



WNT and NOTCH: Joining Efforts to Maintain the Intestinal Homeostasis

Verónica Rodilla Benito

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Departamento de Ciencias Fisiológicas II
Facultad de Medicina
Universitat de Barcelona



“WNT AND NOTCH: JOINING EFFORTS TO MAINTAIN THE INTESTINAL HOMEOSTASIS”

Memoria presentada por Verónica Rodilla Benito
para optar al título de Doctora.

Barcelona, Marzo de 2011

Este trabajo se ha realizado bajo la dirección del Dr. Lluís Espinosa Blay y la Dra. Anna Bigas Salvans, entre el Institut d’Investigacions Biomèdiques de Bellvitge (IDIBELL) y el Institut Municipal d’Investigació Mèdica (IMIM-Hospital del Mar).

Lluís Espinosa
Director tesis

Anna Bigas
Directora tesis

Verónica Rodilla
Doctoranda

Doctorado en Biomedicina de la Universitat de Barcelona

RESUM DE LA TESI: "Wnt and Notch: joining efforts to maintain the intestinal homeostasis".

INTRODUCCIÓ

I1. La via de Wnt

La via de Wnt regula processos tan diversos com la polaritat cel·lular o la diferenciació. Tres vies diferents poden activar-se en resposta a l'activació de Wnt: la via canònica Wnt/ β -catenina, la no-canònica "Planar cell polarity" (PCP) i la via de Wnt/ Ca^{2+} . La via canònica és la millor caracteritzada.

I1.1. Membres de la família de la via de Wnt

I1.1.a Els lligands Wnt: En mamífers hi ha descrites 20 proteïnes Wnt, les quals es divideixen en 12 subfamílies. Les proteïnes Wnt són una família de glicoproteïnes secretables de 350–400 aminoàcids que es caracteritzen per tenir un nombre elevat de residus de cisteïna.

I1.1.b Els receptors de Wnt: Frizzled (FZ) i LRP5 i LRP6.

I1.1.c Els agonistes de Wnt: Norrin i R-spondin.

I1.1.d Els antagonistes de Wnt: sFRP (secreted Frizzled Related Protein), WIF-1 (Wnt-inhibitory factor 1), Cerberus, Wise/SOST i Dickkopf (DKK).

I1.2. Cascada d'activació de Wnt

I1.2.a La via canònica de Wnt: En absència de Wnt, la β -catenina es troba lliure al citoplasma, essent diana de degradació per un "complex destructor" format per APC, Axin, CKI i GSK3 β . La GSK3 β és la quinasa responsable de fosforilar la β -catenina en les serines 33-37 de l'extrem N-terminal. La β -catenina fosforilada és reconeguda per β TrCP que controla la seva ubiquitinació i degradació proteosomal. En presència de Wnt, es produeix la unió del lligand Wnt al seu receptor FZ i co-receptors LRP5/6. Aquesta interacció inhibeix el complex destructor de la β -catenina, així que aquesta s'acumula a la cèl·lula i entra al nucli on s'uneix als factors de transcripció TCF/LEF estimulants la transcripció dels seus gens diana. Quan la senyal de Wnt s'acaba, la β -catenina és exportada del nucli per APC i es degrada al citoplasma, com a conseqüència d'això, TCF torna a funcionar com a repressor.

I1.2.b Gens diana de la via canònica de Wnt: Es pot trobar el llistat actualitzat a l'adreça http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes.

I1.3. Models animals de la via de Wnt

La majoria dels ratolins *knockout* pels membres de la via de Wnt són letals embrionaris. L'ús de *knockout* condicionals i induïbles ha permès l'estudi de les funcions de Wnt durant la vida adulta. Tots aquests estudis estan

resumits a l'adreça <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/mouse>.

I2. La via de Notch

La via de Notch és una via de senyalització molt conservada que s'activa per contacte cèl·lula-cèl·lula i regula múltiples aspectes del desenvolupament. El guany o la pèrdua dels membres de la via de Notch estan associats a desordres tal com el síndrome d'Alagille, el del CADASIL o leucèmies.

