hecht, A., et al., *Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 18017-25.
168. Mosimann, C., G. Hausmann, and K. Basler, *Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo*. Cell, 2006. **125**(2): p. 327-41.
169. Kim, S., et al., *Mediator is a transducer of Wnt/beta-catenin signaling*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14066-75.
170. Malik, S. and R.G. Roeder, *Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(5): p. 256-63.
171. Conaway, R.C., et al., *The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(5): p. 250-5.
172. Daniels, D.L. and W.I. Weis, *Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 364-71.
173. Parker, D.S., J. Jemison, and K.M. Cadigan, *Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in Drosophila*. Development, 2002. **129**(11): p. 2565-76.

174. Belenkaya, T.Y., et al., *pygopus* Encodes a nuclear protein essential for wingless/Wnt signaling. *Development*, 2002. **129**(17): p. 4089-101.
175. Hoffmans, R., R. Stadel, and K. Basler, *Pygopus and legless provide essential transcriptional coactivator functions to armadillo/beta-catenin*. *Curr Biol*, 2005. **15**(13): p. 1207-11.
176. Townsley, F.M., B. Thompson, and M. Bienz, *Pygopus residues required for its binding to Legless are critical for transcription and development*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(7): p. 5177-83.
177. Takemaru, K., et al., *Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway*. *Nature*, 2003. **422**(6934): p. 905-9.
178. Tago, K., et al., *Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein*. *Genes Dev*, 2000. **14**(14): p. 1741-9.
179. Ishitani, T., J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto, *Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(4): p. 1379-89.
180. Smit, L., et al., *Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 17232-40.
181. Wang, S. and K.A. Jones, *CK2 controls the recruitment of Wnt regulators to target genes in vivo*. *Curr Biol*, 2006. **16**(22): p. 2239-44.
182. Sachdev, S., et al., *PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies*. *Genes Dev*, 2001. **15**(23): p. 3088-103.
183. Yamamoto, H., et al., *Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4*. *Embo J*, 2003. **22**(9): p. 2047-59.
184. Spiegelman, V.S., et al., *Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor*. *Mol Cell*, 2000. **5**(5): p. 877-82.
185. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. *Science*, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.
186. Sansom, O.J., et al., *Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(31): p. 28463-7.
187. Lustig, B., et al., *Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(4): p. 1184-93.
188. Jho, E.H., et al., *Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(4): p. 1172-83.
189. Gregorieff, A., R. Grosschedl, and H. Clevers, *Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in Tcf4(-/-)/Tcf1(-/-) embryos*. *Embo J*, 2004. **23**(8): p. 1825-33.
190. Hecht, A. and M.P. Stemmler, *Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(6): p. 3776-85.
191. Schaeper, U., et al., *Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(23): p. 10467-71.
192. Katsanis, N. and E.M. Fisher, *A novel C-terminal binding protein (CTBP2) is closely related to CTBP1, an adenovirus E1A-binding protein, and maps to human chromosome 21q21.3*. *Genomics*, 1998. **47**(2): p. 294-9.

193. Chinnadurai, G., *CtBP family proteins: more than transcriptional corepressors*. Bioessays, 2003. **25**(1): p. 9-12.
194. Sundqvist, A., K. Sollerbrant, and C. Svensson, *The carboxy-terminal region of adenovirus E1A activates transcription through targeting of a C-terminal binding protein-histone deacetylase complex*. FEBS Lett, 1998. **429**(2): p. 183-8.
195. Subramanian, T. and G. Chinnadurai, *Association of class I histone deacetylases with transcriptional corepressor CtBP*. FEBS Lett, 2003. **540**(1-3): p. 255-8.
196. Srinivasan, L. and M.L. Atchison, *YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP*. Genes Dev, 2004. **18**(21): p. 2596-601.
197. Kim, J.H., et al., *CtBP represses p300-mediated transcriptional activation by direct association with its bromodomain*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 423-8.
198. Furusawa, T., et al., *Identification of CtBP1 and CtBP2 as corepressors of zinc finger-homeodomain factor deltaEF1*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8581-90.
199. Brannon, M., et al., *XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout Xenopus development*. Development, 1999. **126**(14): p. 3159-70.
200. Houston, D.W., et al., *Repression of organizer genes in dorsal and ventral Xenopus cells mediated by maternal XTcf3*. Development, 2002. **129**(17): p. 4015-25.
201. Merrill, B.J., et al., *Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin*. Genes Dev, 2001. **15**(13): p. 1688-705.
202. Hamada, F. and M. Bienz, *The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear beta-catenin from TCF*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 677-85.
203. Cuilliere-Dartigues, P., et al., *TCF-4 isoforms absent in TCF-4 mutated MSI-H colorectal cancer cells colocalize with nuclear CtBP and repress TCF-4-mediated transcription*. Oncogene, 2006. **25**(32): p. 4441-8.
204. Fang, M., et al., *C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in Drosophila*. Embo J, 2006. **25**(12): p. 2735-45.
205. Barnes, C.J., et al., *Functional inactivation of a transcriptional corepressor by a signaling kinase*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(8): p. 622-8.
206. Lin, X., et al., *Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1389-96.
207. Kagey, M.H., T.A. Melhuish, and D. Wotton, *The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3*. Cell, 2003. **113**(1): p. 127-37.
208. Riefler, G.M. and B.L. Firestein, *Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxyl-terminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 48262-8.
209. Deltour, S., et al., *The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4890-901.
210. Fujii, H., et al., *Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer*. Oncogene, 1998. **16**(16): p. 2159-64.
211. Deltour, S., et al., *The carboxy-terminal end of the candidate tumor suppressor gene HIC-1 is phylogenetically conserved*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1443**(1-2): p. 230-2.
212. Pinte, S., et al., *The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38313-24.
213. Chen, W.Y., et al., *Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors*. Nat Genet, 2003. **33**(2): p. 197-202.

