

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica



**Efectos de Wnt3A sobre el
transcriptoma de fibroblastos
colónicos humanos: regulación y
acción de *PKP2*/Plakofilina-2**

Núria Niell Garolera

Madrid 2016

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Efectos de Wnt3A sobre el transcriptoma de fibroblastos colónicos humanos: regulación y acción de *PKP2/Plakofilina-2*

Núria Niell Garolera
Licenciada en Biología

Director de Tesis:
Dr. José Manuel González Sancho

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid
Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad
Autónoma de Madrid



José Manuel González Sancho, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA: que **Núria Niell Garolera**, Licenciada en Biología por la Universitat de Girona ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

Efectos de Wnt3A sobre el transcriptoma de fibroblastos colónicos humanos: regulación y acción de *PKP2*/Plakofilina-2

En mi opinión, éste reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente y la originalidad y calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado.

Madrid, 4 de octubre de 2016.

Dr. José Manuel González Sancho

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (UAM-CSIC) con subvenciones de la Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2344 Colomics2), del Ministerio de Economía y Competitividad de España-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (SAF2013-43468-R y SAF2014-53819-R) y del Instituto de Salud Carlos III-FEDER (RD12/0036/0021).

*A mi familia y Eduardo.
En memoria de Daní.*

Agradecimientos

Albert Einstein dijo: “Entre las dificultades se esconde la oportunidad”. Después del camino hecho y del que me queda por recorrer, me identifico con esta cita.

En primer lugar, quiero agradecer al profesor José Manuel González Sancho que aquel enero de 2011 cuando me presenté en su laboratorio con la única expectativa de aprender me diera la oportunidad de entrar en su laboratorio y realizar una estancia de 6 meses. Esa estancia fue la primera piedra de este camino. Aprendí más en esos 6 meses que en los 4 años de licenciatura y fue una gran experiencia personal y profesional. Sobre todo tengo que agradecerle la inmensa paciencia y oportunidad que me ha brindado durante el tiempo que he estado realizando esta Tesis doctoral. De corazón agradezco tus consejos, tu apoyo y sobre todo la oportunidad.

También quiero dar las gracias a mis compañeros del laboratorio 2.14. En especial a la profesora Isabel Sánchez Pérez por cuidarme y preocuparse como si de una madre se tratase. También quiero agradecer la inmensa disposición a ayudar en experimentos o en solucionar cualquier duda que pudiera tener. Nunca he obtenido un NO de su boca. A Úrsula y Rebeca por los ratos compartidos y las risas. A Jone, con quien he compartido este tramo final, agradecerle su ayuda, comprensión y compañía.

Por supuesto no puedo olvidarme del profesor Alberto Muñoz y del laboratorio 2.3.1. Agradecerte Alberto tus saludos matutinos y tus comentarios siempre alegres para empezar con una sonrisa el día, tus consejos y ayudas en la dirección de este proyecto. Quiero dar mis más sinceros agradecimientos a los chicos del laboratorio: Asun, Toño, Gemma y Chus, por su ayuda y colaboración. ¿Qué puedo decir de Gemma y en especial de Chus? Chus me ha ayudado y aconsejado tantísimas veces que soy incapaz de recordarlas todas. Ha sido una parte muy importante de este trabajo y le doy las gracias. A Gemma agradecerle su ayuda con los fibroblastos de pacientes y sus consejos, su ayuda con las inmunofluorescencias y con tantas otras cosas. Hemos realizado el viaje de escribir la tesis a la vez y esas charlas han sido un gran apoyo.

Al profesor Luis del Peso agradecerle su ayuda con el análisis de los datos de la secuenciación de ARN, el análisis GSEA, el estudio del promotor de *PKP2* y, en general, con todo lo relacionado con la bioinformática. Me gustaría también agradecerle su inmensa paciencia, su accesibilidad y sobre todo la sonrisa con la que siempre me ha recibido ante cualquier duda o problema.

A la profesora Benilde Jiménez quiero agradecerle sus constantes palabras de aliento y disponibilidad a la hora de ayudar.

Agradecer al personal de los servicios del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” su trabajo. Sin duda, sin su esfuerzo esto sería un caos.

A mis compañeros de inglés y profesores darles las gracias por las risas y todo lo que me han enseñado. Ha sido una válvula de escape del día a día. He aprendido mucho y seguiré aprendiendo sin duda.

Cómo olvidarme de mi monitora de Zumba Rocío, mis compañeras y compañero de clase. Esa hora de baile ha sido sin duda terapéutica y una forma divertidísima de eliminar el estrés en esta etapa.

Me gustaría pedir disculpas a mis padres por el disgusto que les di cuando les dije que me venía a vivir a Madrid. Sé que no ha sido fácil que haya estado tan lejos. No obstante, viéndolo con perspectiva, creo que fue la decisión correcta. Quiero agradecerles la paciencia y el apoyo que me han dado. Soy consciente de que muchas veces no entienden lo que hago y aún así me escuchan con atención mostrando interés.

A mi “familia política” agradecer también el que siempre estén a mi lado y su comprensión. Ha sido un placer para mí haber compartido este tiempo tan especial con vosotros. De todos vosotros puedo aprender algo y espero con el tiempo interiorizar lo mejor de cada uno, que es mucho.

Edu, a ti no sé ni que decirte. Me apoyaste desde el minuto cero. Incluso antes de que me decidiera a emprender esta aventura, tú ya tenías claro que podría sacarlo adelante. Ojalá confiara yo tanto en mí misma como lo haces tú. Todo sería mucho más fácil. Quiero agradecerte el que siempre estés aquí a mí lado apoyándome, que comprendas tan bien lo que supone un doctorado, que nunca te hayas quejado de los fines de semana, ... No todo el mundo lo comprendería. En muchos días de bajón tú me has dado fuerzas. Sólo puedo decirte GRACIAS y espero que consigamos muchas más metas juntos porque esto es solo el principio y somos un equipo.

Muchísimas gracias a todos con quien he tenido el placer de trabajar, convivir o interactuar de una manera u otra. Me ha ayudado a crecer como persona y seguro que el día de mañana me ayudará en la vida.

Resumen / Summary

RESUMEN

El cáncer colorrectal es el resultado de la transformación maligna de las células epiteliales del colon. Los fibroblastos estromales son el principal componente del microambiente tumoral y juegan un papel importante en la progresión de ésta y otras neoplasias. La señalización a través de la vía Wnt/ β -catenina es esencial para la homeostasis del colon, pero su activación constitutiva es un rasgo característico del cáncer colorrectal. En esta Tesis doctoral mostramos el primer estudio transcriptómico del efecto de un factor Wnt sobre una línea celular de fibroblastos humanos de colon. Wnt3A regula la expresión de 1.136 genes, de los cuales 662 son inducidos y 474 inhibidos en células CCD-18Co. Entre ellos, destacan un grupo de genes inducidos por Wnt3A que codifican inhibidores de la propia vía Wnt/ β -catenina, sugiriendo un mecanismo de retroinhibición. También mostramos que el gen *PKP2*, que codifica la proteína desmosomal Plakofilina-2, es una nueva diana transcripcional directa de Wnt/ β -catenina en fibroblastos normales y asociados al cáncer de colon. *PKP2* es inducido por β -catenina/TCF a través de tres sitios de unión en el promotor del gen y de un sitio adicional situado en una región *enhancer*, situada a unas 20 kb del sitio de inicio de transcripción. Por otro lado, Plakofilina-2 antagoniza la actividad transcripcional de Wnt/ β -catenina en células HEK-293T, lo que sugiere que podría actuar como un inhibidor intracelular de la vía. Nuestros resultados demuestran que los fibroblastos estromales responden a la señalización Wnt canónica y que Plakofilina-2 juega un papel en la retroinhibición de este efecto.

SUMMARY

Colorectal cancer results from malignant transformation of colonic epithelial cells. Stromal fibroblasts are the major component of tumour microenvironment and play an important role in the progression of this and other neoplasias. Wnt/ β -catenin signaling is essential for colon homeostasis but aberrant, constitutive activation of this pathway is a hallmark of colorectal cancer. Here we present the first transcriptomic study on the effect of a Wnt factor on established human colonic fibroblasts. Wnt3A regulates the expression of 1136 genes of which 662 are upregulated and 474 are downregulated in CCD-18Co cells. A set of genes encoding inhibitors of the Wnt/ β -catenin pathway stand out among those induced by Wnt3A suggesting a feedback inhibitory mechanism. We also show that the *PKP2* gene encoding the desmosomal protein Plakophilin-2 is a novel direct transcriptional target of Wnt/ β -catenin in normal and colon cancer-associated fibroblasts. *PKP2* is induced by β -catenin/TCF through three binding sites in the gene promoter and one additional binding site located in an enhancer 20 kb upstream the transcription start site. Moreover, Plakophilin-2 antagonizes Wnt/ β -catenin transcriptional activity in HEK-293T cells suggesting that it may act as an intracellular inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway. Our results demonstrate that stromal fibroblasts respond to canonical Wnt signaling and a role of Plakophilin-2 in the feedback control of this effect.

Índice

Abreviaturas	1
Introducción	9
1. EL COLON	11
1.1. ESTRUCTURA	11
1.2. EL CÁNCER DE COLON	13
1.2.1. Genética del cáncer colorrectal	14
1.2.2. Clasificación molecular del cáncer colorrectal	15
1.3. EL ESTROMA TUMORAL Y LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER	16
2. LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN POR FACTORES WNT	17
2.1. LOS FACTORES WNT	17
2.2. LA VÍA WNT/ β -CATENINA O VÍA CANÓNICA	17
2.3. LAS VÍAS WNT NO CANÓNICAS	19
2.4. REGULADORES DE LAS VÍAS WNT	21
2.4.1. Agonistas de la vía Wnt	21
2.4.2. Antagonistas de la vía Wnt	22
2.4.2.1. La familia Naked (NKD)	23
2.4.2.2. Adenomatosis Polyposis Coli Down-regulated 1 (APCDD1)	23
2.4.2.3. La familia Dickkopf (DKK)	24
3. LAS PLAKOFILINAS	24
3.1. ESTRUCTURA	26
3.2. FUNCIÓN Y PATRÓN DE EXPRESIÓN	26
3.3. PLAKOFILINA-2	27
Objetivos	29
Materiales y Métodos	33
1. CULTIVOS CELULARES Y FACTORES WNT	35
2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS NORMALES Y TUMORALES DE COLON HUMANO	36
3. SECUENCIACIÓN DE ARN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	36
4. EXTRACCIÓN DE ARN, RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	37
5. INMUNOTRANSFERENCIA (Western blot)	39
6. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS	41

7. INMUNOFLUORESCENCIA	41
8. CONSTRUCCIONES DE LAS REGIONES REGULADORAS DEL GEN PKP2	42
9. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	44
10. TRANSFECCIONES, PLÁSMIDOS Y ENSAYOS DE GEN REPORTERO.....	45
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
Resultados.....	47
1. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA INDUCIDO POR EL FACTOR WNT3A EN LA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS DE COLON HUMANO CCD-18Co. VALIDACIÓN DE GENES DIANA.....	49
1.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO CELULAR	49
1.2. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA INDUCIDO POR WNT3A EN FIBROBLASTOS DE COLON HUMANO CCD-18Co.....	51
1.3. WNT3A INDUCE LA EXPRESIÓN DE INHIBIDORES DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA	53
1.4. WNT3A INDUCE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>PKP2</i> EN FIBROBLASTOS NORMALES Y EN FIBROBLASTOS ASOCIADOS A CÁNCER DE COLON.....	55
2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL GEN <i>PKP2</i>/PLAKOFILINA-2 POR WNT/β-CATENINA.....	59
2.1. PLAKOFILINA-2A ES LA ISOFORMA PRESENTE EN LOS FIBROBLASTOS DE COLON HUMANO CCD-18Co Y EN LOS FIBROBLASTOS DE PULMÓN HUMANO IMR-90	59
2.2. WNT3A INDUCE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>PKP2</i> A TRAVÉS DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA.....	60
2.3. WNT3A INDUCE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN <i>PKP2</i> A TRAVÉS DE SITIOS β -CATENINA/TCF	60
3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PROTEÍNA PLAKOFILINA-2 SOBRE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR β-CATENINA/TCF	68
Discusión.....	71
1. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA INDUCIDO POR EL FACTOR WNT3A EN LA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS DE COLON HUMANO CCD-18Co	73
2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL GEN <i>PKP2</i>/PLAKOFILINA-2 POR WNT/β-CATENINA Y EFECTO SOBRE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR β-CATENINA/TCF.....	76
Conclusiones.....	81

Bibliografía	85
Anexos	101
Material suplementario	103
Publicaciones.....	129

Abreviaturas

ACTB: β -Actina

ACTD: Actinomicina D

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: Ácido desoxiribonucleico complementario

APC: Proteína *Adenomatous Polyposis Coli* (en cursiva se refiere al gen)

APCDD1: Proteína *APC down-regulated 1* (en cursiva se refiere al gen)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARVCF: *Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome*

ATCC: *American Type Culture Collection*

BRAF: Proteína B-RAF, Serina/Treonina quinasa (en cursiva se refiere al gen)

BSA: Albumina de Suero Bovino

CAF: Fibroblastos Asociados a Cáncer

CAMKII: Quinasa dependiente de calcio y calmodulina II

CCND1: Gen que codifica la proteína Ciclina D1

CCR: Cáncer colorrectal

CDH1: Gen que codifica la proteína E-cadherina

CEIC: Comité de Ética para la Investigación Clínica

CK1: Caseína quinasa 1

CMS: Subtipos Moleculares de Consenso

CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

CPM: Cuentas Por Millón

CRD: Dominio Rico en Cisteínas

Ct: *Cycle Threshold*

C-TAK1: Quinasa asociada a cdc25

CTNNB1: Gen que codifica la proteína β -catenina

DCC: Delecionado en cáncer colorrectal

DE: Desviación estándar

Dkk/DKK: Proteínas Dickkopf (en cursiva se refiere a los genes)

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil sulfóxido

Dsh/DVL 1/2/3: Dishevelled 1/2/3

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

EMT: Transición Epitelio-Mesénquima

FAP: Poliposis Adenomatosa Familiar

FBM: Medio Basal para Fibroblastos

FBS: Suero Fetal Bovino

FC: Veces de variación (*Fold change*)

FDR: *False Discovery Rate*

FGM-2: Medio de Crecimiento para Fibroblastos 2

Fzd/FZD: Proteínas Frizzled (en cursiva se refiere a los genes)

GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*

GSK3 β : Glucógeno Sintasa Quinasa 3 β

HIF1 α : Factor Inducible por Hipoxia 1 α

HNPCC: Cáncer de colon hereditario no polipósico

HR2: Región de homología 2

HRP: Peroxidasa de rábano

IBD: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

ICAT: Proteína de interacción con β -catenina

ICND: Dominio intracelular de Notch1

Ins(1,4,5)P3: Inositol-1,4,5-trifosfato

JNK: Quinasa amino-terminal de c-Jun

kb: Kilobase(s)

kD: Kilodalton

KRT19: Gen que codifica la proteína Queratina 19

LEF: Factor de transcripción de células linfoides (*Lymphoid enhancer-binding factor*)

LGR: Receptor acoplado a proteína G que contiene un dominio rico en leucína

LRP: Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad

LUC: Gen que codifica la proteína luciferasa de luciérnaga

MAVD: Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho

MC: Medio Condicionado

MEM: Medio Mínimo Esencial

MLH1: *MutL homolog 1*

MMP7: Metalopeptidasa de Matriz Extracelular 7

MSH 2/3/6: *MutS homolog 2/3/6*

MSI: Inestabilidad de microsatélites

MYC/c-MYC: Proteína c-MYC (en cursiva se refiere al gen)

MYH2: Gen que codifica la cadena pesada de la miosina 2

n.s.: No significativo

NF: Fibroblastos Normales

NFAT: Factor nuclear de células T activadas

Nkd/NKD: Proteínas Naked (en cursiva se refiere al gen)

NLK: *Nemo-Like Kinase*

ODZ3: Gen que codifica la proteína Teneurina

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCP: Polaridad Celular Planar

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PIK3CA: Gen que codifica la proteína Fosfatidilinositol 3 quinasa subunidad α

PKC: Proteína quinasa C

PKP: Gen que codifica la(s) proteína(s) Plakofilina(s)

PLC: Fosfolipasa C

PMS 1: *PMS homolog 1, mismatch repair system*

PMS 2: *PMS homolog 2, mismatch repair system*

PP1: Proteína fosfatasa 1

PP2A: Proteína fosfatasa 2A

PPAR δ : *Peroxisome proliferator activated receptor δ*

PTGER3: Gen que codifica el receptor 3 de la prostaglandina E

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RAC1: Proteína RAC1, GTPasa pequeña de la familia RAS

RAS/KRAS: Proteína (K)-RAS (en cursiva se refiere al proto-oncogén)

RHOA: Proteína RHOA, GTPasa pequeña de la familia RAS

RNA-seq: Secuenciación de ARN

RNF43: *Ring finger protein 43*

RPLPO: *Human Ribosomal Protein Control*

rpm: Revoluciones por minuto

RSPO 1-4: R-Spondina 1-4

RT: Retrotranscriptasa / retrotranscripción

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

Sdc4: sydecan 4

SDS: Dodecilsulfato sódico

sFRP: Proteína secretada relacionada con Frizzled

TBS: Tampón Tris salino

TCF: Factor de Celulas T

TCF7L2: Gen que codifica la proteína TCF-4 humana

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante tipo β

TGF- β -RII: Receptor II del Factor de Crecimiento Transformante tipo β

TRPA1: *Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1*

TSPAN12: Tetraspanina 12

TSS: Sitio de inicio de transcripción

UCSC: Universidad de California en Santa Cruz

WIF: Factor inhibidor de Wnt

WNT3Ar: Wnt3A recombinante

WT-1: *Wilms Tumor 1*

ZNRF3: *Zinc and Ring Finger 3*

β -TrCP: *Beta-Transducin repeat Containing E3 ubiquitin Protein*

Introducción

1. EL COLON

1.1. ESTRUCTURA

El colon o intestino grueso tiene cuatro partes diferenciadas anatómica y funcionalmente: ascendente, transverso, descendente y sigmoide (**Figura 1**).

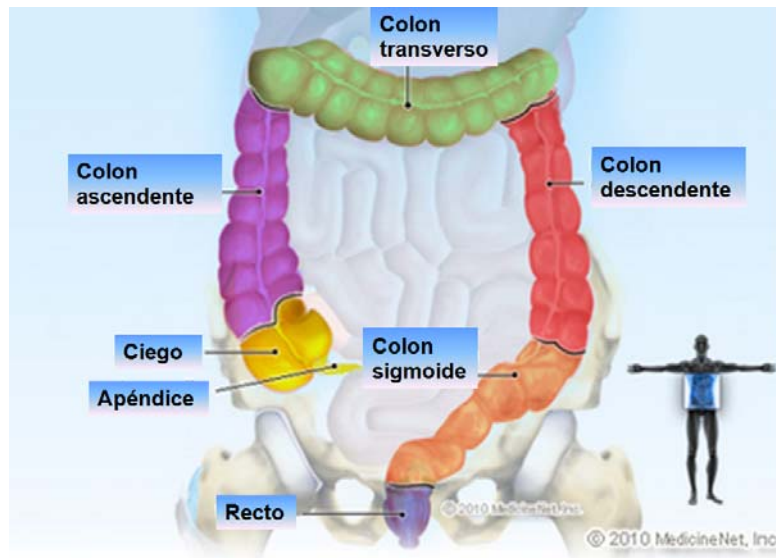


Figura 1. Esquema del intestino grueso. Se indican las diferentes partes de las que se compone el intestino grueso. En amarillo el apéndice y el ciego, en morado el colon ascendente, en verde el colon transverso, en rojo el colon descendente, en naranja el colon sigmoide y en azul el recto (**Adaptada de: MedicineNet, Inc.**).

El colon ascendente tiene una longitud de 15 cm aproximadamente y su diámetro es más estrecho que el del ciego. A partir de éste, el colon empieza a ascender hasta situarse debajo del lóbulo derecho del hígado donde cambia de dirección, realizando un ángulo de 90° hacia la izquierda y dando lugar al ángulo cólico derecho.

El colon transverso presenta una longitud de unos 50 cm, se inicia en el ángulo cólico derecho, que se sitúa en la región lumbar derecha y allí se curva sobre sí mismo para dirigirse hacia abajo por detrás del extremo lateral del bazo para formar el ángulo cólico izquierdo.

El colon descendente posee una longitud de 25 cm aproximadamente. Desciende por la parte izquierda del abdomen, cruzando el hipocondrio y la región lumbar, y acabando en el colon sigmoide que se encuentra en el límite superior de la pelvis menor.

El colon sigmoide o colon pélvico tiene su inicio en la entrada de la pelvis menor y se encuentra a continuación del colon descendente. Forma un asa de longitud muy variable pero que suele tener unos 40 cm de media y albergarse en la pelvis menor. Tanto la posición como la forma del colon sigmoide son muy variables y dependen de varios factores como la longitud y el grado de distensión (Williams y Warwick, 1985).