I2.1. Membres de la família de la via de Notch

I2.1.a Els receptors Notch: Els receptors Notch són proteïnes transmembrana. Hi ha 4 proteïnes Notch descrites en mamífers: Notch1, Notch2, Notch3 i Notch4.

I2.1.b Els lligands de Notch:

- Lligands canònics: JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 i DLL4.
- Lligands no-canònics: DLK1 i DNER

I2.2 Regulació de les interaccions lligand-receptor

Hi ha modificacions post-traduccionals com la glicosilació i la regulació del tràfic de membrana que controlen les interaccions entre lligands i receptors.

I2.2.a La glicosilació del receptor: L'especificitat i la intensitat de la unió entre Notch i els diferents lligands es regula parcialment per la glicosilació del domini EFG del receptor Notch. La glicosilació és produïda per la *O-fucosyltransferasa* POFUT1. Després, aquest residu són reconeguts pels membres de la família Fringe, que elonguen la cadena de glicosaminoglicans afegint *N*-acetylglucosamines. La glicosilació produïda per Fringe promou la interacció entre Notch i els lligands DLL i impedeix les interaccions entre els lligands JAG i Notch.

I2.2.b Endocitosi i tràfic de membrana de lligands: En mamífers, la ubiquitinació del domini intracel·lular dels lligands és crític per la iniciació del procés endocític. Neuralized1 (NEURL) i Mindbomb-1 (MIB1), són les ubiquitin-ligases responsables d'ubiquitar JAG1 i DLL1, respectivament.

I2.3 Cascada d'activació de Notch

I2.3.a La via canònica de Notch: Quan dues cèl·lules entren en contacte, el lligand que s'expressa en una de les cèl·lules s'uneix al receptor que es troba a la cèl·lula veïna, produint-se el trencament proteolític del receptor. Aquest trencament es fruit de l'acció d'un complex multiproteic amb activitat γ -secretasa. És així com el domini intracel·lular de Notch (NICD) s'allibera de la membrana i pot translocar-se al nucli. Allà s'uneix al factor de transcripció RBP_{JK} activant la transcripció dels seus gens diana.

I2.3.b Els gens diana de Notch: Hi ha dues famílies de factors de transcripció que són diana de Notch, *Hes* (Hairy and E (spl)) i *Herp* (*Hes* related repressor protein, també conegut com a *Hey*, *Hesr* or *Hrt*). També s'han

identificat llocs d'unió a RBP_{JK} en altres gens com *Ccnd*, *Cdkn1a*, *Ptcra*, *Gata3*, *c-Myc*, *Gata2* or *Il7r*.

12.4. Models de ratolí per l'estudi de la via de Notch

La inactivació de *Rbp_{JK}* causa la mort durant el desenvolupament embrionari per múltiples anomalies vasculares. La deleció de *Notch1* dona lloc a la mort embrionària a dia 11.5 de gestació; la deleció de *Notch2* provoca mort per defectes cardiovasculars i als ronyons; la deleció de *Notch3* no és letal, tot i que és responsable del síndrome CADASIL. Els ratolins deficientes en *Dll1* no formen somites; els deficientes en *Dll3* són viables però presenten anomalies vertebrals; els deficientes en *Dll4* moren abans del dia E10.5 de gestació per defectes vasculares; els deficientes en *Jagged2* moren per defectes en la morfogènesi cranio-facial; els deficientes en *Jagged1* moren durant el desenvolupament per defectes en la vasculatura del sac embrionari.

13. La fisiologia de l'intestí

13.1. Les funcions del tracte intestinal

El tracte gastrointestinal comença a la boca i acaba a l'anus passant per l'esòfag, estómac, intestí prim i gruixut. L'intestí prim es divideix en duodè, jejú i íleum. L'intestí gruixut està format pel cec, colon i recte. La funció del tracte intestinal és absorbir i digerir els nutrients de la dieta i eliminar la part inservible.