214. Carter, M.G., 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**(3): p. 413-9.
215. Chen, W., et al., *Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis.* Cancer Cell, 2004. **6**(4): p. 387-98.
216. Chen, W.Y., et al., *Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses.* Cell, 2005. **123**(3): p. 437-48.
217. Wales, M.M., et al., *p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3.* Nat Med, 1995. **1**(6): p. 570-7.
218. Britschgi, C., et al., *Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1.* Oncogene, 2006. **25**(14): p. 2030-9.
219. Roegiers, F. and Y.N. Jan, *Asymmetric cell division.* Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(2): p. 195-205.
220. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer.* Nature, 2006. **441**(7097): p. 1068-74.
221. Kimble, J.E. and J.G. White, *On the control of germ cell development in Caenorhabditis elegans.* Dev Biol, 1981. **81**(2): p. 208-19.
222. Hubbard, E.J. and D. Greenstein, *The Caenorhabditis elegans gonad: a test tube for cell and developmental biology.* Dev Dyn, 2000. **218**(1): p. 2-22.
223. Siegfried, K.R., et al., *The sys-1 and sys-3 genes cooperate with Wnt signaling to establish the proximal-distal axis of the Caenorhabditis elegans gonad.* Genetics, 2004. **166**(1): p. 171-86.
224. Lo, M.C., et al., *Phosphorylation by the beta-catenin/MAPK complex promotes 14-3-3-mediated nuclear export of TCF/POP-1 in signal-responsive cells in C. elegans.* Cell, 2004. **117**(1): p. 95-106.
225. Botrugno, O.A., et al., *Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation.* Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 499-509.
226. Hossain, A. and G.F. Saunders, *Synergistic cooperation between the beta-catenin signaling pathway and steroidogenic factor 1 in the activation of the Mullerian inhibiting substance type II receptor.* J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26511-6.
227. Gummow, B.M., J.N. Winnay, and G.D. Hammer, *Convergence of Wnt signaling and steroidogenic factor-1 (SF-1) on transcription of the rat inhibin alpha gene.* J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26572-9.
228. Mizusaki, H., et al., *Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad.* Mol Endocrinol, 2003. **17**(4): p. 507-19.
229. Mulholland, D.J., et al., *Functional localization and competition between the androgen receptor and T-cell factor for nuclear beta-catenin: a means for inhibition of the Tcf signaling axis.* Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5602-13.
230. Yang, X., et al., *Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells.* Oncogene, 2006. **25**(24): p. 3436-44.
231. Terry, S., et al., *Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer.* J Cell Biochem, 2006. **99**(2): p. 402-10.
232. Lu, D., et al., *Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3118-23.
233. Staal, F.J. and H.C. Clevers, *WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): p. 21-30.

234. Bouralexis, S., D.M. Findlay, and A. Evdokiou, *Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL*. *Apoptosis*, 2005. **10**(1): p. 35-51.
235. Fas, S.C., et al., *Death receptor signaling and its function in the immune system*. *Curr Dir Autoimmun*, 2006. **9**: p. 1-17.
236. Thorburn, A., *Death receptor-induced cell killing*. *Cell Signal*, 2004. **16**(2): p. 139-44.
237. Duiker, E.W., et al., *The clinical trail of TRAIL*. *Eur J Cancer*, 2006. **42**(14): p. 2233-40.
238. Rottmann, S., et al., *A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(42): p. 15195-200.
239. Cheng, J.Q., et al., *The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7482-92.
240. Yun, M.S., et al., *Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 2): p. 313-22.
241. Soderstrom, T.S., et al., *Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8*. *J Immunol*, 2002. **169**(6): p. 2851-60.
242. Almeida, M., et al., *Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(50): p. 41342-51.