Las paredes del colon tienen 4 capas: serosa, muscular externa, submucosa y mucosa (Figura 2).

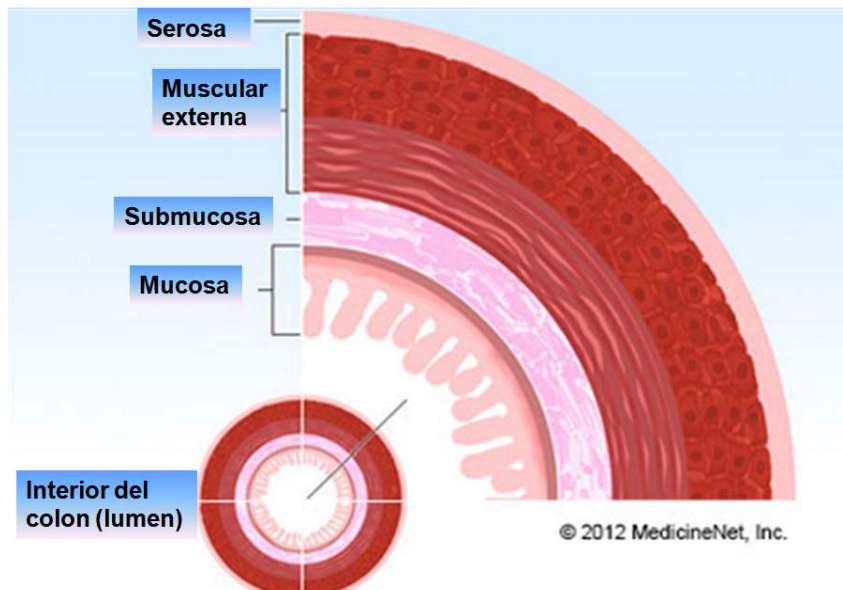


Figura 2. Esquema de las capas del colon. Desde el exterior al interior la capa serosa, la muscular externa, la submucosa y la mucosa (Adaptada de: MedicineNet, Inc).

La mucosa del colon está constituida por una monocapa de células epiteliales que se organiza formando criptas separadas por espacios intercriptales o epitelio superficial. Estas criptas, que contienen diferentes tipos de células diferenciadas, se encuentran revestidas por una capa de células mesenquimales pericriptales o fibroblastos. En la parte inferior de la cripta se encuentran las células troncales o *stem*, que dan lugar a todos los linajes celulares presentes en la cripta. A continuación, la progenie inicial de las células troncales, las células progenitoras proliferativas (*transit-amplifying cells*), se dividen aproximadamente un par de veces al día y son imprescindibles para la rápida renovación del epitelio colónico. En la parte media de la cripta, las células dejan de proliferar y se diferencian a células secretoras (caliciformes y enteroendocrinas) o absortivas (enterocitos). En áreas específicas del epitelio, las células progenitoras dan lugar a un linaje de células especializadas conocidas como células M (Neutra *et al.*, 1996). Además, podemos encontrar las células Tuft que parecen estar implicadas en

la regulación de respuestas inmunitarias de tipo 2 (Howitt *et al.*, 2016; Gerbe y Jay, 2016). En el colon, a diferencia de lo que ocurre en el intestino delgado, no existen vellosidades ni tampoco células de Paneth (**Figura 3**). Pasados unos días, las células de la zona alta de la cripta se descaman en el lumen del colon y son sustituidas por otras más jóvenes (Medema y Vermeulen, 2011).

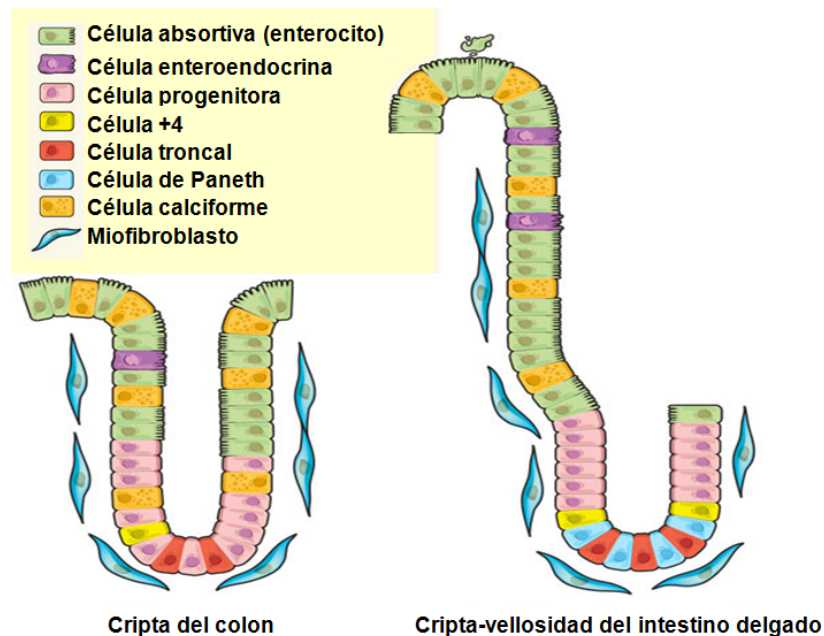


Figura 3. Organización de la cripta del colon y de la cripta-vellosidad del intestino delgado. Tanto la cripta del colon (imagen de la izquierda) como la cripta del intestino delgado (imagen de la derecha) contienen un compartimento de células troncales en la parte inferior (en rojo). En la cripta del colon no están presentes las células de Paneth (en azul) que sí se pueden observar en la cripta del intestino delgado. Los miofibroblastos pericriptales revisten la monocapa de células epiteliales. (**Adaptada de: Medema y Vermeulen, 2011**)

1.2. EL CÁNCER DE COLON

El cáncer de colon o colorrectal (CCR) es el resultado de la transformación maligna del epitelio que reviste la cara interna del intestino grueso (mucosa). Esta neoplasia es una de las más frecuentes en el mundo y además, es una de las principales causas de muerte por cáncer. La tasa de incidencia es más alta en países desarrollados y, normalmente, es más elevada en hombres que en mujeres (Torre *et al.*, 2015; Torre *et al.*, 2016). La variabilidad de la incidencia entre países puede ser debida a diferencias en la prevalencia de factores de riesgo (trasfondo genético, obesidad, dieta rica en carne roja o procesada) y a la disponibilidad de procedimientos y programas de detección temprana (test de sangre en heces, enema de bario, sigmoidoscopia, colonografía y colonoscopia) y de tratamientos adecuados (Torre *et al.*, 2015). Algunos

estudios en poblaciones emigrantes sugieren que el entorno (el clima, el estilo de vida y la dieta, principalmente) puede modular el trasfondo genético y las mutaciones adquiridas. De esta forma se puede alterar la incidencia de CCR y, posiblemente también, la mortalidad. La microbiota intestinal y los antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD: colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) son factores adicionales que pueden modificar el riesgo de sufrir CCR (Rubin *et al.*, 2012).

1.2.1. Genética del cáncer colorrectal

El 90% de los casos de CCR son esporádicos y son diagnosticados entre los 50 y los 70 años, e incluso más tarde. Son el resultado de la acumulación progresiva de mutaciones y alteraciones epigenéticas en proto-oncogenes y genes supresores de tumores, a lo largo de los años (Fearon y Vogelstein, 1990). Aproximadamente un cuarto de estos casos tienen un componente familiar, de base genética desconocida, y pueden deberse a la herencia de alelos “negativos” de genes que presentan una penetrancia moderada. Dichos alelos pueden tener un efecto individual pequeño, pero contribuyen de forma significativa a aumentar el riesgo de sufrir CCR cuando se acumulan en determinadas combinaciones (Fearon, 2011). Entre un 5 y un 10% de los casos de CCR son hereditarios e incluyen varios síndromes como la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el síndrome de Lynch o cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), entre otros, que son causados por mutaciones en genes supresores de tumores como p.e. *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*, FAP) o en genes de reparación del ADN como p.e. *MSH2*, *MLH1*, etc (HNPCC).

En 1990 Fearon y Vogelstein publicaron el primer modelo genético de tumorigénesis colorrectal. Según este modelo, los tumores colorrectales son el resultado de la acumulación de mutaciones que activan oncogenes e inactivan genes supresores de tumores. Son necesarias mutaciones en varios genes para la formación del tumor maligno y estas alteraciones genéticas ocurren preferentemente en un orden característico. Así pues, la transición desde un tumor benigno (adenoma) o a un tumor maligno (carcinoma) es progresiva (Fearon y Vogelstein, 1990; Medema y Vermeulen, 2011).

En el modelo de Fearon y Vogelstein, el primer evento es la pérdida o mutación del gen *APC* y, a continuación, siguen la hipometilación global del ADN, la alteración del oncogén *KRAS* y la pérdida de los genes supresores de tumores *DCC* y *p53* (Fearon y Vogelstein, 1990). En la actualidad, este modelo, conocido como “vía supresora”, se

ha enriquecido con el descubrimiento de mutaciones en genes adicionales como *BRAF* o *PIK3CA*, como alternativa a *KRAS*, en genes que afectan a la vía de señalización del factor de crecimiento transformante (TGF)- β , como *SMAD2/4* o *TGF- β -RII*, y con la implicación de otras rutas moleculares que se modifican a través del control de la degradación de proteínas (*FBXW7*), de la sobreexpresión (*MYC*, *EGFR*) e inhibición (*CDH1/E-cadherina*) de genes o de cambios epigenéticos (Ormanns *et al.*, 2014; Krausova y Korinek, 2014; Cancer Genome Atlas Network, 2012; Fearon, 2011). Es importante reseñar que el evento inicial de esta vía supresora, responsable del 90% de los casos de CCR, es la mutación excluyente en genes (*APC*, *CTNNB1/ β -catenina*, *AXINA1/2*, *R-Spondina (RSPO)2/3*, *ZNRF3*, *RNF43*, *TCF7L2*) que codifican proteínas de la vía Wnt/ β -catenina (Krausova y Korineck, 2014; Fearon, 2011).

Un modelo alternativo de carcinogénesis colorrectal, la llamada “vía mutadora”, afecta a una pequeña proporción de casos (5-10%) que presentan pérdida o mutación de genes implicados en la reparación de errores durante la replicación del ADN (*MSH2*, *MLH1*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*), lo que produce inestabilidad de microsatélites (MSI) o el fenotipo característico del síndrome de Lynch (Lu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Fearon, 2011). Es interesante resaltar que la mayoría de mutaciones en *RNF43*, que activan la vía Wnt/ β -catenina, se producen a través de MSI (Giannakis *et al.*, 2014), lo que confirma que la activación de esta vía es el evento iniciador de la mayoría de CCR. Esto ha sido recientemente avalado por estudios de secuenciación masiva de muestras procedentes de tejido normal y tumoral de cientos de pacientes que han confirmado que más de un 94% de CCR presentan mutaciones en al menos un gen de la vía Wnt/ β -catenina (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

1.2.2. Clasificación molecular del cáncer colorrectal

Los avances en el análisis masivo de perfiles de expresión génica han permitido que en los últimos años se hayan presentado diferentes propuestas para una clasificación molecular de los CCR basadas en diferentes plataformas y algoritmos (Budinska *et al.*, 2013; Marisa *et al.*, 2013; Roepman *et al.*, 2014; De Sousa E Melo *et al.*, 2013; Sadanandam *et al.*, 2013; Schlicker *et al.*, 2012), aunque no coinciden plenamente. Recientemente, fruto de una amplia colaboración, se ha propuesto una clasificación del CCR en 4 subtipos moleculares de consenso (*consensus molecular subtypes*, CMS): CMS1, con MSI y fuerte componente inmunológico; CMS2, con una marcada activación de la vía Wnt/ β -catenina; CMS3, con desregulación metabólica y epitelial; y CMS4, con marcada activación de la vía del TGF- β e invasión estromal (Guinney *et al.*,

2015). Es interesante destacar que el análisis de los perfiles de expresión génica asociados a los subtipos más mesenquimales o *stem*, con peor pronóstico, muestra que la mayoría de los genes cuya expresión aumenta son inducidos por TGF- β y se expresan en las células del estroma.

1.3. EL ESTROMA TUMORAL Y LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER

Los tumores están formados por una compleja mezcla de células epiteliales neoplásicas y células no neoplásicas denominadas genéricamente estroma del tumor. Este estroma tumoral, que en algunos casos constituye más del 80% de la masa del tumor, está compuesto por células endoteliales sanguíneas y linfáticas, células infiltradas del sistema inmune, pericitos y fibroblastos especializados, que se conocen como fibroblastos asociados al cáncer (CAF), miofibroblastos o estroma reactivo; todo ello integrado en una red formada por proteínas de la matriz extracelular (Bhowmick *et al.*, 2004; Mueller y Fusenig, 2004; Rasanen y Vaheri, 2010).

Aunque se sabe que el cáncer es el resultado de un conjunto de alteraciones genéticas y epigenéticas, cada vez hay más evidencias que destacan la importancia de las interacciones entre el componente estromal, el epitelial y la matriz extracelular. Se ha observado que, en muchas ocasiones, el estroma tumoral es claramente diferente del que podemos encontrar en el tejido sano correspondiente. Por ejemplo, en cáncer de mama, pulmón, colon y próstata, el estroma tumoral presenta una composición diferente de la matriz extracelular y tiene más microvasos, células inflamatorias y CAF, que se cree que pueden tener un papel fundamental en la tumorigénesis (Micke y Östman, 2004; DeWever y Mareel, 2003).

Los CAF pueden originarse a partir de células troncales mesenquimales, de células endoteliales, de adipocitos e incluso de células epiteliales cancerígenas (Jotzu *et al.*, 2010; Mink *et al.*, 2010; Zeisberg *et al.*, 2007; Chen y Huang, 2014). Se suelen localizar en el frente invasivo y también preferencialmente en el borde tumor-estroma (Nakayama *et al.*, 1998). Estos fibroblastos presentan un amplio secretoma donde además de factores de crecimiento también se pueden encontrar citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias como p.e. las interleuquinas-6 y -8. En concreto, en cáncer de colon, la interleuquina-6 se expresa de forma abundante y sus niveles se correlacionan con el estadio del cáncer y con la mortalidad (Chen y Huang, 2014).

Numerosos estudios sugieren que los CAF favorecen el proceso de carcinogénesis. El epitelio transformado del colon exhibe características de metabolismo anaeróbico como p.e. la expresión de lactato 5-deshidrogenasa y del factor HIF1 α . Además, muestra una eficiente absorción de glucosa y secreción de lactato. De forma complementaria, los CAF expresan proteínas implicadas en la absorción y oxidación del lactato y una baja tasa de absorción de glucosa (Koukourakis *et al.*, 2006).

En resumen, los CAF son fibroblastos activados capaces, en gran medida, de sustentar y apoyar el crecimiento tumoral y la metástasis (Chen y Huang, 2014).

2. LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN POR FACTORES WNT

2.1. LOS FACTORES WNT

Los factores Wnt son glicoproteínas de secreción que regulan numerosos procesos biológicos durante el desarrollo (Nusse, 2012). Están muy conservados en todos los animales metazoos (Gao *et al.*, 2014; MacDonald *et al.*, 2009). En mamíferos, existen 19 proteínas Wnt que tienen aproximadamente unos 350-400 aminoácidos (MacDonald *et al.*, 2009; Clevers y Nusse, 2012). Los factores Wnt pueden activar la vía Wnt/ β -catenina (vía canónica) u otras vías no canónicas que incluyen la vía de la polaridad celular planar (PCP) y la vía del calcio (Gao *et al.*, 2014).

Las proteínas Wnt son ricas en cisteínas y presentan modificaciones post-traduccionales (Gao *et al.*, 2014, MacDonald *et al.*, 2009). El factor Wnt3A de ratón fue el primero que se consiguió purificar y caracterizar bioquímicamente. Además de una glicosilación en el extremo amino-terminal, relevante para su secreción, también se descubrió un residuo de ácido palmítico unido a la cisteína 77 y otro de ácido palmitoleico a la serina 209, que son esenciales para su actividad biológica. La modificación y secreción de proteínas Wnt es un proceso complejo y altamente regulado en el que participan numerosas proteínas tales como porcupine, Wntless, etc (Gross y Boutros, 2013; Harterink y Korswagen, 2012).

2.2. LA VÍA WNT/ β -CATENINA O VÍA CANÓNICA

La vía Wnt/ β -catenina tiene un papel fundamental en muchos procesos durante el desarrollo y en la homeostasis del tejido adulto (Sugimura y Li, 2010). El efector principal de esta vía es la proteína β -catenina (Reya y Clevers, 2005, Sebio *et al.*, 2014). Esta ruta de señalización está regulada a distintos niveles, incluyendo muchos

puntos de control negativo o inhibición. En células no expuestas a factores Wnt, la mayoría de los componentes de la vía, incluyendo los receptores y la proteína β -catenina, se encuentran en un estado “apagado” (Nusse, 2012). Cuando la vía se encuentra inactiva, los niveles citoplasmáticos de β -catenina se mantienen bajos gracias a la acción de un complejo multiproteico denominado “complejo de destrucción de β -catenina” que está compuesto, entre otras, por las quinasas glucógeno sintasa quinasas 3 β (GSK3 β) y caseína quinasas 1 (CK1), y por las proteínas APC y Axina (Gao *et al.*, 2014; Nusse, 2012). La proteína β -catenina es fosforilada por CK1 en la serina 45 que la marca para que GSK3 β pueda fosforilarla en las serinas 33 y 37 y en la treonina 41. Esto genera un patrón de reconocimiento que permite reclutar a la E3 ubiquitina ligasa β -TrCP que ubiquitila a β -catenina, marcándola para ser degradada por el proteasoma (Gao *et al.*, 2014; Reya y Clevers, 2005; Nusse, 2012, **Figura 4 panel superior**).

Cuando un factor Wnt interactúa con su receptor de membrana, un heterodímero formado por un miembro de la familia Frizzled (Fzd) y por la proteína LRP5 o LRP6, se produce la estabilización de β -catenina y un incremento de sus niveles citoplasmáticos. El mecanismo no se conoce en detalle, pero se sabe que Axina se une a la cola citoplasmática de LRP5 o 6 de forma dependiente de Wnt y de fosforilación. Al mismo tiempo, algunos residuos de Axina son defosforilados por la proteína fosfatasa 1 (PP1) o la 2A (PP2A) impidiendo su interacción con β -catenina. Esto conlleva que β -catenina no pueda ser fosforilada y degradada y, por tanto, se acumule. Existen otros modelos alternativos que explican este proceso, pero el resultado final es siempre la acumulación de β -catenina en el citoplasma. Una fracción de esta β -catenina entra en el núcleo e interacciona con factores de transcripción de la familia TCF/LEF regulando la transcripción de sus genes diana (Krausova *et al.*, 2014; Nusse, 2012; **Figura 4 panel inferior**).

En el interior del núcleo, en ausencia de señales Wnt, los factores TCF/LEF están unidos a los elementos de respuesta presentes en las regiones reguladoras de los genes diana ejerciendo una acción inhibitoria a través del reclutamiento de co-represores como p.e. Groucho/TLE. La unión de β -catenina desplaza a estos co-represores y permite la entrada de co-activadores y otras proteínas que favorecen la activación de la transcripción. La mayoría de los genes diana de β -catenina/TCF son específicos de tejido, aunque alguno como p.e. *Axina2*, regulador negativo de la propia vía, es bastante global (Nusse, 2012).