13.2. Capes i tipus cel·lulars de l'intestí

El tracte gastrointestinal es divideix en 4 capes concèntriques: la mucosa (dividida en Epiteli, *Lamina propria* i *Muscularis mucosae*), la submucosa, la *Muscularis externa* i l'adventícia o serosa. Diferents tipus cel·lulars poblen l'epiteli intestinal: cèl·lules absortives (o enteròcits), cèl·lules secretores de moc, cèl·lules neuroendocrines i cèl·lules de Paneth.

13.3. Manteniment de l'arquitectura de l'intestí

L'epiteli de l'intestí prim està recobert de villi i criptes anomenades criptes de Lieberkühn. El colon no conté villi. L'intestí és el teixit amb major grau d'auto-renovació, en ratolins es renova cada 3–5 dies. Les cèl·lules mare es troben al fons de les criptes. La divisió de les cèl·lules mare dona lloc al compartiment progenitor anomenat "transit-amplifying compartment". Els progenitors poden formar tots els llinatges cel·lulars que migren ascendentment a mesura que es diferencien. Les cèl·lules de Paneth són les úniques que no migren i es queden al fons de les criptes.

13.4. Les cèl·lules mare intestinal

Estudis recents de *cell-tracing* han demostrat que les cèl·lules que es troben a la posició +4 expressen *Bmi1* i són capaces de donar lloc als 4 llinatges epitelials, a aquestes cèl·lules se les coneix com a cèl·lules mare quiescents. Alternativament, la població de cèl·lules mare que es troba entre les cèl·lules

de Paneth són positives pel marcador Lgr5 i constitueixen la població de cèl·lules mare proliferants.

14. El càncer colorectal

El càncer colorectal és una de les patologies oncològiques més freqüents en humans. La malaltia comença amb una hiperplàsia epitelial que va creixent progressivament produint criptes aberrants que progressen a adenomes o pòlips, que eventualment formen tumors malignes anomenats carcinomes. Al voltant d'un 15% dels casos amb càncer de colon es donen per predisposició genètica, com els pacients amb Poliposi adenomatosa familiar (FAP), el 85% restant són casos esporàdics. Els pacients amb FAP desenvolupen de centenars a milers de pòlips al colon i al recte com a conseqüència d'una mutació al gen *Apc*. La mutació al gen *APC* està lligada a la iniciació tumoral i representa un requisit indispensable perquè comenci el procés tumoral, tot i així hi ha mutacions en altres vies que són importants per la progressió tumoral, com ara K-Ras i p53.

15. Les vies de Wnt i de Notch a l'intestí

15.1. La via de Wnt a l'intestí

La via de Wnt juga un paper crucial durant el desenvolupament del tracte gastrointestinal, en particular en l'especificació de l'endoderm i el patró del tub digestiu, així com en el manteniment del compartiment de cèl·lules mare intestinals. En l'intestí adult, Wnt/ β -catenina és una senyal restringida al fons de les criptes. Hi ha un programa genètic dependent de TCF4 que és essencial pel manteniment de les cèl·lules mare intestinals. En aquest programa gènic apareixen *c-Myc* i *Lgr5*.

15.2. La via de Wnt al càncer colorectal

El primer gen de la via de Wnt identificat en aquesta patologia va ser *Apc*, que es troba silenciada en el 85% dels casos de càncer de colon. Tot i la gran quantitat de models animals per l'estudi del càncer colorectal, encara no es coneix l'origen cel·lular responsable de la iniciació tumoral. Diversos grups han dissenyat estratègies per resoldre aquesta qüestió, com el disseny de ratolins amb mutacions a *Apc* en cèl·lules mare ($LGR5^+$ o $CD133^+$). Aquests estudis demostren que les cèl·lules mare podrien transformar-se en cèl·lules mare tumorals com a conseqüència d'una activitat aberrant de Wnt/ β -catenina. També s'han fet estudis caracteritzant el microambient que envolta el nínxol de cèl·lules mare tumorals com a responsable del manteniment d'aquest tipus cel·lular.