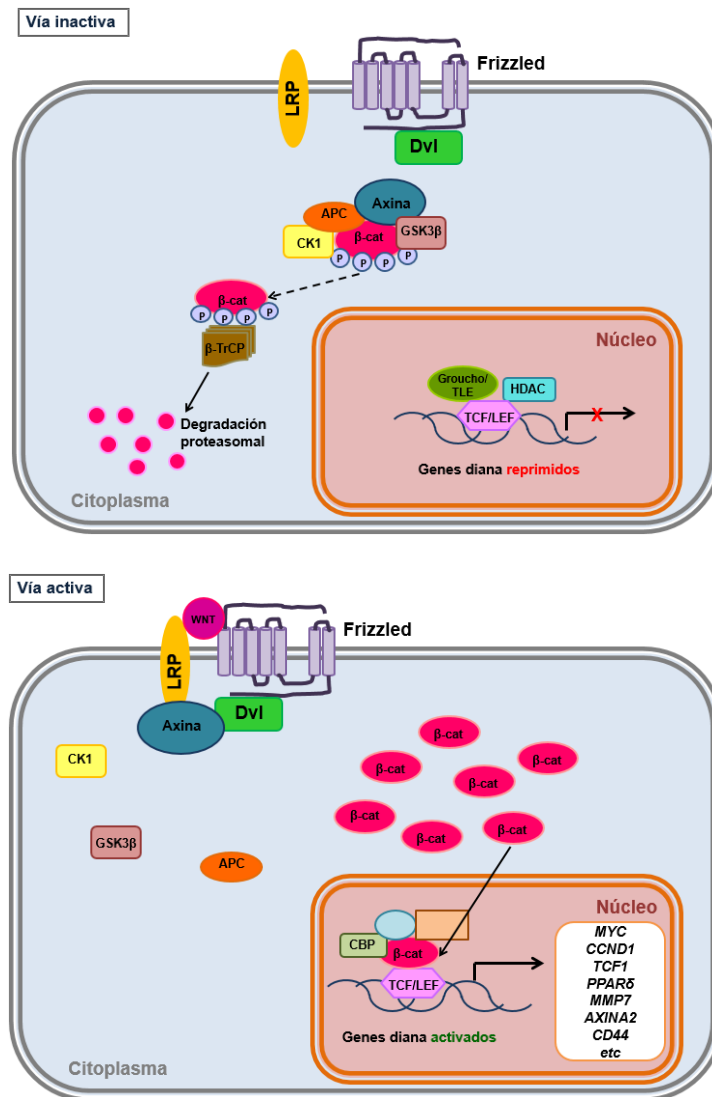


Figura 4. Esquema de la vía de señalización Wnt/β-catenina. En el panel superior se representan los eventos que se producen en la célula diana en ausencia de factores Wnt (vía inactiva). En el panel inferior se representan los eventos que acontecen en la célula diana en presencia de factores Wnt (vía activa).

2.3. LAS VÍAS WNT NO CANÓNICAS

Las vías Wnt no canónicas se caracterizan por no tener a β-catenina como elemento central para producir una respuesta celular. A diferencia de la vía canónica, el conocimiento que se tiene de ellas es mucho menor. Las dos vías no canónicas mejor caracterizadas son la vía Wnt/PCP y la vía del calcio (Niehrs, 2012).

En la vía Wnt/PCP los receptores Frizzled activan una cascada en la que participan las GTPasas RAC1 y RHOA, y la quinasa amino-terminal de c-Jun (JNK) produciendo cambios en el citoesqueleto y en la polaridad celular y/o activación de factores de

transcripción dependientes de JNK (Niehrs, 2012; Nusse, 2012; Gómez-Orte *et al.*, 2013; **Figura 5**).

La vía del calcio conlleva la activación de proteínas G heterotriméricas mediada por receptores Frizzled. Esto activa la fosfolipasa C (PLC) que estimula la producción de diacilglicerol y de inositol-1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃). La presencia de Ins(1,4,5)P₃ provoca la liberación de iones calcio de los compartimentos intracelulares, lo que conlleva la activación de efectores como la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina II (CAMKII), la calcineurina y la proteína quinasa C (PKC) que activan el factor de transcripción NFAT (Niehrs, 2012). Esta vía controla procesos tales como el destino y la migración celular (Gómez-Orte *et al.*, 2013; **Figura 5**).

Por otro lado, los factores Wnt también pueden unirse a los receptores tirosina quinasa ROR2 y RYK. Este mecanismo es mucho menos conocido, aunque, se sabe que pueden controlar las actividades de quinasas como JNK y c-Src, respectivamente (Nusse, 2012; Krausova *et al.*, 2014; **Figura 5**).

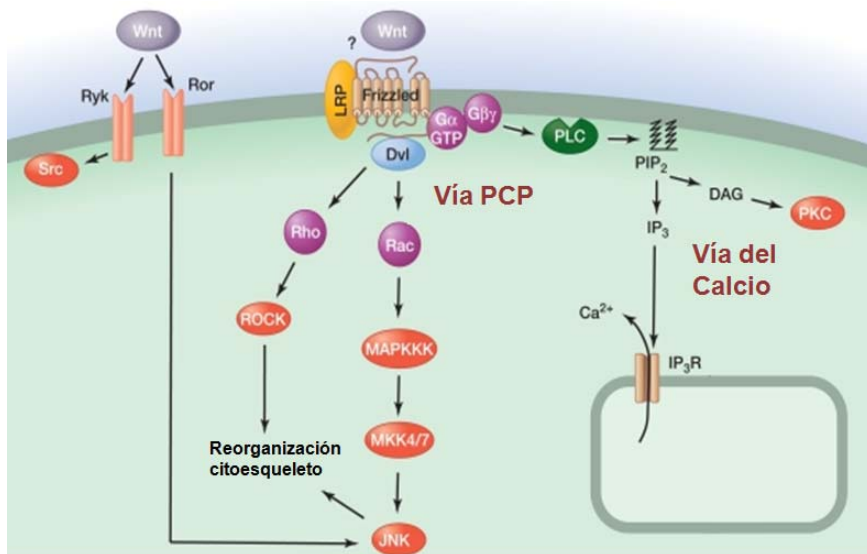


Figura 5. Esquema de las vías no canónicas de señalización por factores Wnt. Se representan la vía Wnt/PCP y la vía del calcio, que son las vías no canónicas mejor caracterizadas. También se muestran los efectores que se activan tras la interacción del factor Wnt con los receptores RYK y ROR (**Adaptada de: Nusse, 2012**).

Un hecho interesante es que tanto la vía Wnt/PCP como la vía del calcio pueden inhibir la vía Wnt/ β -catenina. En el caso de la vía Wnt/PCP, varios estudios indican que Wnt5A puede interferir en la formación del complejo β -catenina/TCF e inducir la degradación de β -catenina dependiente de la proteína Siah-2. Wnt5A, actuaría, por

tanto, sobre β -catenina o por debajo de ella en la vía (Ishitani *et al.*, 2003; Topol *et al.*, 2003). Datos más recientes, sin embargo, sugieren que Wnt5A inhibe la fosforilación de LRP6 inducida por Wnt3A, evitando por tanto la acumulación de β -catenina (Sato *et al.*, 2010). Por otro lado, la vía del calcio es capaz de inhibir la vía Wnt/ β -catenina a través de PKC. Esta quinasa puede fosforilar β -catenina y marcarla para que sea degradada por el proteasoma. También puede activar la quinasa NLK (*Nemo-like kinase*) que fosforila TCF/LEF y favorece que el complejo TCF/LEF/ β -catenina se disocie del ADN (James *et al.*, 2008).

2.4. REGULADORES DE LAS VÍAS WNT

La señalización por factores Wnt está regulada por un amplio rango de efectores que pueden actuar como agonistas o antagonistas, de forma intracelular, modulando componentes de la maquinaria de transducción de la señal, o de forma extracelular, a través de la modulación de las interacciones ligando-receptor (Cruciat y Niehrs, 2013).

2.4.1. Agonistas de la vía Wnt

Los principales agonistas de la vía Wnt son la proteína Norrin y la familia de las R-spondinas (Rspo; Cruciat y Niehrs, 2013).

La familia de las R-spondinas está compuesta por cuatro miembros en mamíferos (Rspo1 – Rspo4), que muestran un 60% de homología de secuencia y presentan un péptido señal, dos dominios amino-terminales ricos en cisteínas de tipo furina, seguidos por un dominio trombospondina tipo 1 y una región carboxilo-terminal cargada positivamente (Cruciat y Niehrs, 2013; Sharma *et al.*, 2015). Las R-spondinas modulan la señalización por factores Wnt a través de los receptores LGR4/5/6 asociados a proteínas G. En ausencia de R-spondina, la E3 ubiquitina ligasa de membrana ZNRF3 y su homóloga RNF43 actúan sobre el complejo receptor de proteínas Wnt promoviendo su endocitosis y, por lo tanto, debilitando la señal. Las R-spondinas se unen a la zona extracelular de ZNRF3/RNF43 y promueven su interacción con LGR4, lo que da lugar a la endocitosis de ZNRF3/RNF43 y a la intensificación de la señal Wnt. En resumen, las R-spondinas activan la señalización a través de la vía Wnt/ β -catenina inhibiendo la acción de ZNRF3/RNF43 de una forma LGR dependiente y que da lugar a la acumulación de receptores Wnt en la superficie celular (**Figura 6A**). Las R-spondinas también pueden actuar como agonistas de la vía

Wnt/PCP. En concreto, la R-spondina 3 se une a Sdc4 mediante su dominio trombospondina y promueve su endocitosis mediada por clatrina, lo que es esencial para la transducción de la señal Wnt/PCP (**Figura 6B**; Cruciat y Niehrs, 2013).

Norrin es un ligando que no muestra homología de secuencia con las proteínas Wnt pero que puede activar la vía Wnt/ β -catenina uniéndose a los mismos receptores a los que se unen los factores Wnt. En concreto, Norrin se une a Fzd4 (Malinauskas y Jones, 2014). La especificidad de ligando viene determinada por la proteína tetraspanina-12 (TSPAN12). La presencia de TSPAN12 en el complejo receptor promueve específicamente la señalización inducida por Norrin, pero no por proteínas Wnt (**Figura 6C**; Cruciat y Niehrs, 2013; Deng *et al.*, 2013).

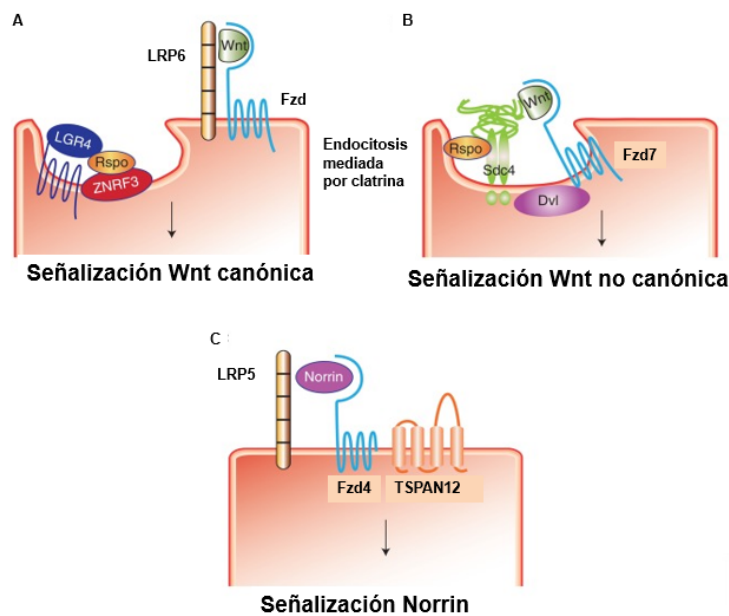


Figura 6. Modelos de activación de la señalización por factores Wnt. (A) Rspo se une a ZNRF3 y LGR4 e induce la endocitosis del receptor mediada por clatrina. Una vez internalizado, ZNRF3 no es ya capaz de ubiquitilar y marcar los receptores Wnt para su degradación. Como consecuencia, Fzd y LRP6 se acumulan en la membrana plasmática y permiten la transmisión de la señal. (B) La unión de Rspo3 a Sdc4 induce la endocitosis mediada por clatrina del complejo receptor para proteínas Wnt y activa la señalización Wnt no canónica. (C) TSPAN12 es parte del complejo de señalización Norrin/Fzd4/LRP5 e induce la señalización Norrin/ β -catenina (**Adaptada de: Cruciat y Niehrs, 2013**).

2.4.2. Antagonistas de la vía Wnt

Las vías de señalización por factores Wnt pueden ser reguladas por un gran número de inhibidores fisiológicos que actúan en las diferentes etapas de la vía (Filipovich *et al.*, 2011). Pueden ser inhibidores extracelulares (p.e. las familias Dickkopf y sFRP,

WIF-1, Cerberus, etc), citoplasmáticos (p.e. WT-1, la familia Naked, etc) o nucleares (p.e. ICAT, NLK, etc).

A continuación, se describen con mayor detalle aquellos inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina que serán importantes para la comprensión del trabajo realizado en esta Tesis doctoral.

2.4.2.1. La familia Naked (NKD)

La familia Naked está formada por dos proteínas: Naked1 (NKD1) y Naked2 (NKD2). Aunque su localización es citoplasmática, hay evidencias que sugieren que también se pueden encontrar asociadas a la membrana plasmática e incluso en el núcleo (Filipovich *et al.*, 2011). Su mecanismo de actuación no está del todo claro, pero parece que su capacidad de antagonizar la vía Wnt es dependiente de miristoilación (Hu *et al.*, 2010). Se unen a Dishevelled (Dsh/DVL), uno de los componentes de la vía Wnt, a través de un motivo del tipo *EF-hand* (Rousset *et al.*, 2002; Rousset *et al.*, 2001; Wharton *et al.*, 2001) y podrían inhibir la vía Wnt/ β -catenina facilitando la defosforilación de DVL mediada por PP2A (Creyghton *et al.*, 2005). Sin embargo, trabajos recientes en *Drosophila* proponen que la interacción entre Dsh y Nkd no es necesaria para la función de esta última, y sugieren que la función de Dsh es mantener a Nkd en el citoplasma, donde probablemente funciona controlando el transporte citoplasma-núcleo de componentes críticos para la vía como p.e. armadillo (β -catenina, en vertebrados) (Larraguibel *et al.*, 2015). De acuerdo con esto, células de cáncer de colon que tienen NKD1 mutado presentan niveles de β -catenina más altos que aquellas que tienen la proteína silvestre (Guo *et al.*, 2009).

Existen también evidencias de que la familia NKD, además de antagonizar la vía canónica, puede inhibir la vía Wnt/PCP a través de la activación de JNK (Yan *et al.*, 2001; Van Raay *et al.*, 2007).

2.4.2.2. Adenomatosis Polyposis Coli Down-regulated 1 (APCDD1)

APCDD1 es una glicoproteína asociada a membrana que es además diana transcripcional de la vía Wnt/ β -catenina (Takahashi *et al.*, 2002; Cruciat y Niehrs, 2013; Filipovich *et al.*, 2011). Forma dímeros y presenta un dominio con 12 residuos de cisteína que suele ser un motivo importante en la interacción entre los factores Wnt y sus receptores (Shimomura *et al.*, 2010). Puede unirse a Wnt3A y al dominio

extracelular de LRP5 *in vitro*, por lo que podría inhibir la vía Wnt evitando la unión entre Wnt y Fzd (Cruciat y Niehrs, 2013; Filipovich *et al.*, 2011).

2.4.2.3. La familia Dickkopf (DKK)

La familia DKK está formada por cuatro proteínas de secreción (DKK1-4; Niehrs, 2006; Cruciat y Niehrs, 2013; Boudin *et al.*, 2013). Todos sus miembros se caracterizan por tener un péptido señal y dos dominios ricos en cisteínas (CRD). Mientras que el CRD amino-terminal es único en los miembros de la familia DKK, el CRD carboxilo-terminal presenta homología con los dominios colipasa presentes en otras muchas proteínas (Cruciat y Niehrs, 2013; Niehrs, 2006; Elston y Clifton-Bligh, 2010). Dentro de la familia, DKK1, 2 y 4 presentan un grado de similitud más alto, mientras que la estructura de DKK3 es diferente (Cruciat y Niehrs, 2013; Boudin *et al.*, 2013; Niehrs, 2006).

De las diferentes vías de señalización activadas por los factores Wnt, las proteínas DKK actúan específicamente sobre la cascada de señalización Wnt/ β -catenina. El miembro más estudiado de esta familia es DKK1. Esta proteína puede inhibir la señalización Wnt/ β -catenina a través de dos mecanismos. En el mecanismo principal, DKK1 se une al co-receptor LRP con alta afinidad, evitando la formación del complejo ternario Wnt/Fzd/LRP y, por tanto, la señalización Wnt/ β -catenina (Mao *et al.*, 2001; Bafico *et al.*, 2001; Semenov *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2011). En un segundo mecanismo, DKK1 se une a otro receptor de alta afinidad, Kremen 1/2, y a LRP. La formación de este complejo ternario provoca la endocitosis y la retirada de la membrana de LRP lo que conlleva la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina (Mao *et al.*, 2002). Sin embargo, experimentos realizados con ratones deficientes en los genes *Kremen* mostraron que las proteínas Kremen no son imprescindibles para la actividad inhibidora de DKK1 (Ellwanger *et al.*, 2008).

DKK1 y DKK4 actúan como inhibidores puros de la vía Wnt/ β -catenina. En cambio, DKK2 y DKK3 pueden activar o inhibir la vía dependiendo del contexto celular (Niehrs, 2006; Yue *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

3. LAS PLAKOFILINAS

La familia de proteínas *armadillo* está constituida por tres subfamilias: las proteínas armadillo clásicas (donde encontramos a β -catenina y plakoglobina), la familia de la

p120^{ctn} (donde encontramos a p120^{ctn} y δ -catenina, entre otras) y la familia de las plakofilinas (donde encontramos a plakofilina-1, plakofilina-2 y plakofilina-3; Bass-Zubek *et al.*, 2009; Hatzfeld, 2007; **Figura 7**). Las plakofilinas, al igual que el resto de proteínas de la familia armadillo, se caracterizan por la presencia de un dominio central con repeticiones de 40-45 aminoácidos de longitud que reciben el nombre de repeticiones *armadillo* (*arm-repeat*). Estos sitios proporcionan una zona de anclaje muy versátil para la interacción con otras proteínas (Keil *et al.*, 2013).

Las plakofilinas suelen encontrarse en la cara citoplasmática de los desmosomas, donde participan en la interacción entre los filamentos intermedios del citoesqueleto y la placa de unión. La proteína p0071, también conocida como plakofilina-4, se asocia frecuentemente con las plakofilinas; sin embargo, su presencia en los desmosomas es un tema que está todavía en discusión (Bass-Zubek *et al.*, 2009).

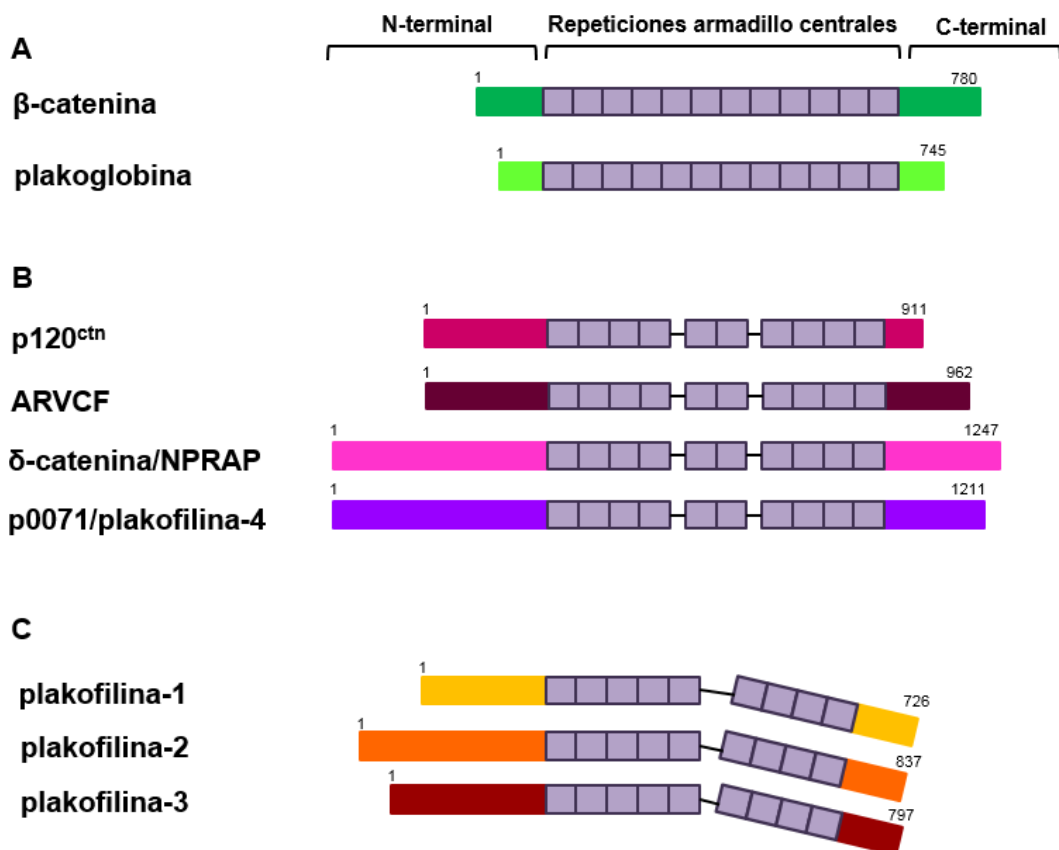


Figura 7. Comparación de las estructuras de la familia de proteínas armadillo. (A) Proteínas de la familia armadillo clásicas. **(B)** Proteínas de la familia p120^{ctn}. **(C)** Proteínas de la familia de las plakofilinas. Los números indican el número de aminoácidos (**Adaptada de: Bass-Zubek *et al.*, 2009**).

3.1. ESTRUCTURA

Las plakofilinas, al igual que los miembros de la familia p120^{ctn}, poseen dominios amino-terminales más extensos que los miembros fundadores de la familia armadillo, β -catenina y plakoglobina (Bass-Zubek *et al.*, 2009). En el caso concreto de las plakofilinas, es en el dominio amino-terminal donde encontramos la mayoría de sitios de interacción con otras proteínas como p.e. desmoplakina, desmocolinas, demogleinas y filamentos intermedios (Smith y Fuchs, 1998; Kowalczyk *et al.*, 1999; Hatzfeld *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2000). Por otro lado, su dominio carboxilo-terminal se caracteriza por ser de poca longitud (Bass-Zubek *et al.*, 2009).

Las plakofilinas 1-3 presentan una similitud de secuencia en el dominio de repeticiones armadillo de entre el 51 y el 60,9%. Ésta es de aproximadamente el 50% con los miembros de la familia p120^{ctn}. Las plakofilinas se caracterizan por tener 9 repeticiones armadillo en su dominio central y se ha observado que entre las repeticiones 5 y 6 hay un polipéptido que permite formar una “cuña” en la estructura de la proteína. Esta conformación puede ser una forma de proporcionar un mecanismo de regulación para la unión de las diferentes proteínas que interaccionan con ellas (Bass-Zubek *et al.*, 2009). Aunque el dominio amino-terminal es bastante variable, existe una secuencia consenso que se conoce como HR2 y que está presente en todos los miembros de la familia (Arimoto *et al.*, 2014).

3.2. FUNCIÓN Y PATRÓN DE EXPRESIÓN

Las plakofilinas-1, -2 y -3 se encuentran formando parte de los desmosomas donde interactúan con varios grupos de proteínas. Los desmosomas son uniones intercelulares y se encargan de conectar las redes de filamentos intermedios con puntos de fuerte unión entre células. Son estructuras muy importantes, ya que son las encargadas de proporcionar resistencia a los tejidos que se encuentran sometidos a estrés mecánico como la piel o el tejido cardíaco (Hatzfeld, 2007).

Aunque el patrón de distribución de las tres plakofilinas se superpone, existe cierta distribución diferencial. Plakofilina-1 se encuentra en los desmosomas de las capas diferenciadas del epitelio estriado. Por su parte, plakofilina-2 se expresa en todo el epitelio simple, complejo y estriado y, además, es el único miembro de la familia de las plakofilinas que se encuentra en tejido cardíaco. Plakofilina-3 se distribuye igual a lo largo de todas las capas epiteliales y está presente en la mayoría de epitelios simples y estratificados, excepto en hepatocitos (Bass-Zubek *et al.*, 2009).

Varios autores han descrito que las tres plakofilinas están también presentes en el núcleo (Schmidt *et al.*, 1997; Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010; Mertens *et al.*, 2001; Bonné *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2014). Aunque no se conoce bien cuál es su función en ese compartimento, se cree que pueden participar en la transcripción génica. Por otro lado, plakofilina-3 podría participar en la regulación post-transcripcional interaccionando con proteínas de unión al ARN (Bass-Zubek *et al.*, 2009).

3.3. PLAKOFILINA-2

El gen *PKP2* que codifica la proteína plakofilina-2 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12 en la posición 11 (Homo sapiens Annotation Release 108, GRCh38.p7). Al igual que plakofilina-1, plakofilina-2 presenta dos isoformas conocidas como 2a y 2b. La isoforma más corta, la 2a y la variante más larga, la 2b, se diferencian en la inserción de 44 aminoácidos entre las repeticiones armadillo 3 y 4 que corresponde al exón 6 (Hatzfeld, 2007).

Tal y como se ha descrito previamente, plakofilina-2 se encuentra formando parte de las placas desmosomales, tanto del epitelio simple como del complejo. Además, se ha encontrado en desmosomas de ciertos epitelios estratificados coexistiendo con plakofilina-1 y plakofilina-3 (Hatzfeld, 2007). También, se ha descrito la presencia de plakofilinas en la membrana celular, en el citoplasma y en el interior del núcleo (Koetsier *et al.*, 2014). La localización nuclear de plakofilina-2 parece menos prominente que la descrita para plakofilina-1. Aun así, Mertens y colaboradores demostraron que plakofilina-2 podía interaccionar con la subunidad más grande de la ARN polimerasa III, aunque el papel funcional de esta interacción no está claro (Mertens *et al.*, 2001). Otros autores han publicado una posible interacción entre plakofilina-2 y β -catenina, que podría afectar a la transcripción de los genes diana de la segunda (Chen *et al.*, 2002; Bass-Zubek *et al.*, 2009).

La regulación de la localización intracelular de plakofilina-2 parece estar controlada, al menos en parte, por la quinasa asociada a Cdc25C (*Cdc25C-associated kinase 1*; C-TAK1). Se cree que plakofilina-2 es fosforilada por C-TAK1 generándose un sitio de anclaje para la proteína 14-3-3, que no encontramos en las demás plakofilinas, y que parece que puede alterar la localización de plakofilina-2 (Müller *et al.*, 2003).

Como ya se ha descrito anteriormente, plakofilina-2 es el único miembro de la familia de las plakofilinas que se encuentra en el corazón. Es precisamente en el tejido cardíaco de vertebrados superiores donde participa en la formación de unas

estructuras híbridas donde interactúan proteínas tradicionalmente desmosomales y otras que se suelen encontrar en las uniones adherentes. Estas estructuras se conocen como *area composita* y, entre otras cosas, se encargan de estabilizar las uniones *gap* adyacentes. Plakofilina-2, y también desmocolina-2, interaccionan con conexina 43 y la disminución de los niveles de plakofilina-2 conlleva que conexina 43 no se localice correctamente, lo que altera la corriente de sodio. Así pues, existe una conexión entre las proteínas desmosomales y la maquinaria eléctrica que controla la conducción en el corazón (Patel y Green, 2014; Dubash *et al.*, 2016). Más relevante aún, las mutaciones en plakofilina-2 son la principal causa de la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (MAVD), una enfermedad del músculo cardíaco responsable de buena parte de los casos de muerte súbita en adultos jóvenes (Gerull *et al.*, 2004; Van Tintelen *et al.*, 2006).

El papel de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en células epiteliales y en líneas celulares de cáncer de colon se encuentra ampliamente descrito en la literatura científica. Sin embargo, no encontramos estudios que describan el efecto de los factores Wnt en los fibroblastos pericriptales del colon. Es muy probable que los factores Wnt secretados por estos fibroblastos, no sólo se unan a sus receptores en las células epiteliales de la mucosa colónica sino que también actúen sobre los propios fibroblastos generando un bucle de señalización autocrina. Por este motivo, decidimos estudiar la respuesta transcripcional al factor Wnt3A de la línea de fibroblastos de colon humano CCD-18Co, que es la única línea de este tipo disponible en el mercado.

Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis doctoral es el estudio del efecto del factor canónico Wnt3A sobre la expresión génica de la línea de fibroblastos de colon humano CCD-18Co. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis del transcriptoma inducido por Wnt3A en la línea celular CCD-18Co.
2. Validación de genes diana/regulados por Wnt3A.
3. Estudio de genes diana seleccionados.

Materiales y Métodos

1. CULTIVOS CELULARES Y FACTORES WNT

En esta Tesis doctoral se han utilizado, principalmente, la línea celular de fibroblastos de colon humano CCD-18Co (ATCC, CRL-1459), la línea celular de fibroblastos de pulmón humano IMR-90 (ATCC, CCL-186) y la línea embrionaria de riñón humano HEK-293T. Como control, en varios experimentos, se han utilizado las líneas de cáncer de colon: ADH-SW480 y DLD-1, y la línea de sarcoma de Ewing A673.

Los fibroblastos de colon humano CCD-18Co se cultivaron en *Minimum Essential Medium* (MEM, Life Technologies, 10370-047). El resto de líneas celulares se cultivaron en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Life Technologies, 41966-029). En todos los casos se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS, Life Technologies, 10270-106) y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (Life Technologies, 15140-122). Al medio MEM se le añadió además 2 mM de L-glutamina (Life Technologies, 25030-024) y 1mM de piruvato sódico (Life Technologies, 11360-039).

Todas las células se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C, en una atmósfera húmeda y con un porcentaje de CO₂ del 5%. La ausencia de micoplasmas ha sido comprobada periódicamente mediante PCR convencional. Asimismo, las líneas celulares han sido autenticadas periódicamente con el sistema *GenePrint* (Promega) y los resultados comparados con la base de datos de la ATCC (*American Type Culture Collection*) en el servicio de genómica del IIBm.

Donde se indica, las células fueron tratadas con proteína Wnt3A recombinante humana (200 µg/ml, R&D systems, 5036-WNP-010), disuelta en 0,1% de albumina bovina (BSA, Sigma, A7906) en tampón fosfato salino (PBS), hasta alcanzar una concentración final en el cultivo de 100 ng/ml, o con el correspondiente volumen de vehículo. También, donde se indica, las células fueron tratadas con proteína Wnt5A recombinante humana (100 µg/ml, R&D systems, 645-WN-010) disuelto en 0,1% de PBS-BSA hasta alcanzar una concentración final de 300 ng/ml, o el correspondiente volumen de vehículo. En algunos ensayos las células fueron tratadas con el compuesto XAV-939 (4 mM, Sigma, X3004) disuelto en DMSO hasta alcanzar una concentración final de 1µM o con Actinomicina D (1 mg/ml, Sigma, A1410) disuelta en DMSO hasta alcanzar una concentración final de 5 µg/ml o con el correspondiente volumen de vehículo.

2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS NORMALES Y TUMORALES DE COLON HUMANO

Los cultivos primarios de fibroblastos de colon humano normales y tumorales se establecieron a partir de explantes de tejido (Herrera *et al.*, 2013; Ferrer-Mayorga *et al.*, 2016) procedentes de muestras quirúrgicas frescas, tanto de tumor primario de colon como de mucosa colónica de morfología normal (mínimo a 5 cm del margen quirúrgico), del mismo paciente, con cáncer de colon, en el Hospital Universitario La Paz (Madrid). Las muestras fueron proporcionadas por el biobanco del IdiPAZ (RD09/0076/00073) integrado en la Red de Biobancos Españoles (www.redbiobancos.es). Brevemente, las muestras de tejido se incubaron durante 30 minutos con PBS suplementado con 0,5 mg/ml de Primocin™ (Invivogen, ant-pm-1), 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies, 15750-060) y 0,5 µg/ml de anfotericina-B (Life Technologies, 15290-018). A continuación, se cortaron en pequeñas piezas de aproximadamente 3 mm³ y se sembraron en frascos de cultivo con FBS y 0,25 mg/ml de Primocin™. Una semana después, para facilitar el crecimiento de los fibroblastos, se sustituyó el FBS por FGM-2 (*Fibroblasts Growth Medium-2*, Lonza, CC-3132) que incluye FBM (*Fibroblasts Basal Medium*, Lonza, CC-3131) + *Bulletkit* (Lonza, CC-4126). Durante 3 semanas se dejaron crecer los fibroblastos alrededor de los explantes. Pasado este tiempo se retiraron los fragmentos de tejido y se pasaron a nuevas placas en una proporción 1:2 en FGM-2. Los experimentos se realizaron con fibroblastos primarios en pase 7 o inferior. Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Paz (HULP-PI-1425) y todos los pacientes han firmado el preceptivo consentimiento informado. Este procedimiento se realizó en estrecha colaboración con Gemma Ferrer Mayorga y la Dra. María Jesús Larriba, ambas en el laboratorio del Dr. Alberto Muñoz (CSIC).

3. SECUENCIACIÓN DE ARN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los fibroblastos de colon humano CCD-18Co fueron estimulados con Wnt3A recombinante o con el volumen correspondiente de vehículo durante 24 h. Se realizaron 3 réplicas biológicas por muestra, se obtuvieron ARN totales de las mismas y se secuenciaron usando un equipo Illumina HiSeq 2000 (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO). El análisis de imagen, la identificación de bases y la calidad del alineamiento se realizaron usando el paquete informático *Illumina Real Time Analysis software*. La conversión de archivos Illumina BCL a formato bam se hizo

con la herramienta Illumina2bam (Wellcome Trust Sanger Institute-NPG). Utilizamos el programa TopHat (versión 2.0.14; Kim *et al.*, 2013) con parámetros estándar para el alineamiento de los archivos fastq frente a la versión hg19/GRCh37.75 del genoma de referencia humano (Cunningham *et al.*, 2015). La cuantificación de los alineamientos a elementos génicos la realizamos con la función HTSeq-counts del paquete HTSeq version 0.6.0 usando el modelo génico del ensamblado GRCh37.75 en formato GTF. La normalización del número crudo de lecturas por gen y el análisis estadístico de expresión diferencial se realizaron con el paquete edgeR versión 3.12.1. EdgeR es un paquete Bioconductor para el análisis de la expresión diferencial de datos de expresión génica digital (Robinson *et al.*, 2010) diseñado para el programa estadístico R. Todo el trabajo bioinformático incluido en esta Tesis doctoral se ha realizado en colaboración con el Dr. Luis del Peso (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UAM-CSIC).

4. EXTRACCIÓN DE ARN, RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la extracción de ARN total se utilizó el *RNeasy Mini kit* (Qiagen, 74104) y el ARN obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se partió de 500 ng de ARN total y se utilizó el kit *Im Prom-II™ Reverse Transcription System* (Promega, A3800) siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción de PCR convencional para estimar la expresión de receptores Frizzled en los fibroblastos de colon humano CCD-18Co se realizó con el *Certamp Kit for complex amplifications* (Biotools, 10.342) en un termociclador T100™ *Thermal cycler* (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones usadas se detallan en la **Tabla 1** y las secuencias de los cebadores en la **Tabla 2**.

Tabla 1. Condiciones de la PCR para la amplificación de los genes *FZD*

35 CICLOS				
95°C	94°C	58°C	72°C	72°C
3min	30s	30s	1-1,30min	10min

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes *FZD*

Gen	Secuencia oligonucleótidos directa (5'- 3')	Secuencia oligonucleótidos reversa (5'- 3')	Tamaño amplicón (pb)
<i>FZD1</i>	CTCTACTTCTTCAGCATGGCCA	TCCACGTTGTTAAGCCCCA	230
<i>FZD2</i>	CCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCT	GCAGCCCTCCTTCTTGGT	306
<i>FZD3</i>	TCCCCTCTGCCTGTATGTGGTAGT	GCTGCTCACTTTGCTGTGGA	622
<i>FZD4</i>	CTCGGCTACAACGTGACCAAGAT	AATATGATGGGCGCTCAGGGTA	605
<i>FZD5</i>	GTGCCATTCTGAAGGAGTCAC	TCCATGTCGATGAGGAAGGTG	197
<i>FZD6</i>	ACTCTTGCCACTGTGCCTTTG	GTCGAGCTTTTGCTTTTGCCT	300
<i>FZD7</i>	CAAGACCGAGAAGCTGGAGAAG	TGCCGACGATCATGGTCAT	248
<i>FZD8</i>	GGACTACAACCGCACCGACCT	ACCACAGGCCGATCCAGAAGAC	407
<i>FZD9</i>	TCAAGGTCAGGCAAGTGAGCA	AGCTTCCAGAGGAACGCAACA	210
<i>FZD10</i>	CAGGTGTGCCAGCCGTAGGTAA	AAGCACCACATCTTAGCTCCGG	212

Para determinar la isoforma de Plakofilina-2 presente en las células CCD-18Co e IMR-90 realizamos también una PCR convencional, pero en este caso usamos el enzima *DNA polymerase* 1U/μl (Biotools, 10.002) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones utilizadas se detallan en la **Tabla 3** y los cebadores empleados en la **Tabla 4**.

Tabla 3. Condiciones de la PCR para la determinación de la isoforma de Plakofilina-2 presente en las células CCD-18Co e IMR-90

40 CICLOS				
94°C	94°C	55°C	72°C	72°C
5min	15s	30s	30s	7min

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados en la determinación de la isoforma de Plakofilina-2 presente en las células CCD-18Co e IMR-90

Dirección	Secuencia 5'-3'	Longitud (pb)
Directa	GCATCCTCAAGCTTCTGC	18
Reversa	TGATATTCTCCGTCAGCG	18

Las RT-PCR cuantitativas (RT-qPCR) se realizaron en un termociclador CFX384 *Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) usando una *TaqMan Master Mix II*, sin UNG (Applied Biosystems, 4440040) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La PCR se inició con una etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y continuó con 40 ciclos con la siguiente secuencia: desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, anillamiento y elongación a 60°C durante 30 segundos. Las sondas TaqMan utilizadas fueron: *PKP2* (Hs00428040_m1), *PTGER3* (Hs00168755_m1), *APCDD1* (Hs00537787_m1), *DKK2* (Hs00205294_m1), *NKD1* (Hs00263894_m1), *NKD2* (Hs01108239_m1), *WNT16* (Hs00365138_m1), *TRPA1* (Hs00175798_m1), *ODZ3* (Hs01111780_m1), *MYH2* (Hs01126505_m1), *KRT19* (Hs01051611_m1), *PKP1* (Hs00240873_m1), *PKP3* (Hs00170887_m1), y *PKP4* (Hs00269305_m1) (Applied Biosystems). Los niveles de expresión se normalizaron usando la sonda RPLPO humana (*Human Ribosomal Protein Control*, TaqMan, 4310879E) y se calcularon con el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los valores de C_t (*Cycle Threshold*, ciclo en el que los productos de PCR inician su fase exponencial de amplificación) para cada gen se obtuvieron usando el programa Bio-Rad CFX Manager. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5. INMUNOTRANSFERENCIA (Western blot)

Los extractos celulares fueron preparados lisando el cultivo celular con tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1% Tritón X-100 (Sigma, T8787), 1% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl pH 7,2, 1 pastilla de cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, Easypack (1 pastilla por cada 10ml, Roche, 05 892 791 001), 0,5 mM DTT, 1 mM NaVO_4 , 10 mM β -glicerofosfato y 1 mM NaF) durante 20 minutos en hielo. Seguidamente, se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 13.200 rpm a 4°C para eliminar los restos celulares. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad, 1620177). Seguidamente, las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche desnatada en polvo (Difco, 232100) o 5% de BSA, dependiendo del anticuerpo, en tampón Tris salino (TBS) - 0,1% Tween 20 (Sigma, 5927) durante 1 hora y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra la proteína de interés (**Tabla 5**). El día siguiente, cada membrana se lavó 4 veces con TBS - 0,1% Tween 20 durante 1 hora en total (15 minutos/lavado) y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP) durante 45 minutos a temperatura ambiente (**Tabla 6**). Tras la incubación, cada

membrana se lavó de nuevo 4 veces con TBS - 0,1% Tween 20 durante 1 hora. Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se visualizaron usando el sistema de detección *ECL detection system* (GE Healthcare, RPN2209). Las películas de rayos X (Agfa, ENKMOV) se escanearon con un escáner HP Scanjet G2710 y las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe Photoshop CS6. Las cuantificaciones se realizaron con el programa ImageJ.

Tabla 5. Anticuerpos primarios usados

Anticuerpo	Especie	Compañía	Dilución
β -catenina	Ratón	BD Transduction Laboratories™ (610154)	1:1000
GSK3 β	Ratón	BD Transduction Laboratories™ (610201)	1:1000
β -actina	Cabra	Santa Cruz Biotechnology (sc-1616)	1:2000
Naked-2	Conejo	Cell signalingTechnologies (#2073)	1:1000
Plakofilina-2	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc-136039)	1:250

Tabla 6. Anticuerpos secundarios usados

Antígeno	Compañía	Dilución
anti-conejo	Jackson Laboratories (111-035-045)	1:10000
anti-ratón	Promega (W402B)	1:10000
	GE Healthcare (NXA931)	1:5000
anti-cabra	Santa Cruz Biotechnology (sc-2020)	1:10000

Además de extractos proteicos totales (*whole-cell*), en algunas ocasiones se obtuvieron extractos citosólicos usando el procedimiento previamente descrito (González-Sancho *et al.*, 2004). Brevemente, se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron dos veces con TBS suplementado con 2 mM de cloruro cálcico. A continuación, se añadieron 800 μ l de TBS y se rascaron las placas, separando las células del plástico. El contenido de cada placa fue decantado en un homogeneizador Dounce enfriado previamente y tras la lisis mecánica se pasó a un tubo eppendorf. Una vez procesadas todas las placas, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos

a 4.000 rpm a 4°C para sedimentar los núcleos y los restos celulares. Los sobrenadantes se recogieron en tubos de ultracentrífuga que habían sido marcados previamente, se equilibraron y se realizó una centrifugación a 29.000 rpm a 4°C durante 90 minutos. Al terminar la centrifugación, se pasó el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y se procesaron las muestras igual que se ha descrito para los extractos totales.

6. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

Se sembraron células L control y células L que expresan Wnt3A (Willert *et al.*, 1999) en placas Petri de 100 mm de diámetro. Cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 80% se les añadió medio DMEM suplementado con 10% FBS y se dejó que el cultivo condicionase el medio durante 72 horas. A continuación, se recogió el medio condicionado, se centrifugó para eliminar los restos celulares, y el sobrenadante se congeló a -80°C para su uso posterior.

7. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células CCD-18Co se sembraron en una placa de 24 pocillos donde previamente se había colocado un portaobjetos circular de cristal de 10 mm de diámetro por pocillo. Veinticuatro horas después, se trataron con medio condicionado control o condicionado con Wnt3A y se incubaron durante 24 horas adicionales. Transcurrido dicho tiempo se realizó un lavado rápido con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído al 3,7% durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Seguidamente, se hicieron dos lavados de 5 minutos en agitación suave y se permeabilizó durante 15 minutos con 0,5% Tritón X-100 en PBS. Tras 3 lavados de 5 minutos, los portaobjetos se incubaron con albúmina bovina al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave para bloquear los epítomos inespecíficos. A continuación, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario contra Plakofilina-2 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, sc-136039) a 4°C durante toda la noche. La mañana siguiente, después de 3 lavados de 5 minutos con PBS, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con el fluorocromo *Alexa Fluor*® 488 (Thermo Fisher, A-11029) durante 1 hora a 37°C y en oscuridad. Tras el periodo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS y se montaron usando el producto *prolong antifade* (Life Technologies, P36960). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio invertido confocal espectral LSM710

(Zeiss) usando un objetivo Plan_APOCHROMAT 63X AN1,4. Para la adquisición y análisis de las imágenes se usó el programa Zen 2009.

8. CONSTRUCCIONES DE LAS REGIONES REGULADORAS DEL GEN PKP2

A partir de ADN genómico obtenido de fibroblastos de colon humano CCD-18Co se amplificaron por PCR dos regiones del promotor del gen *PKP2*. La PCR se realizó con el *Certamp Kit for complex amplifications* y se usaron los oligonucleótidos 5'-CATCTCAGCATCATGGTTGG-3' y 5'-GAGAACTCCAACAAGAGGC-3' para amplificar el fragmento -1509/-735 cuya secuencia presentaba siete posibles sitios de unión del complejo β -catenina/TCF, y 5'-TTAATCAACGTTAGCAGGGC-3' y 5'-ACAGGATGGATTTCCGCTCG-3' para amplificar el fragmento control -817/-299, sin ningún sitio predicho para este complejo. Las condiciones de la PCR se detallan en la **Tabla 7**. Los productos de PCR se clonaron en el vector con selección de color pGEM-T easy (Promega, A1360) y se secuenciaron.

Tabla 7. Condiciones de la PCR para la obtención de los fragmentos -1509/-735 y -817/-299 del promotor de *PKP2*

35 CICLOS				
95°C	94°C	53°C	72°C	72°C
3min	30s	30s	1min	10min

A continuación, se realizó una segunda PCR para generar sitios de restricción. Los cebadores que se utilizaron para este objetivo fueron: 5'-TTGGTACCTTCTATTGGGGTGGGAGC-3' y 5'-ATAAAGCTTGAGAACTCCAACAAGAGGC-3' para el fragmento -1509/-735, y 5'-ATGGTACCTTAATCAACGTTAGCAGGGC-3' y 5'-TACAAGCTTACAGGATGGATTTCCGCTCG-3' para el fragmento -817/-299. Las condiciones para la PCR se detallan en la **Tabla 8**. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción KpnI y HindIII (New England Biolabs, R0142S y R0104S), clonados en el vector reportero pGL4.23 (Promega, 9PIE841) y secuenciados.

Tabla 8. Condiciones de la PCR para la obtención de dianas de restricción en los fragmentos -1509/-735 y -817/-299 del promotor de *PKP2*

35 CICLOS				
95°C	94°C	63°C	72°C	72°C
3min	30s	1min	1min	10min

La región *enhancer* -20666/-20091 de *PKP2* fue amplificada por PCR usando el mismo ADN molde y el mismo Kit que se usó para el promotor. Los oligonucleótidos usados fueron: 5'-CGGTTTTACTCAAGTAAGC-3' y 5'-GCAATCTTCTTGATGAGTAG-3'. Las condiciones de la PCR se detallan en la **Tabla 9**. El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega) y se secuenció.

Tabla 9. Condiciones de la PCR para la amplificación de la región *enhancer* -20666/-20091

35 CICLOS				
94°C	94°C	49°C	72°C	72°C
3min	30s	1min	1min	10min

Posteriormente, se realizó una segunda PCR para generar dianas de restricción para la enzima KpnI. Para ello los cebadores utilizados fueron: 5'-TTGGTACCCGGTTTTACTCAAGTAAGC-3' y 5'-ATGGTACCGCAATCTTCTTGATGAGTAG-3'. Las condiciones de la PCR se detallan en la **Tabla 10**. El producto de PCR fue digerido con KpnI y se clonó en el vector pGL4.23. La región *enhancer* se clonó tanto en orientación directa (-20666/-20091) como en reversa (-20091/-20666) y ambas fueron secuenciadas.

Tabla 10. Condiciones de la PCR para la introducción de dianas de restricción para KpnI en la región *enhancer* -20666/-20091 del gen *PKP2*

35 CICLOS				
94°C	94°C	63°C	72°C	72°C
3min	30s	1min	1min	10min

9. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

A partir de las construcciones descritas, -1509/-735 del promotor y -20091/-20666 de la región *enhancer*, se generaron mutantes de los posibles sitios de unión del complejo β -catenina/TCF con el *Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent, 200521). Este Kit se utiliza para sustituir nucleótidos concretos usando la enzima ADN polimerasa *Pfu* de ultra alta afinidad. La secuencia de los sitios β -catenina/TCF 5'-CCTTTG(A/T)(A/T)-3' se mutó a 5'-CCTTTGGC-3'. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla 11**. El triple mutante -1509/-735-m347 se generó realizando tres rondas de mutación partiendo de la construcción original. Todas las construcciones generadas han sido secuenciadas.

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida de los sitios β -catenina/TCF de las construcciones -1509/-735 y -20091/-20666

Sitio	Secuencia oligonucleótidos directa (5'-3')	Secuencia oligonucleótidos directa (5'-3')
CONSTRUCCIÓN -1509/-735		
1	GAAGGGTGTGGGTAGGAAGCCAAAGACGAGG GAAGCTG	CAGCTTCCCTCGTCTTTGGCTTCCTACCCACAC CCTTC
2	GAAAGTGAACATACAAACCCAAGCAGCCAAAG GGAATATTATCTTAATACCA	TGGTATTAAGATAATATCCCTTTGGCTGCTTG GGTTTGATGTTCACTTTC
3	CCCTCTCCGTGGATCTCTCGCCAAAGAGCCTG TAATAAAG	CTTTATTACAGGCTCTTTGGCGAGAGATCCACG GAGAGGG
4	ATGTGGCCTGCTGCCAAAGGGTGGCGG	CCGCCACCCTTTGGCAGCAGGCCACAT
5	CGTTTCAGTCCTTTGGCTTCCTCTTCACTCCC TG	CAGGGAGTGAAGAGGAAGCCAAAGGACTGAAA GCG
6	TTCTTTCTGCCTCTTAAGGCCAAAGAGGCAAAT CAGG	CCTGATTTGCCTCTTTGGCCTTAAGAGGCAGAA AGAA
7	CAGGACAAGTGGCTTTGGCTGTAAACTTTAAG GTCAAG	CTTGACCTTAAAGTTTACAGCCAAAGCCACTTG TCCTG
CONSTRUCCIÓN -20091/-20666		
A	TAGTCACCCATCTCCTTTGGCGTCTGAAAGCA GGCAAGAA	TTCTTGCCTGCTTTCAGACGCCAAAGGAGATGG GTGACTA
B	CAACTCAACACCTTCAATTTATTAGCCAAAGG TGGGGG	CCCCCACCTTTGGCTAATAAATTGAAGGTGTTG AAGTTG
C	GTCACCTATTGGGTTCTTTGGCCAATGTACAGG TTGTTCTG	CAGAACAACCTGTACATTGGCCAAAGAACCCAA TAAGTGAC

10. TRANSFECCIONES, PLÁSMIDOS Y ENSAYOS DE GEN REPORTERO

Cultivos subconfluentes de células HEK-293T fueron transfectados usando *jetPei transfection reagent* (PolyPlus Transfection, 101-10N) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos reporteros pTOPFLASH, pFOPFLASH, 4xwtCBF1Luc, 4xmtCBF1Luc, NF3 y la construcción -2235/+112 del promotor del gen *DKK1* han sido previamente descritos (Korinek *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1996; Solanas *et al.*, 2008; González-Sancho *et al.*, 2005). Los plásmidos reporteros en los que encontramos las secuencias silvestres o las variantes mutadas del promotor y el *enhancer* del gen *PKP2* han sido descritos en apartados anteriores. El plásmido de expresión pFLAG-CMV5.1-Plakophilin2a-flag que codifica la Plakofilina-2 fue proporcionado por Addgene (#32230). Los plásmidos de expresión pMT23- β -catenina, pCDNA3-TCF4-VP16 y pCDNA3-p65 han sido descritos anteriormente (González-Sancho *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2010; Coiras *et al.*, 2008). El plásmido de expresión pCDNA3-ICND fue generosamente cedido por el Dr. Keith R. Brennan (Universidad de Manchester, Reino Unido). En todos los experimentos se utilizó el plásmido pRL-TK como control interno. Las actividades Luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* fueron medidas por separado usando el *Dual Luciferase reagent kit* (Promega, E1910) en un Luminómetro *GloMax96 microplate* (Promega). Los experimentos se realizaron por triplicado.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La existencia de diferencias significativas entre los datos se determinó usando ANOVA. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor P era menor de 0,05.

Resultados

1. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA INDUCIDO POR EL FACTOR WNT3A EN LA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS DE COLON HUMANO CCD-18Co. VALIDACIÓN DE GENES DIANA

1.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO CELULAR

Inicialmente estudiamos la expresión de receptores Frizzled (genes *FZD*) en la línea celular de fibroblastos de colon humano CCD-18Co. En el genoma humano existen 10 genes *FZD*. Analizamos cuáles de ellos se expresaban de forma basal y si su abundancia se veía alterada tras la estimulación con el factor canónico Wnt3A o el no canónico Wnt5A. Para ello se realizaron reacciones de PCR convencional en las que se usaron oligonucleótidos específicos para los distintos genes *FZD* (Tabla 2 apartado Materiales y Métodos). El resultado demostró una expresión basal de los genes *FZD1* a 7 en la línea celular CCD-18Co. En ninguno de los casos se detectaron cambios en la expresión de los receptores en respuesta a Wnt3A ni a Wnt5A (Tabla 12 y Figura 8).

La expresión de receptores Frizzled sugería que las células CCD-18Co eran sensibles a la estimulación por factores Wnt. Para comprobarlo, y teniendo en cuenta nuestro interés en la vía Wnt/ β -catenina, seleccionamos al factor Wnt3A, que fue el primero en ser purificado (Willert *et al.*, 2003) y es un potente activador de la vía canónica. La estimulación con Wnt3A, tanto con proteína recombinante como con medio condicionado, produjo un incremento de los niveles de β -catenina en el citosol, poniendo de manifiesto la funcionalidad de la vía (Figura 9).

Tabla 12. Resumen de la expresión de los distintos genes *FZD* en la línea celular de fibroblastos de colon humano CCD-18Co en condiciones basales. La expresión se indica con un símbolo + y la ausencia de expresión con un símbolo -.

RECEPTORES	EXPRESIÓN BASAL
<i>FZD1</i>	+
<i>FZD2</i>	+
<i>FZD3</i>	+
<i>FZD4</i>	+
<i>FZD5</i>	+
<i>FZD6</i>	+
<i>FZD7</i>	+
<i>FZD8</i>	-
<i>FZD9</i>	-
<i>FZD10</i>	-

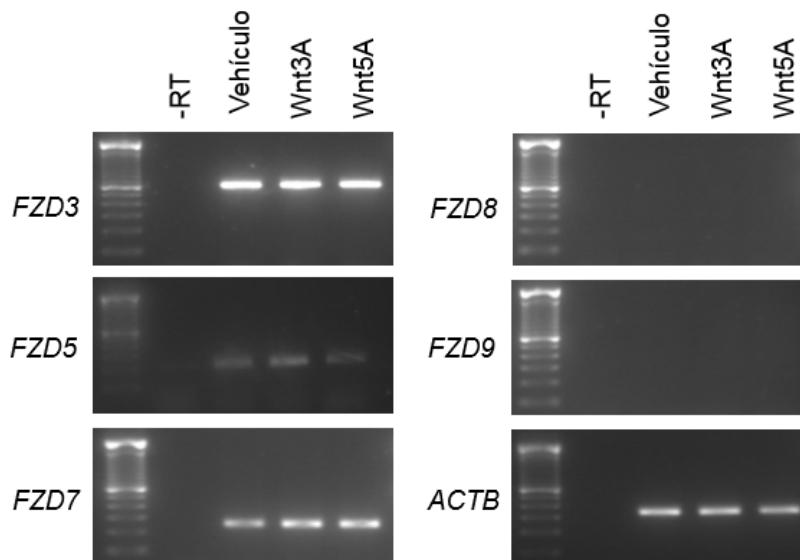


Figura 8. Expresión de los genes de la familia *FZD* en fibroblastos de colon humano CCD-18Co. La expresión de los genes de la familia *FZD* fue estudiada por PCR convencional usando ARN de células tratadas con Wnt3A (100 ng/ml), Wnt5A (300 ng/ml) o vehículo durante 24 horas. Se muestran algunos experimentos representativos. Como control negativo se usó una muestra tratada con vehículo a la que no se le añadió transcriptasa inversa (-RT). El gen *ACTB*, que codifica la proteína β -actina, se utilizó como control positivo.

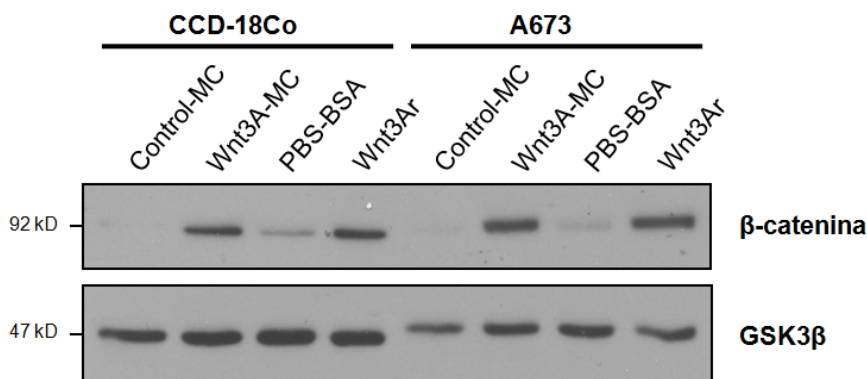


Figura 9. Wnt3A induce la activación de la vía Wnt/ β -catenina en la línea celular de fibroblastos de colon humano CCD-18Co. Las células CCD-18Co fueron tratadas con medio condicionado control (Control-MC) o medio condicionado con Wnt3A (Wnt3A-MC) y con Wnt3A recombinante (Wnt3Ar, 100 ng/ml) o vehículo (PBS-BSA) durante 2 horas. A continuación, se obtuvieron extractos citosólicos y se analizaron los niveles de β -catenina por *western blot*. La quinasa GSK3 β se usó como control de carga. La línea celular de sarcoma de Ewing A673 se utilizó como control positivo.

1.2. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA INDUCIDO POR WNT3A EN FIBROBLASTOS DE COLON HUMANO CCD-18Co

Para estudiar la expresión diferencial de genes de los fibroblastos de colon humano CCD-18Co en respuesta a Wnt3A tratamos las células durante 24 horas con proteína recombinante Wnt3A (100 ng/ml) o vehículo y purificamos la población de ARNs, que fueron utilizados en un estudio de secuenciación (RNA-seq), tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos.

El análisis de los resultados del experimento de secuenciación de ARN puso de manifiesto que un total de 1.136 genes presentaban cambios significativos de expresión en respuesta a Wnt3A. De ellos, 662 aumentaban su expresión y 474 la veían disminuida (**Figura 10**). La lista completa de genes regulados puede consultarse en los Anexos de esta Tesis doctoral (Material suplementario, **Tablas I y II**).

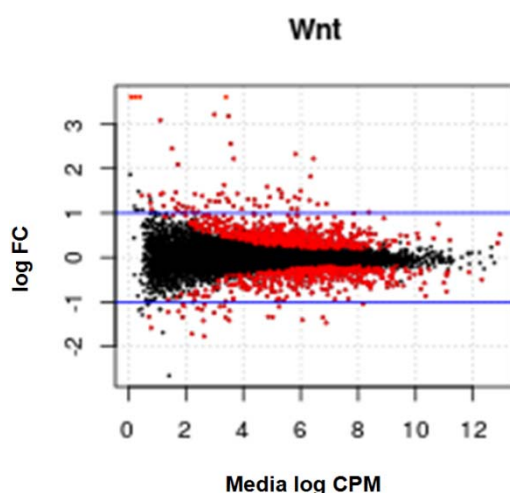


Figura 10. Wnt3A regula la expresión de numerosos genes en la línea celular de fibroblastos de colon humano CCD-18Co. *MA plot* resultante del estudio del transcriptoma de la línea celular CCD-18Co en respuesta a Wnt3A. Cada punto representa un gen y el color rojo indica un transcrito cuya expresión presenta diferencias significativas ($FDR < 0,05$) entre ambas condiciones experimentales (ausencia o presencia de Wnt3A). Se representa la media del logaritmo de las cuentas por millón (Media log CPM) frente al logaritmo del *fold change* (log FC). Datos procedentes del experimento de secuenciación de ARN.

Realizamos un análisis GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) con nuestra lista de genes inducidos e inhibidos por Wnt3A y comprobamos que el *hallmark gene set* que más sólidamente correlaciona con nuestra lista de genes inducidos por Wnt3A es el de los genes regulados positivamente por la activación de la vía Wnt/ β -catenina ($FDR=0,001$; $FWER=0,001$), como cabría esperar, lo que confirma la consistencia de nuestro estudio (**Figura 11**).

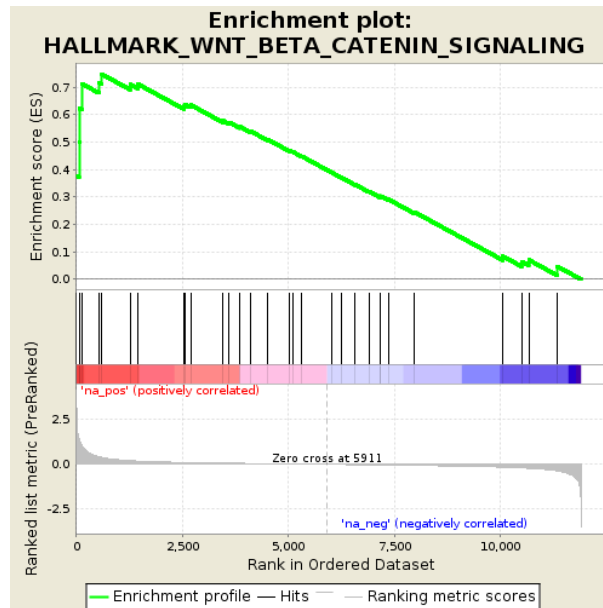


Figura 11. Gráfico de enriquecimiento para la firma molecular “señalización Wnt/ β -catenina”. La lista de genes regulados por Wnt3A en las células CCD-18Co se sometió a un análisis GSEA y la firma molecular (*hallmark*) que correlaciona más sólidamente con los genes inducidos por Wnt3A es la de genes “inducidos por la activación de la vía Wnt a través de la acumulación de β -catenina (*CTNNB1*)”.

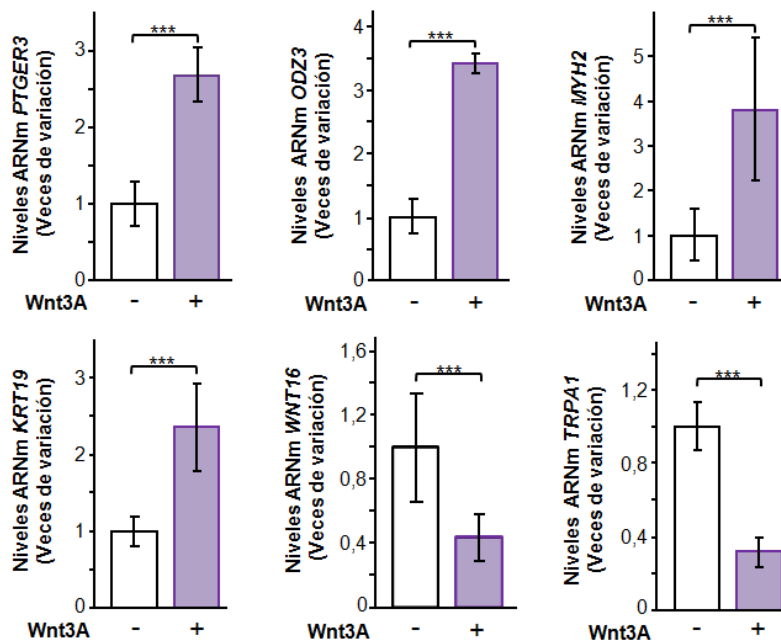


Figura 12. Validación de genes regulados por Wnt3A en fibroblastos de colon humano CCD-18Co. Validación por RT-qPCR de una muestra representativa de seis genes (*PTGER3*, *ODZ3*, *MYH2*, *KRT19*, *WNT16*, *TRPA1*) cuya expresión aumenta o disminuye significativamente en respuesta a Wnt3A en los experimentos de secuenciación de ARN. Las células fueron tratadas con Wnt3A recombinante (100 ng/ml, +) o con vehículo (-) durante 24 horas. Los resultados mostrados son las medias \pm DE de tres replicas (***) $P < 0,001$).