15.3. La via de Notch a l'intestí

La via de Notch regula el destí cel·lular i la diferenciació dels 4 tipus de llinatges cel·lulars intestinals. Nivells elevats d'activitat Notch inhibeixen l'activació transcripcional del gen *Math1* a través de l'activació de HES1,

promovent el llinatge absortiu en detriment del secretor. A més, l'activació de Notch és necessària pel manteniment del compartiment de cèl·lules mare. Els receptors Notch1 i Notch2 s'expressen a l'intestí prim, però actuen redundantment. Els lligands DLL1 i DLL4 han estat identificats com els lligands responsables de l'activació fisiològica de Notch a les criptes intestinals.

I5.4. La via de Notch al càncer colorectal

L'expressió d'alguns gens diana de Notch es troben alterats en aquesta patologia: *Math1*, *Hes1* o *Ephb2*. La contribució de la activació de Notch en el càncer colorectal no està prou caracteritzada, no obstant molts estudis recolzen la importància d'aquesta via durant el procés tumoral.

I5.4.a La via de Notch en angiogènesi: La inhibició de la senyalització DLL4-Notch suprimeix el creixement tumoral *in vivo* i disminueix la vascularització. JAG1 és un potent pro-angiogènic que antagonitza l'activació DLL4-Notch. Aquests resultats suggereixen que hi ha un equilibri entre els lligands de Notch regulant l'angiogènesi. D'altra banda, Aes inhibeix Notch, i la pèrdua d'Aes causa invasió tumoral i extravasació.

I5.4.b La via de Notch i les cèl·lules mare tumorals: La expressió de gens diana de Notch estan 10-30 vegades sobre-expressats en cèl·lules mare tumorals comparat amb línies de càncer de colon. Notch inhibeix l'apoptosi de les cèl·lules mare tumorals a través de la repressió de p27 and MATH1.

16. Les interaccions entre la via de Wnt i la de Notch

L'associació entre les vies de Wnt i Notch ha estat identificada en molts sistemes, per exemple a l'intestí ambdues vies estan activades i són responsables del manteniment del compartiment de cèl·lules mare. En melanoma, l'activació de β -catenina és conseqüència de l'activació de Notch. També s'ha demostrat que *Hes1* és un gen diana de β -catenina, a l'igual que *Jagged1*. A més, s'ha proposat que el co-activador de Notch, MAML1, pot funcionar com a co-activador de β -catenina. Totes aquestes dades indiquen que hi ha múltiples interaccions entre les vies de Notch i Wnt que són dependents del context, tipus cel·lular i espècie.

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest projecte ha estat investigar la interacció entre les vies de Wnt i Notch durant el desenvolupament intestinal i el procés tumoral intestinal. Els objectius específics d'aquest treball han estat:

1. Determinar si hi ha un programa transcripcional comú a les vies de senyalització de Wnt i Notch.

2. Estudiar la dependència de l'activació de Notch en l'activació de Wnt/ β -catenina o *viceversa*.
3. Investigar la contribució de Notch a la tumorigènesi en el model animal *Ap^c^{Min}*.
4. Avaluar la interacció física entre Notch i β -catenina a l'intestí i estudiar la seva rellevància funcional.
5. Caracteritzar el paper diferencial de Jagged1 durant la homeòstasi intestinal i durant el procés tumoral.

RESULTATS

Hi ha descrit un programa genètic depenent de β -catenina que es troba sobre-expressat en tumors colorectals, però aquesta no és l'única via alterada en aquest tipus de càncer. Hi ha també diversos gens diana de Notch que es troben sobre-expressats en aquests tumors suggerint una relació entre ambdues vies.