Para validar los resultados obtenidos seleccionamos un grupo de genes y realizamos experimentos de RT-qPCR en muestras independientes. El grupo seleccionado incluía genes cuya expresión aumenta en respuesta a Wnt3A, como p.e. *PTGER3*, *ODZ3*, *MYH2* y *KRT19* y genes cuya expresión disminuye, como p.e. *WNT16* y *TRPA1*. Todos ellos fueron validados (**Figura 12**).

1.3. WNT3A INDUCE LA EXPRESIÓN DE INHIBIDORES DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA

De entre todos los genes cuya expresión aumenta en respuesta a Wnt3A detectamos un grupo de genes que codifican inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina como el antagonista extracelular Dickkopf-2 (gen *DKK2*), el inhibidor intracelular anclado a membrana *Adenomatous Polyposis Coli Down-Regulated 1* (gen *APCDD1*) y otros inhibidores citoplasmáticos como Naked-1 (gen *NKD1*), Naked-2 (gen *NKD2*) y Axina2 (gen *AXIN2*). Estudiamos su cinética de inducción tras la estimulación con Wnt3A durante 4, 8 y 24 horas. La RT-qPCR confirmó que a las 4 horas ya hay un aumento de la expresión de *DKK2* en respuesta a Wnt3A, mientras que el resto de genes presentan un incremento significativo a partir de las 8 horas de estímulo (**Figura 13**). Todos estos genes también son regulados por Wnt3A en la línea celular de fibroblastos de pulmón humano IMR-90 (**Figura 14**) lo que sugiere que estos inhibidores son dianas comunes de Wnt3A en este tipo celular.

El aumento de los niveles de la proteína Naked-2 en respuesta a Wnt3A se confirmó también mediante *western blot* (**Figura 15**). Desafortunadamente, los niveles de expresión de la proteína Naked-1 en la línea CCD-18Co resultaron ser tan bajos que no pudimos detectarlos por *western blot* (**Figura 16**). Tanto en el caso de la proteína Dickkopf-2 como en el de APCDD1, los anticuerpos disponibles eran inespecíficos lo que no nos permitió confirmar el aumento de expresión mediante esta técnica.

Estos datos sugieren que, mediante la inducción de diferentes tipos de inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina, Wnt3A podría estar poniendo en marcha un programa de retroinhibición *feedback* de la misma.

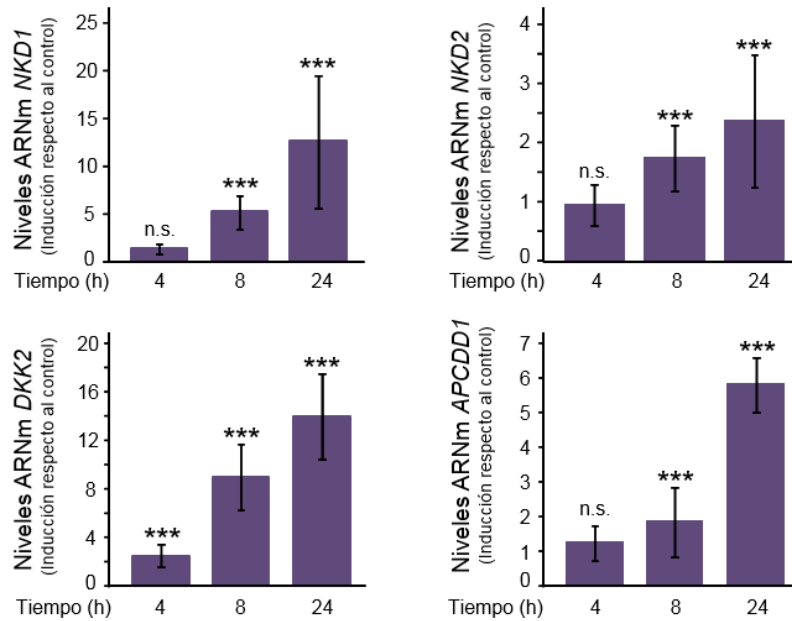


Figura 13. Wnt3A induce la expresión de un grupo de genes que codifican inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina en la línea de fibroblastos de colon CCD-18Co. Células CCD-18Co se trataron con Wnt3A (100 ng/ml) o con vehículo durante los tiempos indicados, se obtuvo ARN y la expresión de los distintos genes fue analizada mediante RT-qPCR. Los resultados son mostrados como inducción respecto al control a los tiempos indicados y son medias \pm DE de tres réplicas (n.s., no significativo; *** $P \leq 0,001$).

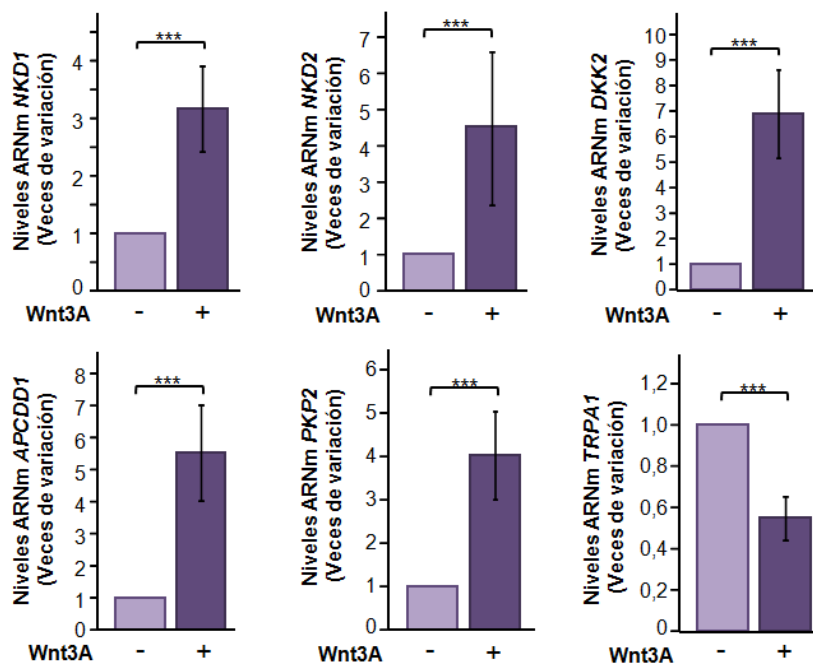


Figura 14. Validación en la línea celular de fibroblastos de pulmón IMR-90 de algunos genes regulados por Wnt3A en las células CCD-18Co, incluidos aquellos que codifican inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina. Células IMR-90 fueron tratadas con Wnt3A recombinante (100 ng/ml, +) o con vehículo (-) durante 24h. La expresión de los genes indicados fue analizada por RT-qPCR. Los resultados mostrados son las medias \pm DE de tres réplicas. (***) $P \leq 0,001$).

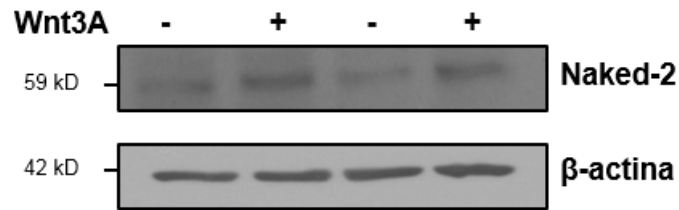


Figura 15. Wnt3A induce la expresión de la proteína Naked-2. Células CCD-18Co fueron tratadas con Wnt3A recombinante (100 ng/ml, +) o con vehículo (-) durante 24 horas, se lisaron y se obtuvieron extractos celulares (por duplicado). Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y seguidamente, analizadas por *western blot* para detectar la proteína Naked-2. La proteína β-actina fue utilizada como control de carga.

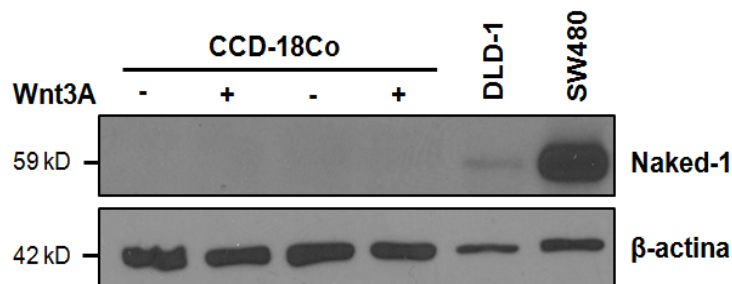


Figura 16. Los niveles de Naked-1 no son detectables por *western blot* en células CCD-18Co. Células CCD-18Co fueron tratadas con Wnt3A recombinante (100 ng/ml, +) o con vehículo (-) durante 24 horas, se lisaron y se obtuvieron extractos celulares (por duplicado). Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y seguidamente, analizadas por *western blot* para detectar la proteína Naked-1. La proteína β-actina fue utilizada como control de carga. Las líneas celulares de cáncer de colon DLD-1 y SW480 se utilizaron como control positivo.

1.4. WNT3A INDUCE LA EXPRESIÓN DEL GEN *PKP2* EN FIBROBLASTOS NORMALES Y EN FIBROBLASTOS ASOCIADOS A CÁNCER DE COLON

Uno de los genes más consistentemente inducidos por Wnt3A en los fibroblastos CCD-18Co es el gen *PKP2*. Este gen codifica una proteína desmosomal conocida como Plakofilina-2. Los niveles de ARNm de *PKP2* fueron analizados por RT-qPCR y observamos que en respuesta a Wnt3A aumentan aproximadamente 4 veces respecto al control (**Figura 17**). Este resultado también se reprodujo en los fibroblastos IMR-90 (**Figura 14**).

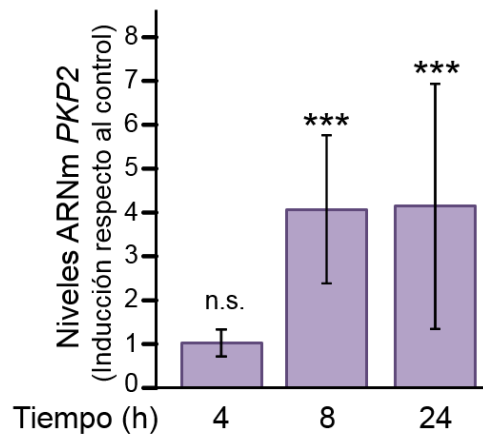


Figura 17. Wnt3A induce la expresión del gen *PKP2* en fibroblastos de colon humano CCD-18Co. Células CCD-18Co se trataron con Wnt3A recombinante (100 ng/ml) o con vehículo durante los tiempos indicados, se obtuvo ARN y se analizó la expresión de *PKP2* por RT-qPCR. Los resultados se muestran como inducción respecto al control a los tiempos indicados y son las medias \pm DE de tres réplicas (n.s., no significativo; *** $P \leq 0,001$).

El análisis por *western blot* confirmó que en respuesta a Wnt3A se producía un aumento de hasta dos veces en los niveles de Plakofilina-2 tras 24 horas de tratamiento (**Figura 18**).

En la bibliografía se describe la Plakofilina-2 como una proteína mayoritariamente citoplasmática, formando parte de los desmosomas en células epiteliales o del *area composita* en cardiomiocitos. Sin embargo, también se ha observado que Plakofilina-2 se puede localizar en el núcleo (Mertens, 2001; Hatzfeld, 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes quisimos estudiar la localización celular de Plakofilina-2 en la línea celular de fibroblastos de colon humano CCD-18Co y también comprobar si el tratamiento con Wnt3A producía un aumento de la cantidad de proteína que ya habíamos detectado mediante *western blot*, y/o algún cambio en su localización.

Los fibroblastos CCD-18Co se estimularon con medio condicionado por Wnt3A o control durante 24 horas. Pasado este tiempo, se fijaron y se estudiaron por inmunofluorescencia. Las imágenes muestran como la proteína Plakofilina-2 se encuentra localizada mayoritariamente en el citoplasma de los fibroblastos CCD-18Co y confirman, de forma cualitativa, el aumento de esta proteína en respuesta a Wnt3A. Sin embargo, no pudimos detectar ningún cambio de localización en respuesta a este factor (**Figura 19**).

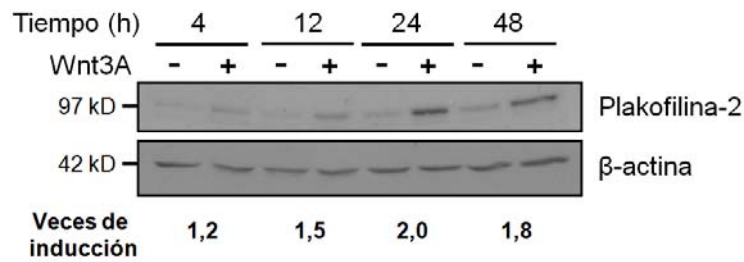


Figura 18. Wnt3A induce la expresión de Plakofilina-2 en la línea celular CCD-18Co. Células CCD-18Co fueron tratadas con Wnt3A (100 ng/ml, +) o con vehículo (-) durante los tiempos indicados, se obtuvieron extractos celulares y éstos fueron sometidos a SDS-PAGE. A continuación, se analizó mediante *western blot* el aumento de la cantidad de Plakofilina-2. La proteína β-actina fue usada como control de carga. Se indican las veces de inducción en respuesta al tratamiento con Wnt3A a los diferentes tiempos respecto al tratamiento con vehículo. Se muestra un experimento representativo.

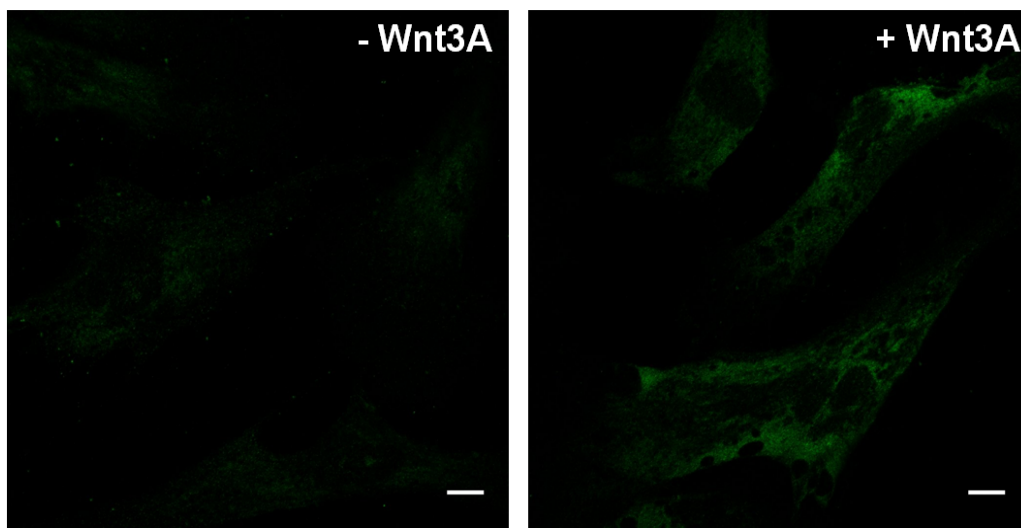


Figura 19. La localización de Plakofilina-2 en los fibroblastos de colon humano CCD-18Co es mayoritariamente citoplasmática. Las células CCD-18Co se trataron con medio condicionado control (imagen de la izquierda) o con medio condicionado con Wnt3A (imagen de la derecha) y tras 24 horas de tratamiento, se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia, tal y como se indica en el apartado Materiales y Métodos. Barra de escala: 10 μm.

Con el objetivo de comprobar si el aumento de la expresión de *PKP2* en respuesta a Wnt3A también se producía en fibroblastos de colon asociados a cáncer (CAF), en colaboración con el laboratorio del Dr. Alberto Muñoz, establecimos cultivos primarios de fibroblastos normales (NF) y CAF a partir de explantes procedentes de mucosa colónica normal o de tejido tumoral fresco de pacientes con cáncer colorrectal (Ferrer-Mayorga *et al.*, 2016; Herrera *et al.*, 2013). Ambos tipos de fibroblastos se estimularon con Wnt3A (100 ng/ml) o vehículo durante 24 horas, se obtuvo ARN y se analizó la

expresión de *PKP2* en las diferentes muestras mediante RT-qPCR. La expresión de *PKP2* en los CAF es bastante variable, con ejemplos en los que es más alta (Paciente 47), más baja (Paciente 46 y Paciente 50) o similar (Paciente 48) a la de los NF procedentes del mismo paciente (**Figura 20**). Lo que sí parece consistente es la inducción de *PKP2* por Wnt3A, tanto en NF como en CAF, aunque con amplias variaciones dependiendo de la muestra.

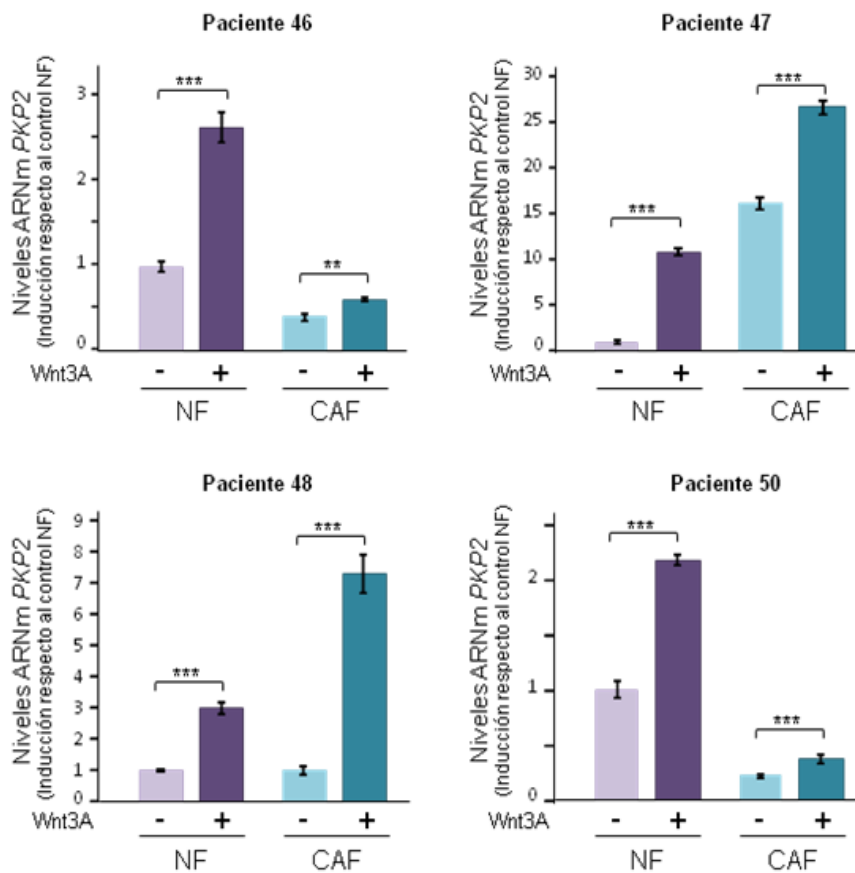


Figura 20. Wnt3A induce la expresión del gen *PKP2* en fibroblastos de tejido normal (NF) y fibroblastos asociados a cáncer (CAF) procedentes de pacientes con cáncer de colon. Tanto los NF como los CAF obtenidos de pacientes con cáncer de colon, tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos, fueron tratados con Wnt3A (100 ng/ml, +) o con vehículo (-) durante 24 horas. A continuación, se purificó ARN total y se analizaron los niveles de ARNm de *PKP2* usando RT-qPCR. Los resultados se muestran como inducción respecto al control de NF y son las medias \pm DE de tres réplicas (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

Estudiamos también si Wnt3A regula la expresión de los otros miembros de la familia de las plakofilinas o si su acción es específica sobre *PKP2*. En este estudio incluimos también al miembro de la familia $p120^{ctn}$, *p0071* (también conocido como *PKP4*), que inicialmente se consideró miembro de la familia de las plakofilinas. Se trataron los

fibroblastos CCD-18Co con Wnt3A recombinante o vehículo durante 24 horas, se obtuvo ARN y se analizó, mediante RT-qPCR, la expresión de *PKP1*, *PKP2*, *PKP3* y *PKP4*. El gen *PKP1* no se expresa en esta línea celular. De los otros miembros de la familia, tan solo la expresión de *PKP2* es inducida en respuesta a Wnt3A, lo que demuestra que el efecto es específico sobre este gen (Figura 21).