Com a primer pas per a entendre quin era el lligam entre Notch i Wnt vam utilitzar la línia cel·lular humana de càncer de colon Ls174T, que expressa el dnTCF4 de manera induïble per doxiciclina, i permet bloquejar de forma eficient la via de Wnt. D'altra banda, incubant les cèl·lules amb DAPT (inhibidor de l'activitat γ -secretasa) bloquejàvem la via de Notch. Mitjançant microarrays d'expressió vam comparar els efectes transcripcionals d'inhibir Wnt, Notch o ambdues vies i vam poder demostrar que un 34% dels gens que s'inhibien al bloquejar l'activitat β -catenina/TCF4, es reprimien també al bloquejar Notch (**Figures R1-R2**). Aquest fenomen podia explicar-se de dues maneres: **a**) una via estava regulant l'activació de l'altra, o **b**) ambdues vies de senyalització compartien gens diana (**Figura R3**). Per tal de testar la primera hipòtesi, vam estudiar si algun dels lligands de Notch es regulava per Wnt en el nostre microarray. Els resultats obtinguts indicaven que el lligand de Notch Jagged1 es regulava positivament per Wnt/ β -catenina. Per qRT-PCR i Western blot, vam verificar que els nivells de mRNA i proteïna de Jagged1 disminuïen al bloquejar l'activitat β -catenina en diferents línies tumorals humanes de càncer colorectal (**Figures R7-R10**).

Per tal d'estudiar si aquells gens que s'inhibien tant si bloquejàvem la via de Notch com la de Wnt ho feien perquè eren dianes directes de la primera, vam fer clons induïbles de la línia Ls174T/dnTCF4 que expressaven la forma activada de Notch1 (N1ICD) en resposta a doxiciclina. La idea era que quan inhibíssim Wnt per l'expressió del dnTCF4, mantindríem activada la via de Notch per expressió de N1ICD. A l'analitzar els canvis transcripcionals que tenien lloc en aquestes cèl·lules vam observar que només el 31% dels gens

que depenien de Wnt i Notch (el grup de gens identificats en el primer anàlisi com a dianes dobles) eren dianes preferents de Notch, ja que la seva expressió era rescatada per N1ICD (**Figura R4-R6**). A més, per experiments de precipitació de cromatina vam constatar que Notch es reclutava en els promotors d'alguns d'aquests gens. En conjunt, aquests resultats indicaven que hi ha un grup de gens que depèn de Wnt i Notch en cèl·lules de càncer colorectal dels quals un terç són dianes directes de Notch i la resta podrien estar regulats de forma conjunta per ambdós factors de transcripció.

Per tal d'estudiar quina podia ser la contribució específica de Notch a la tumorigènesi intestinal vam determinar l'efecte de N1ICD sobre diferents capacitats tumorigèniques de les cèl·lules Ls174T/dnTCF4. En primer lloc, vam avaluar la capacitat de creixement independent de substrat mitjançant assajos en agar tou. Al contrari que les cèl·lules control (Ls174T/dnTCF4), les Ls174T/dnTCF4/N1IC creixien en agar tou en absència de activitat Wnt. Després, vam avaluar la seva capacitat de fer tumors *in vivo* en ratolins immunodeprimits. Tots els ratolins van ser punxats amb un clon Ls174T/dnTCF4 a la pota esquerra i un clon Ls174T/dnTCF4/N1ICD a la dreta; unes gàbies van ser tractades amb doxiciclina i les altres no (20 ratolins per condició). Després de 4 setmanes d'experiment vam observar que els ratolins de les gàbies NO-tractades havien fet tumors a les dues cames, però els ratolins de les gàbies tractades van fer tumors només a la cama dreta, on havíem injectat els clons Ls174T/dnTCF4/N1ICD. Amb aquests assajos de tumorigenicitat confirmàvem que Notch és capaç de mantenir algunes de les capacitats tumorals en absència d'activitat β -catenina/TCF (**Figures R11-15**).

Després, vam voler demostrar que Notch es troba per sota de l'activació de β -catenina (a través de Jagged1) i que té un paper important en la tumorigènesi induïda per Wnt *in vivo*. Per fer això, vam creuar els ratolins APC^{Min}, que tenen activació constitutiva de la via i generen tumors espontàniament a l'intestí prim, amb uns ratolins amb una còpia menys de Jagged1 (Jag1^{+/-}). Amb aquest creuament vam observar que la mida dels tumors que es generaven es reduïa significativament (**Figures R16-R18**). Aquest efecte podia ser degut a una reducció de la proliferació cel·lular, ja que vam observar que disminuïa el percentatge de Ki67 en els tumors dels ratolins APC^{Min}Jag1^{+/-} comparat amb els APC^{Min}Jag1^{+/+}. A més, en les criptes no transformades, el compartiment proliferatiu que es troba expandit al llarg del villus en els ratolins APC^{Min} es restringia la fons de les criptes en el genotip combinat APC^{Min}Jag1^{+/-}, similar al que es troba als ratolins control (**Figures R19-R20**).

Per tal d'avaluar la importància clínica de les nostres troballes, vam determinar per qRT-PCR que alguns dels gens diana de Notch (que havíem

identificat prèviament) estaven sobre-expressats en mostres de tumors de pacients amb FAP i amb càncer de colon esporàdic de forma significativa. Per immuno-histoquímica, vam demostrar que la presència de β -catenina nuclear es correlaciona amb un augment en els nivells de Jagged1 i Notch activat en les mostres de pacients analitzades (**Figures R21-R24**).

Paral·lelament, vam provar de validar la possibilitat que un grup important de gens requerís de la presència simultània de β -catenina i Notch en els seus promotors per a ser per activats. Els gens que es regulen per aquest mecanisme, els quals vam anomenar "Gens Diana de Notch i de Wnt" (*dNwt*), havien de complir dues premisses: la primera, havien de reprimir-se amb inhibidors d'ambdues vies (Figura R2) i segona, la seva expressió no hauria de recuperar-se en presència de N1ICD/dnTCF4 (Figura R4). En primer lloc vam validar alguns d'aquests gens *dNwt* identificats a partir de les dades dels microarrays per qRT-PCR (**Figura R25**). Després, utilitzant el Software de Genomatix, que compta amb una base de dades de consensos per la majoria dels factors de transcripció que existeixen, vam identificar els possibles llocs d'unió a TCF i RBP_{Jk} en els promotors d'alguns dels gens candidats. Amb assajos de ChIP vam demostrar que ambdós factors es recluten en els promotors d'aquests gens. A més, per assaig de co-immunoprecipitació vam demostrar que β -catenina i Notch s'associen físicament al nucli de cèl·lules tumorals (**Figura R26-R33**).

Finalment, per tal de demostrar la importància funcional d'aquest mecanisme *in vivo*, vam establir una col·laboració amb el grup del Dr. Freddy Radtke que va incloure una estada de tres mesos al seu laboratori a Suïssa. Durant aquesta estada vam estudiar el patró d'expressió dels gens *dNwt* a l'intestí de ratolins normals i ho vam comparar amb la seva expressió en diferents ratolins mutants per a elements de la via de Notch i Wnt. Vam observar que molts d'aquests gens es localitzaven al compartiment més indiferenciat, coincidint amb l'activació de β -catenina i Notch. Per demostrar que l'expressió dels gens *dNwt* requeria la presència d'ambdós factors, vam analitzar els mutants deficients per β -catenina però que expressaven N1ICD i els RBP-KO (que no activaven la via de Notch) amb β -catenina activada. En apagar qualsevol de les dues vies, tot i sobre-expressar l'altra, aquests gens eren incapaços d'expressar-se (testat per ISH i qRT-PCR). Aquests resultats apunten que existeix un grup de gens (*dNwt*) que es regulen per β -catenina i Notch simultàniament, i que podrien jugar un paper en el manteniment del compartiment indiferenciat (**Figures R34-R7**).