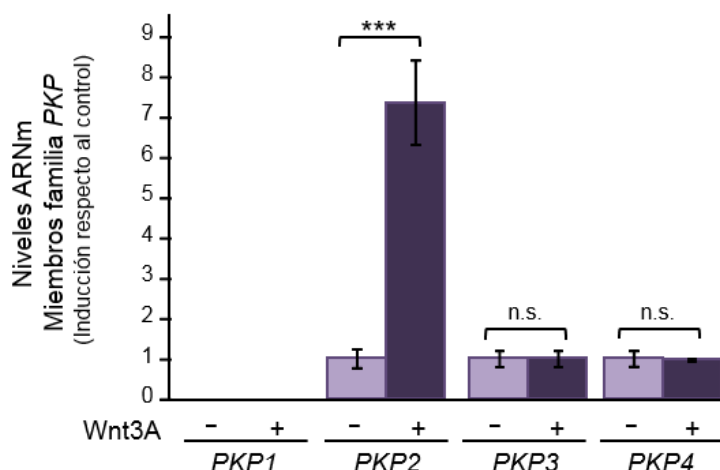


Figura 21. Wnt3A regula específicamente la expresión del gen *PKP2*, pero no las de los otros genes de su familia. Células CCD-18Co se trataron con Wnt3A (100 ng/ml, +) o con vehículo (-) durante 24 horas, se obtuvo ARN y se analizó por RT-qPCR la expresión de los diferentes miembros de la familia *PKP*. Los resultados se muestran como veces de inducción respecto al control correspondiente y son las medias \pm DE de tres réplicas (n.s., no significativo; *** $P \leq 0,001$).

2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL GEN *PKP2*/PLAKOFILINA-2 POR WNT/ β -CATENINA

2.1. PLAKOFILINA-2A ES LA ISOFORMA PRESENTE EN LOS FIBROBLASTOS DE COLON HUMANO CCD-18Co Y EN LOS FIBROBLASTOS DE PULMÓN HUMANO IMR-90

Como se expuso en la Introducción, el gen *PKP2* da lugar a dos isoformas de Plakofilina-2 que se diferencian en el uso alternativo del exón 6. La isoforma 2a, la más corta, lo salta, mientras que la 2b, 44 aminoácidos más larga, lo incluye. Con el fin de determinar qué isoforma estaba presente en nuestras células realizamos una PCR convencional con oligonucleótidos específicos (Tabla 4 apartado Materiales y Métodos) que nos permitió determinar la presencia o ausencia del exón 6. El tamaño del fragmento amplificado puso de manifiesto que tanto las células CCD-18Co como las IMR-90 expresan la isoforma 2a (Figura 22).

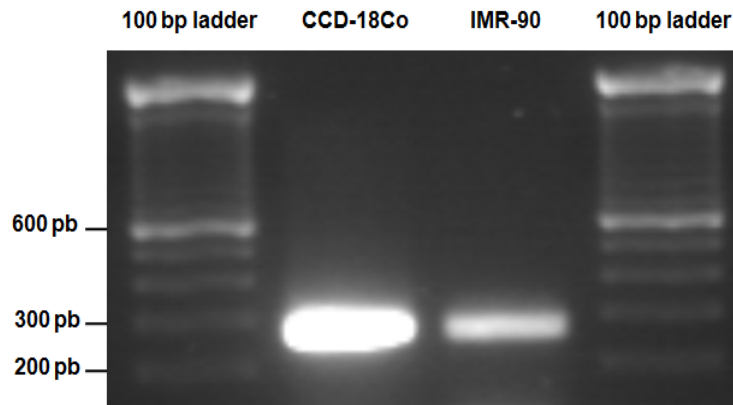


Figura 22. La isoforma de Plakofilina-2 presente en las células CCD-18Co e IMR-90 es la 2a. A partir del ARN total purificado de los fibroblastos CCD-18Co e IMR-90 se obtuvo ADNc que se utilizó como molde para una PCR convencional con oligonucleótidos específicos que nos permitieron determinar la presencia (banda de aproximadamente 400 pb) o ausencia (banda de aproximadamente 280 pb) del exón 6.

2.2. WNT3A INDUCE LA EXPRESIÓN DEL GEN *PKP2* A TRAVÉS DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA

Para confirmar que el aumento de expresión de Plakofilina-2a inducido por Wnt3A era debido específicamente a la activación de la vía Wnt/ β -catenina, pre-tratamos las células CCD-18Co con el inhibidor farmacológico de la vía Wnt/ β -catenina XAV-939 (1 μ M) o vehículo, y 4 horas después las tratamos con Wnt3A (100 ng/ml) o vehículo durante 24 horas adicionales. El resultado puso de manifiesto que la presencia de XAV-939 impedía la acumulación de Plakofilina-2 y que, por tanto, la activación de la vía Wnt/ β -catenina es imprescindible para este fin (**Figura 23A**).

Por otro lado, se trataron las células CCD-18Co con Wnt5A (300 ng/ml), el prototipo de Wnt no canónico que no activa la vía Wnt/ β -catenina, o vehículo durante 24 horas y pudimos observar como Wnt5A no fue capaz de reproducir el aumento de expresión de Plakofilina-2 inducida por Wnt3A (**Figura 23B**).

2.3. WNT3A INDUCE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *PKP2* A TRAVÉS DE SITIOS β -CATENINA/TCF

Para profundizar en el mecanismo por el que se produce la regulación de la expresión del gen *PKP2* en respuesta a Wnt3A pre-tratamos las células CCD-18Co con actinomicina D, un inhibidor de la transcripción, antes de la estimulación con Wnt3A.

La presencia de actinomicina D bloqueaba completamente el aumento de la expresión de *PKP2* mediado por Wnt3A (**Figura 24**). Este resultado apoyaba la hipótesis de un mecanismo de regulación transcripcional.

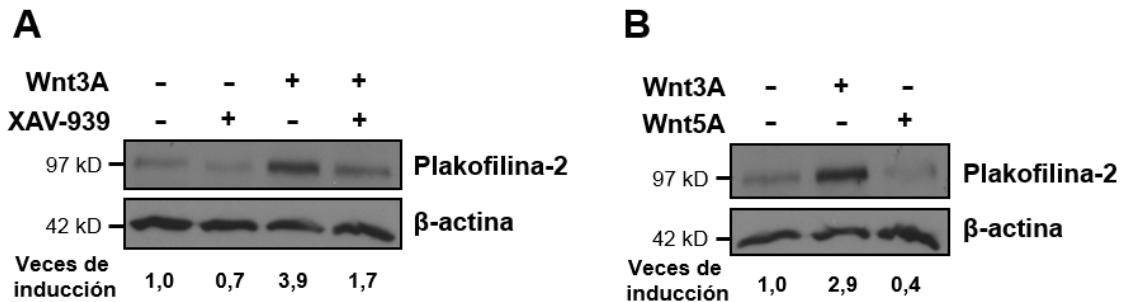


Figura 23. El aumento de expresión de Plakofilina-2 en respuesta a Wnt3A se produce de forma específica a través de la activación de la vía Wnt/ β -catenina. **(A)** El inhibidor farmacológico de la vía Wnt/ β -catenina XAV-939 bloquea el aumento de expresión de Plakofilina-2 en respuesta a Wnt3A. Células CCD-18Co se pre-trataron durante 4 horas con XAV-939 (1 μ M, +) o con vehículo (-). Pasado ese tiempo se trataron con Wnt3A recombinante (100 ng/ml, +) o vehículo (-) durante 24 horas más. Se obtuvieron extractos proteicos que se usaron en SDS-PAGE y, posteriormente, se analizó por *western blot* la expresión de Plakofilina-2. La proteína β -actina se usó como control de carga. Se indican las veces de inducción respecto al control. Se muestra un experimento representativo. **(B)** El factor no canónico Wnt5A no induce la acumulación de Plakofilina-2. Células CCD-18Co se trataron con Wnt3A recombinante (100 ng/ml, +), Wnt5A recombinante (300 ng/ml, +) o vehículo (-) durante 24 horas. Las muestras fueron analizadas como en (A). Se indican las veces de inducción respecto al control. Se muestra un experimento representativo.

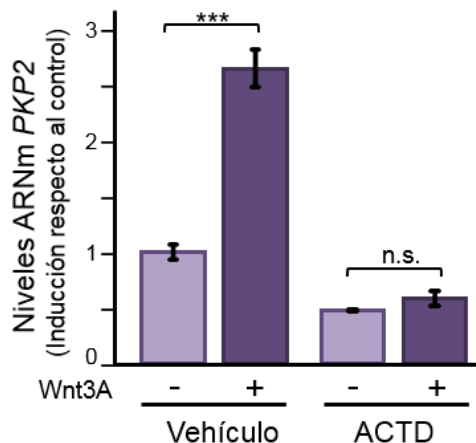
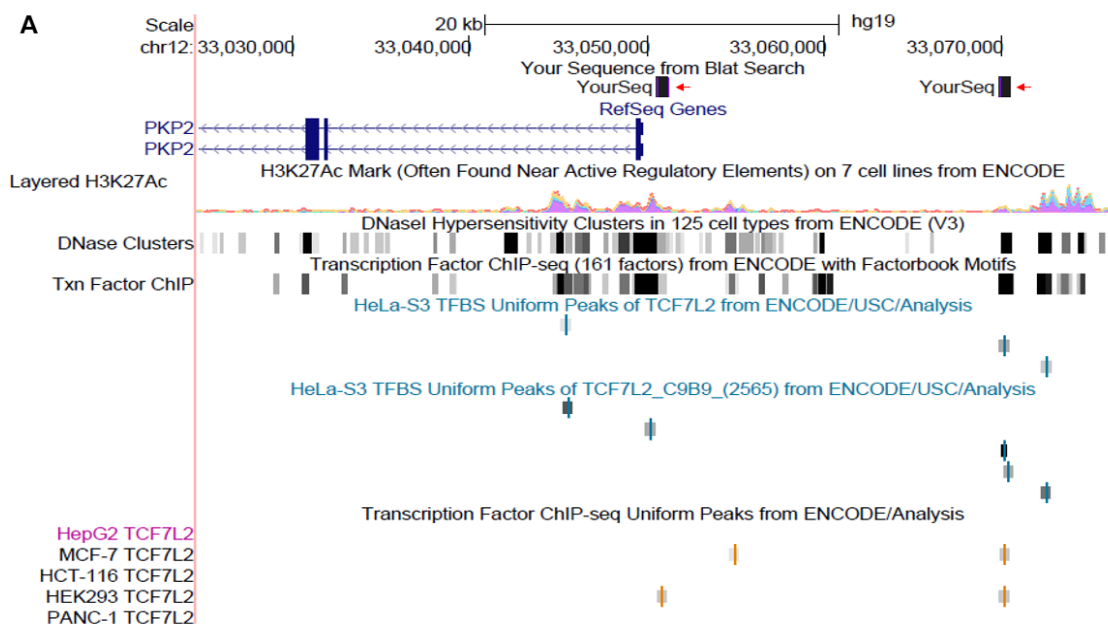


Figura 24. Actinomicina D bloquea la acumulación del ARNm de *PKP2* inducida por Wnt3A. Fibroblastos de colon humano CCD-18Co se pre-trataron con actinomicina D (ACTD, 5 μ g/ml) o vehículo durante 1 hora y posteriormente, se estimularon con Wnt3A (100 ng/ml, +) o vehículo (-) durante 8 horas adicionales. Seguidamente, se obtuvo ARN total que fue usado para analizar los niveles de expresión de *PKP2* mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como inducción respecto al control tratado con vehículo y son medias \pm DE de tres réplicas (n.s., no significativo; *** $P \leq 0,001$).

A continuación, a través del portal UCSC *Genome Browser* (Kent *et al.*, 2002), usando datos procedentes del proyecto ENCODE (ENCODE Project Consortium, 2012), se estudiaron las regiones reguladoras del gen humano *PKP2*. Los datos disponibles de estudios de ChIP-seq usando el factor de transcripción TCF-4 (gen *TCF7L2*) en diferentes líneas celulares pusieron de manifiesto dos posibles regiones de unión para este factor: una región promotora cercana al inicio de transcripción (TSS) y una región *enhancer* a aproximadamente unas 20 kb en dirección 5' del TSS (**Figura 25A**). El análisis *in silico* de ambas regiones nos permitió detectar 7 posibles sitios β -catenina/TCF en el promotor y 3 en la región *enhancer* (**Figura 25B y 25C**).

A la vista de los resultados previos, amplificamos dos fragmentos del promotor de *PKP2*: un fragmento que comprende los nucleótidos entre las posiciones -1509 y -735, respecto al TSS, y que contiene los 7 posibles sitios β -catenina/TCF, y otro que va desde la posición -817 a la -299, en el que no habíamos detectado ningún sitio β -catenina/TCF y que nos servía como control. Ambos fragmentos fueron clonados en el plásmido pGL4.23 delante del gen reportero de la luciferasa y de un promotor mínimo (**Figura 26A**). En el caso de la región *enhancer*, amplificamos el fragmento comprendido entre los nucleótidos -20666 y -20091, respecto al TSS, y lo clonamos también en el plásmido pGL4.23, tanto en orientación directa (-20666/-20091) como reversa (-20091/-20666) (**Figura 28A**).



B

```
CCATGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAACAGGAATGTTGCTGGACGTTTCTATCATCACTTACCTTCAGTTCA
CCCCCTCTTTTTCAATTACATCTCAGCATCATGGTTGGATGTTTTCCACCTGGCTACATAAGCAAGCTTTACACAAGGTGT
AATTTGCCATAAATAGTGGTCCATTCTATTGGGGTGGGAGCAATTGCTCCAGGACTCACATCCATATGGCTCCACTTAG
CCATGPGGCCTGCTGACAAAGGTGGCGGAACTGTCACTACTCTGTTGTCCACGCTTTTCAGTCCTTTGGTTTCCCTCTCA
CTCCCTGGACGCTCATGTAAAAAGGGAGCCATATACCTGTGCATTGTGTCTAAGCATTAGTGTGTCTAAAGGCA
GAAGGTGTGGGTAGGAAAACAAGACGAGGGAAGCTGCGTTCTCCAAACACTTCAGACTTGAGTAAGTGGGGTTTTGCA
GCAATTGAGTGATTTGAGGGAAAAGTGAACATACAAACCCAAAGCAATCAAAGGGAATATTATCTTAATACCAGGGATACAT
GTTTTCTTTCTGCCTCTAAGTCAAAGAGGCAAATCAGGACAAGTGCTTTGGTTGTAAACTTTAAGTCAAGGATCC
TTTCTGTTGAGCTTAGCTCTCAAGTTCTCAGTAGTCAACTGCGGTGAAACATAATTAATAGCACGATAAATACAAGTTGT
GGAAGATTTCGATTGAAAGTTGGAGGCCCTCTCCGTGGATCTCTTACAAAGAGCCTGTAATAAAGAGGACTTAATCAACG
TTAGCAGGGCTATTTAAAAAGCATCGTCTATTTAAATTCATTTCTTCTCTAGAGCCCTCTGTTGGAGTTTCTCTTGTGTGG
GTGTGTTGTAAGAGGAATGGGTTAGCAAGAGTACTGGGTACAATTTGTGTATCCAAGAGAAAACAGAAGCTCTCAAT
GAGGAAGAACATATGTTTCTGGGACTGCATCTGTGCAAAAAGTACATAGTCCGACGTTGACTAAGAAAAAAAACACTC
TCTTTAGAAAGTCTTTTATTTCACACGTTATCTTCTTGGCACATTTCCCTCATATTGCCCTTTCCGCTGACCAAATAGC
CCTTTCTCACCTCAGGTCAGGAAAACCAGGAAACGTTTCCAACAGTGCACAAAGCCTGACTAACAGACATACTACT
CGCTCGGGGATCCCGGAGGCAAGCCTCAGTCCAAGAACAGGAGTACTCTCGAGGGCTCACCTGCCTGCAGGGCAGCCCC
TCCCTGCATCGAGCGGAATCCATCCTGTCCAGCGCGGGGCGTGGGCAGAGCGGGGCGGGCCCCGGCAGGCGGTATCCG
CTGGGACTCCGACAACGTGCGGACCCAGGCGAACCGCGCCCTCTCCCACCTCCCGCGGGGCGGTACAAGTATCCA
GGTGTCCGCGGCTCAGCGGGTCCGGCCGCCCCGCCCCGCCCCGGGCGGACTGCGCGTGCCTGGCGGAGCCGCG
CCCCCTCTCAGGGAAGGCCGGGCTCCGGCCACAGGCGGAGCTCCCCCGGCGGGGCTCTCACCGCGCGGGGG
GCGGGCCAGGGGCGGGGCGGACTCGAGCGGGGCGGGGCTCGCGCCAGCGCCCCAGCTCCGTGGCGGCTTCGCCCGCA
GTCCAGAGGCAAGGCGAGCAGCTCGGTGCCCCACCGCCCCATGGCA
```

C

```
GCAGGGATTGAGAATTTCTTTTCGGTTTTACTCAAGTAAGCAAAATGAACAATATCTGTTTTCTTTCTGTTGGCAGTGT
TTCGAGTATCTGGTGCTAGTATAATCATTATTTGGCTATTATCAGACTTAGCAATGCAATTTTTGCTTTGATATTCTTC
CCAGTTGTTGTGTGAGGAAGAAGGCAGAATTAGGCAGTGTGCTAAAATCAAATCAGTATTCTTACATAAATGATTGGTT
GGGTGAGTCTGTTTTTAGTACCCATCTCCTTTGAAGTCTGAAAGCAGGCAAGAAATTTGAGATTGTTGACATTTCTTAC
AGAAGAGCTAAAATGTACTGTTATGAAAGACTACAAGATTTATCAAACAAAAATACATCAACTTCAACACCTTCAATTT
ATTATCAAAGGTGGGGGTCACTTATTGGGTTCTTTGTCCAATGTACAGGTTGTTCTGTCCCTCACTCCCAGCAAAATAT
TGTGAAATATCTTAAGTTTATTGGATTATTAAGGGCAGTTGGCTTACAGTTCTGTGGTTTGGCCCTGGCTTTTCTTCCC
TAGCAACCAAAAACAATACTACTCATCAAGAAGATTGCATCTTATGTTCATTACATAGAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTGAAACAGGGTATCACTCTATTGCCAGACTGGAGTAGTGGCGTGGCATGATCTCAGCTCACTGCAACTTCG
GCTTCTAGGGTTCAAGCAATTTCTGTGCCTCAGGCT
```

Figura 25. Regiones reguladoras del gen PKP2. (A) Diagrama de las regiones reguladoras proximal y distal del locus *PKP2* que muestra los genes RefSeq junto con las regiones accesibles de la cromatina ("DNase clusters" track), zonas de sitios de unión de factores de transcripción ("Txn Factor ChIP"), y marcas de histonas asociadas a elementos reguladores activos ("Layered H3K27Ac"). Los colores en la pista de histonas corresponden a la señal obtenida en diferentes líneas celulares (para más detalle consultar UCSC browser). La localización de las regiones clonadas en los vectores reporteros fue mapeada usando BLAST (cajas negras nombradas como "your Seq" y señaladas con flechas rojas). La localización de los sitios de unión de *TCF7L2/TCF-4* en las líneas celulares indicadas, obtenidas del proyecto ENCODE, se muestran como cajas grises con una línea vertical que muestra el pico de la región de unión ("TFBS Uniform Peaks Tracks"). (B) Secuencia de la región promotora del gen *PKP2*. Se muestran los oligonucleótidos utilizados para generar la construcción -1509/-735 (verde), la construcción -817/-299 (naranja) y los posibles sitios β -catenina/TCF (rojo). Los nucleótidos que divergen de la secuencia canónica se han marcado en azul. El sitio de inicio de transcripción (TSS) y el ATG iniciador de la traducción se han señalado en morado. (C) Secuencia de la región *enhancer* del gen *PKP2* donde se muestran los cebadores empleados para generar la construcción -20666/-20091 (naranja) y los posibles sitios β -catenina/TCF (rojo). Los nucleótidos que difieren de la secuencia consenso se han marcado en azul al igual que en (B).

Estas construcciones fueron empleadas en ensayos de transfección transitoria y transactivación en células HEK-293T. La actividad transcripcional de la construcción -1509/-735, que contiene los 7 posibles sitios β -catenina/TCF, fue claramente estimulada en presencia del activador TCF4-VP16, una versión constitutivamente activa de TCF-4, en la que el factor de transcripción está unido al dominio de transactivación de la proteína VP16 del virus del herpes simple. La inducción mostrada fue comparable a la del promotor del gen *DKK1*, que es una diana bien conocida del complejo β -catenina/TCF (González-Sancho *et al.*, 2005). A diferencia de lo que observamos con la construcción -1509/-735, la construcción -817/-299, que en un principio no contiene ningún sitio β -catenina/TCF y que usamos como control negativo, no fue activada en presencia de TCF4-VP16, como cabía esperar (Figura 26B).