La última part del projecte ha tingut com a objectiu entendre el paper que juga Jagged1 en la homeòstasi intestinal i durant el procés tumoral. Per això, vam generar ratolins *knockouts* condicionals a l'intestí (fruit del creuament Jagged1^{lox/lox} amb ratolins villin-CRE). L'anàlisi d'aquest ratolins revela que la

pèrdua funcional de Jagged1 a l'intestí no afecta la seva integritat. Tots els tipus cel·lulars conserven la seva proporció i localització en el budell prim i al colon (**Figures R38-R42**). D'altra banda, el creuament dels ratolins heterozigots per Jagged1 amb els APC^{Min} suggeria que Jagged1 podia tenir un paper principal en tumorigènesi. Per confirmar aquestes dades vam creuar els ratolins APC^{Min} amb la soca Jag1^{lox/lox}CRE⁺. Els nostres resultats demostren que la deleció condicional de Jagged1 a les cèl·lules epitelials intestinals, tot i no tenir un efecte sobre l'homeòstasi de l'intestí normal és suficient per a reduir fins a un 50% el nombre de tumors generats en els ratolins mutants per APC (**Figures R43-R45**). A més, a l'examinar en detall el tumors obtinguts en els diferents genotips vam observar que la deleció de Jagged1 incrementa els marcadors secretors en detriment dels absortius (**Figura R46**), resultat esperable donada la importància de Notch en la decisió cel·lular cap al llinatge absortiu, i els marcadors de cèl·lules mare es redueixen en els tumors APC^{Min}Jag1^{+/+}Cre⁺ en comparació amb els APC^{Min}Jag1^{+/+}Cre⁻ (**Figura R47**).

Els experiments preliminars amb un tractament combinat d'inhibidors de la via de Wnt (PFF115) i la Notch (DAPT) mostren un efecte sinèrgic per induir apoptosi en línies tumorals de càncer de colon (**Figura R48**).

DISCUSIÓ I CONCLUSIONS

Hem demostrat que existeix una relació directa entre la via de Wnt i la via de Notch que és responsable del manteniment del compartiment proliferatiu a l'intestí i que també es dóna en tumors intestinals.

Hem identificat dos mecanismes a través dels qual la β -catenina interacciona amb Notch per activar la transcripció gènica: 1) la β -catenina pot activar Notch a través de l'activació transcripcional del seu lligand Jagged1. L'expressió del lligand permet la unió al receptor Notch, processant-lo i activant-lo, de tal manera que N1ICD aniria al nucli. Aquest mecanisme te lloc en tumors de malalts amb FAP, on trobem β -catenina nuclear, Jagged1 sobre-expressat i Notch al nucli. 2) La β -catenina i el Notch s'uneixen simultàniament en el promotor d'alguns gens per iniciar la seva transcripció.

Hem demostrat que β -catenina i Notch regulen conjuntament un grup de gens, dels quals el 31% ho fa per l'acció directa de Notch. Els gens analitzats d'aquest grup es sobre-expressen en tumors de malalts amb FAP. D'altra banda, β -catenina i Notch interaccionen físicament al nucli de les cèl·lules tumorals i hem caracteritzat un grup de gens que són dianes dobles de β -catenina i de Notch, es a dir, que requereixen de l'activació d'ambdues vies

per expressar-se. Aquests gens es localitzen al compartiment més indiferenciat de l'intestí (al fons de les criptes). La manca de qualsevol dels dos factors redueix l'expressió de marcadors de cèl·lula mare posant de manifest la importància d'aquesta interacció entre les dues de senyalització.

L'estudi dels *knockouts* condicionals de Jagged1 a intestí, indica que Jagged1 no és necessari per a mantenir la homeòstasi de l'intestí però que juga un paper clau en la formació tumoral. Les dades obtingudes d'aquesta part del projecte obren la possibilitat d'un tractament pel càncer colorectal amb inhibidors d'aquest lligand, sense afectar la integritat del teixit normal.