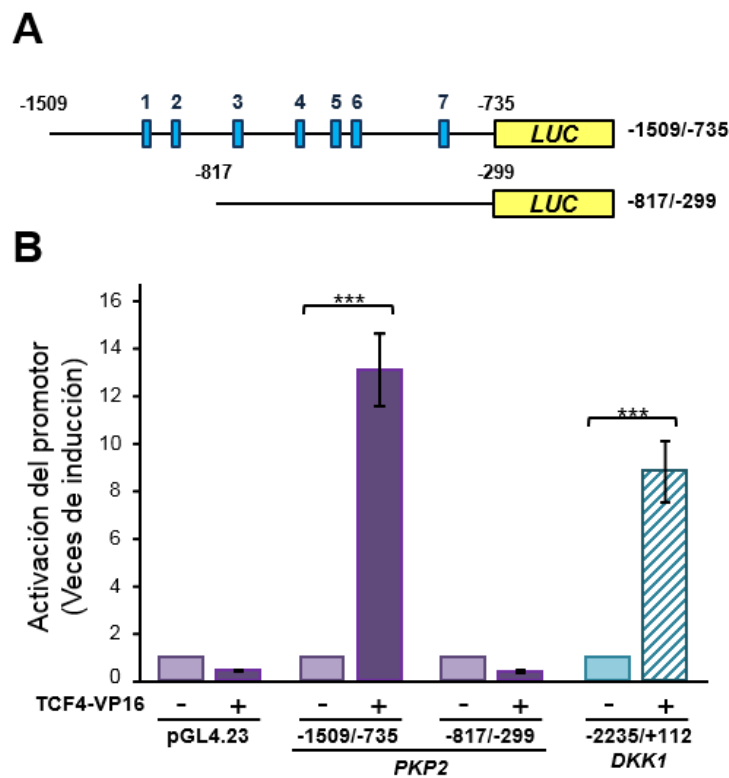


Figura 26. El fragmento -1509/-735 del promotor de *PKP2* contiene sitios de unión funcionales del factor de transcripción TCF-4. (A) Esquema de los fragmentos del promotor del gen *PKP2* clonados delante del gen reportero de la luciferasa (*LUC*). Las cajitas azules indican las posiciones aproximadas de cada uno de los posibles sitios β -catenina/TCF presentes en la construcción -1509/-735. (B) Células HEK-293T fueron co-transfectadas con la construcción del promotor de *PKP2* que se indica junto con el activador constitutivo de la vía Wnt/ β -catenina TCF4-VP16 (+) o su correspondiente vector vacío (-). El plásmido pRL-TK fue usado como control interno. El promotor del gen *DKK1* fue utilizado como control positivo. Las células se lisaron 48 horas después de la transfección y se midieron las actividades Luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes valores de *Renilla*. Las barras de error representan la DE (***) P<0,001).

A continuación, se generaron mutantes puntuales en los 7 sitios β -catenina/TCF predichos y comprobamos que sólo tres de ellos, los sitios 3, 4 y 7, contribuían significativamente a la activación transcripcional del promotor (**Figura 27A** y **27B** y datos no mostrados). Generamos, entonces, un mutante triple y constatamos que las 3 mutaciones tienen un efecto aditivo sobre la actividad transcripcional inducida por TCF4-VP16. Sin embargo, este mutante mantiene aún cierta actividad transcripcional, lo que no nos permite descartar la existencia de otros elementos de regulación o una actividad transcripcional residual de los sitios mutados (**Figura 27B**).

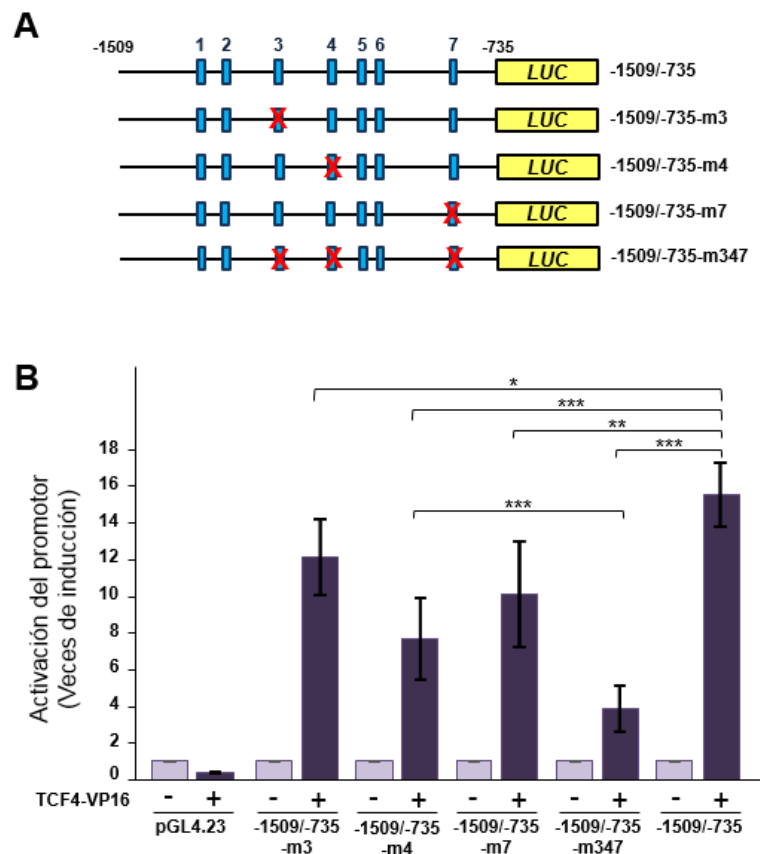


Figura 27. Los sitios de unión β -catenina/TCF situados en las posiciones 3, 4 y 7 del promotor de *PKP2* son los responsables de su regulación por factores Wnt. **(A)** Esquema de la construcción que contiene el fragmento -1509/-735 del promotor de *PKP2* y de los mutantes que se han utilizado en este estudio indicando la localización aproximada de los sitios β -catenina/TCF silvestres (5'-CCTTTG[A/T][A/T]-3', caja azul) o mutantes (5'-CCTTTGGC-3', caja azul con aspa roja). **(B)** Células HEK-293T se co-transfectaron con la construcción silvestre o con las distintas construcciones mutantes tal y como se indica en la figura junto con TCF4-VP16 (+) o su correspondiente vector vacío (-). El plásmido pRL-TK fue usado como control interno. Las células se lisaron 48 horas después de la transfección y se midieron las actividades Luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes valores de *Renilla*. Las barras de error representan la DE (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

Durante la transcripción, las regiones *enhancer* se sitúan cerca del inicio de transcripción y, de esta forma, los factores de transcripción unidos a estas secuencias pueden interactuar con la maquinaria basal de transcripción. Por ello, tal y como hemos descrito anteriormente, clonamos la región *enhancer* de *PKP2* tanto en su orientación directa como en la reversa y utilizamos las construcciones para transfectar células HEK-293T. TCF4-VP16 fue capaz de activar ambas construcciones de forma comparable a como activa el promotor de *DKK1*. Dicha inducción fue ligeramente superior en el caso de la construcción con orientación reversa (**Figura 28A y 28B**).

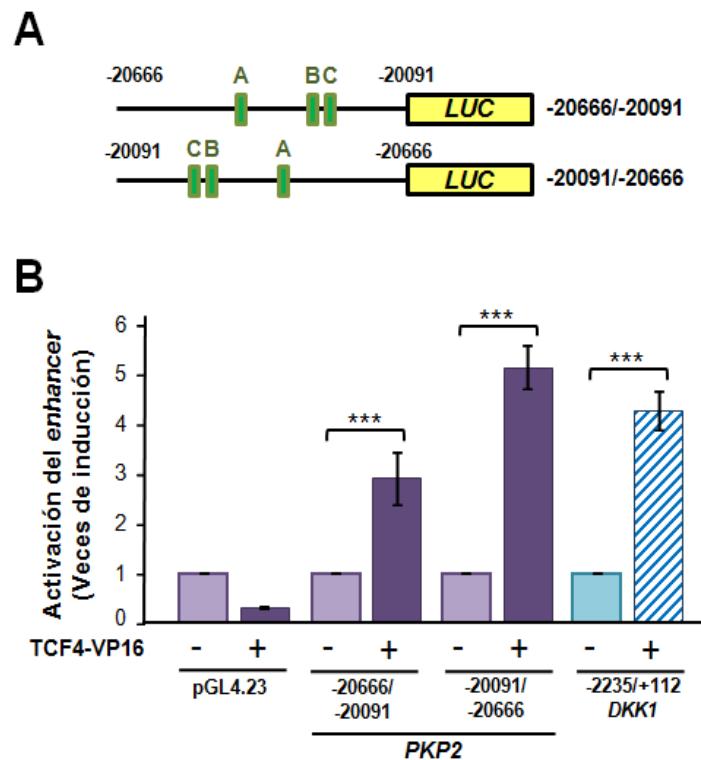


Figura 28. La región distal (*enhancer*) del gen *PKP2* presenta elementos reguladores β -catenina/TCF funcionales. **(A)** Esquemas de las construcciones que contienen la región *enhancer* en su orientación directa (-20666/-20091) y en su orientación reversa (-20091/-20666). Las cajitas verdes representan los posibles sitios β -catenina/TCF detectados. **(B)** Células HEK-293T se co-transfectaron con la construcción del *enhancer* en su orientación directa (-20666/-20091) o en su orientación reversa (-20091/-20666), según se indica, junto con TCF4-VP16 (+) o el correspondiente vector vacío (-). Una construcción del promotor de *DKK1* se utilizó como control positivo y pRL-TK como control interno. Las células fueron lisadas 48 horas después de la transfección y se midieron las actividades Luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes valores de *Renilla*. Las barras de error representan la DE (***) $P \leq 0,001$.

Al igual que hicimos con el promotor de *PKP2* realizamos mutaciones puntuales en cada uno de los 3 posibles sitios β -catenina/TCF detectados en la región *enhancer*

partiendo de la construcción con orientación reversa, por ser la que más se activaba (Figura 29A). El resultado que obtuvimos tras la transfección de los mutantes en células HEK-293T nos permitió determinar que la mutación del sitio A suprimía completamente la activación transcripcional inducida por TCF4-VP16. Las mutaciones en los sitios B y C fueron totalmente inocuas (Figura 29B).

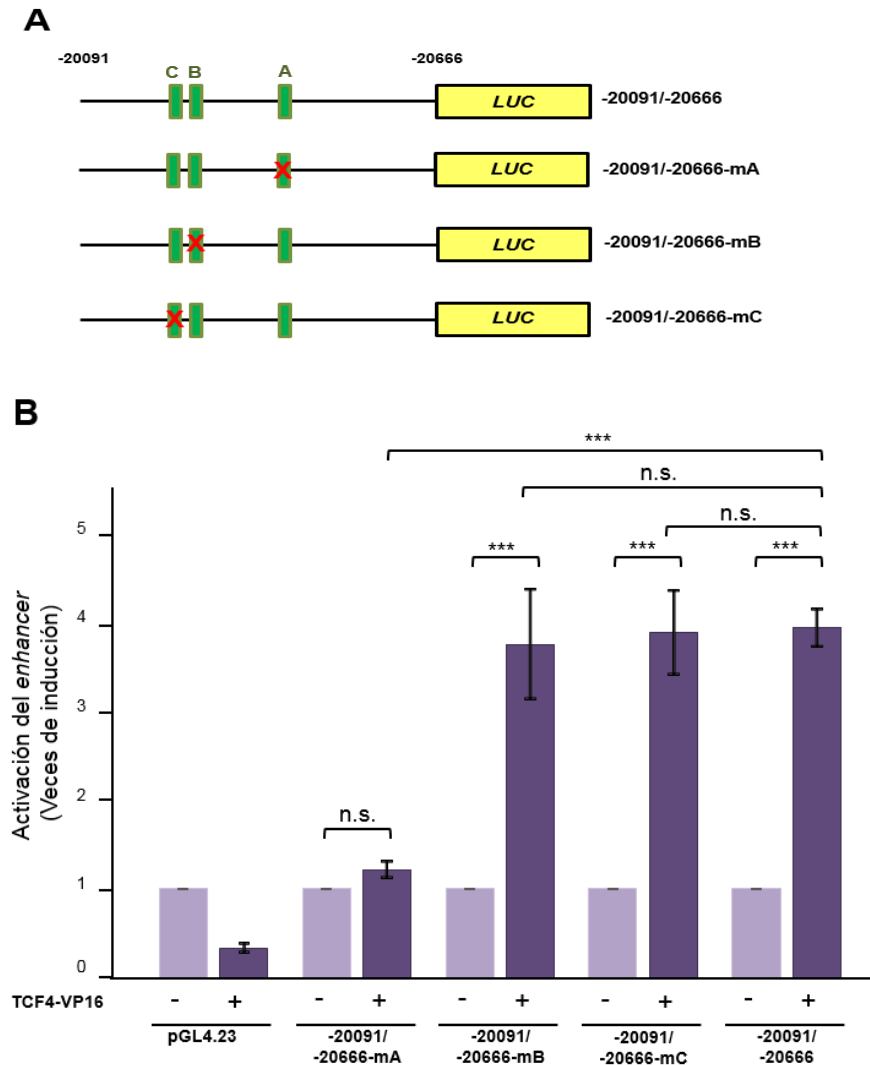


Figura 29. La región distal (enhancer) del gen *PKP2* presenta un sitio β -catenina/TCF funcional. (A) Esquema de la localización de los posibles sitios β -catenina/TCF en la región distal (enhancer) del gen *PKP2* y de las mutaciones realizadas. Se representa la construcción que contiene la región enhancer en su orientación reversa (-20091/-20666) con la localización de los posibles sitios β -catenina/TCF silvestres (5'-CCTTTG[A/T][A/T]-3', caja verde) o mutantes (5'-CCTTTGGC-3', caja verde con aspa roja). **(B)** Células HEK-293T se co-transfectaron con la construcción silvestre del enhancer en orientación reversa (-20091/-20666) o con las construcciones mutantes indicadas junto con TCF4-VP16 (+) o su correspondiente vector vacío (-). El plásmido pRL-TK fue usado como control interno. Las células se lisaron 48 horas después de la transfección y se midieron las actividades Luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes valores de *Renilla*. Las barras de error representan la DE (***) $P \leq 0,001$.

3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PROTEÍNA PLAKOFILINA-2 SOBRE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR β -CATENINA/TCF

A continuación, estudiamos el significado funcional del aumento de expresión del gen *PKP2* observado en fibroblastos CCD-18Co, IMR-90, NF y CAF, en respuesta a Wnt3A, sobre la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF. Para este fin usamos los plásmidos reporteros sintéticos pTOPFLASH y pFOPFLASH que contienen 3 copias de la secuencia consenso β -catenina/TCF silvestre y mutante, respectivamente, además del promotor mínimo de *c-FOS* y el gen reportero de la Luciferasa. Nuestros resultados mostraron que la expresión transitoria de Plakofilina-2 en células HEK-293T disminuía de forma muy significativa la actividad enzimática luciferasa inducida por β -catenina (**Figura 30**).

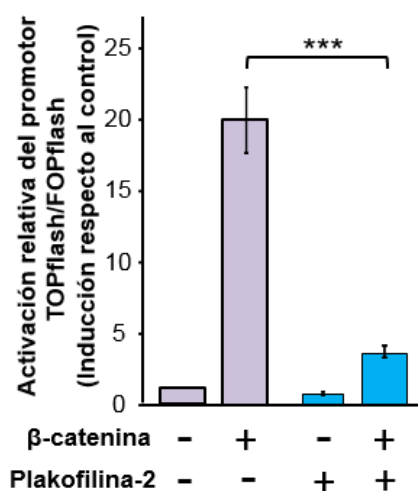


Figura 30. Plakofilina-2 antagoniza la actividad transcripcional de β -catenina. Células HEK-293T se co-transfectaron con los plásmidos reporteros pTOPFLASH o pFOPFLASH, para evaluar la activación transcripcional de la vía Wnt/ β -catenina, junto con un vector de expresión de β -catenina (+) y en presencia (+) o ausencia (-) de un vector de expresión de Plakofilina-2. El plásmido pRL-TK fue usado como control interno. Las células fueron lisadas 48 horas después de la transfección y se midieron las actividades Luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes de *Renilla*, los datos de pTOPFLASH se relativizaron frente a los correspondientes de la construcción mutante pFOPFLASH y se representaron como inducción respecto al control. Las barras de error representan la DE (***) $P \leq 0,001$).

Para comprobar si este antagonismo se producía de forma específica entre Plakofilina-2 y β -catenina se transfectaron células HEK-293T con un sistema similar de plásmidos reporteros para evaluar la actividad de la vía Notch (4xwtCBF1/4xmtCBF1) en respuesta a su inductor, el dominio intracelular de Notch1 (ICND) o con un plásmido reportero para evaluar la actividad de la vía NF- κ B (NF3) en respuesta a su inductor, la

proteína p65. En el primer caso, observamos que la presencia de Plakofilina-2 no alteraba de forma significativa la activación transcripcional inducida por ICND (**Figura 31A**). En cambio, la presencia de Plakofilina-2 aumentó de forma significativa la activación transcripcional del plásmido reportero NF3 inducida por la proteína p65 (**Figura 31B**), tal y como ya ha sido descrito previamente (Arimoto *et al.*, 2014). Estos resultados demuestran que el efecto de la proteína Plakofilina-2 sobre la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF es específico.

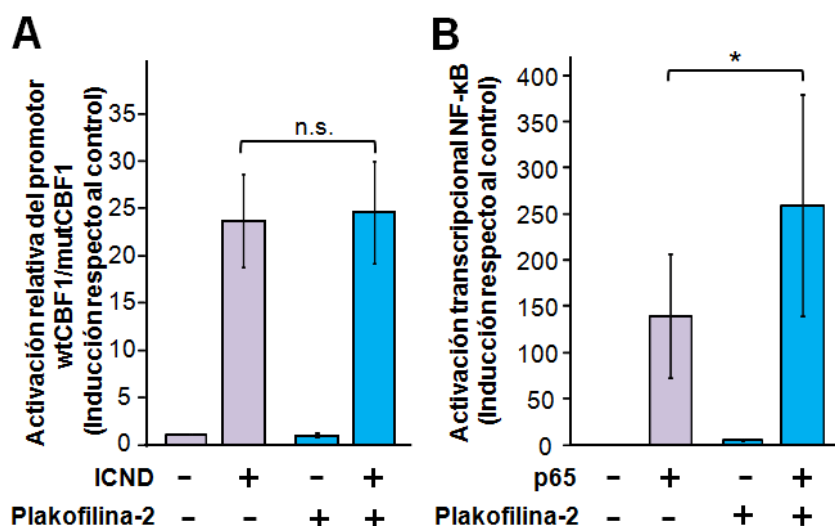


Figura 31. Plakofilina-2 antagoniza específicamente la actividad transcripcional mediada por β -catenina. (A) Se co-transfectaron células HEK-293T con los plásmidos reporteros 4xwtCBF1Luc y 4xmtCBF1Luc, para evaluar la actividad transcripcional de la vía Notch, junto con un vector de expresión del dominio intracelular del receptor Notch1 (ICND, +) y en presencia (+) o ausencia (-) de un plásmido de expresión de Plakofilina-2. El plásmido pRL-TK fue usado como control interno. Las células fueron lisadas 48 horas después de la transfección y se midieron las actividades Luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes de *Renilla*, los datos de 4xwtCBF1Luc se relativizaron frente a los correspondientes de la construcción mutante 4xmtCBF1Luc y se representaron como inducción respecto al control. Las barras de error representan la DE (n.s., no significativo). (B) Se co-transfectaron células HEK-293T con el plásmido reportero NF3, para evaluar la activación transcripcional de la vía NF- κ B, junto con un vector de expresión de p65 (+) y en presencia (+) o ausencia (-) de un plásmido de expresión de Plakofilina-2. Las muestras fueron procesadas como en (A), los valores obtenidos se normalizaron frente a los de *Renilla* y se han representado como inducción respecto al control. Las barras de error representan la DE (* $P \leq 0,05$).

Comprobamos además que el efecto antagónico de la Plakofilina-2 sobre la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF se seguía produciendo cuando se usaba un promotor no sintético, en concreto el del gen *DKK1* (**Figura 32A**). Adicionalmente, confirmamos que este efecto no era debido a una disminución de los niveles de β -catenina producida por la expresión de Plakofilina-2 (**Figura 32B**). En

conjunto, todos estos datos sugieren que la proteína Plakofilina-2 tiene un efecto inhibitorio sobre los promotores activados por β -catenina.

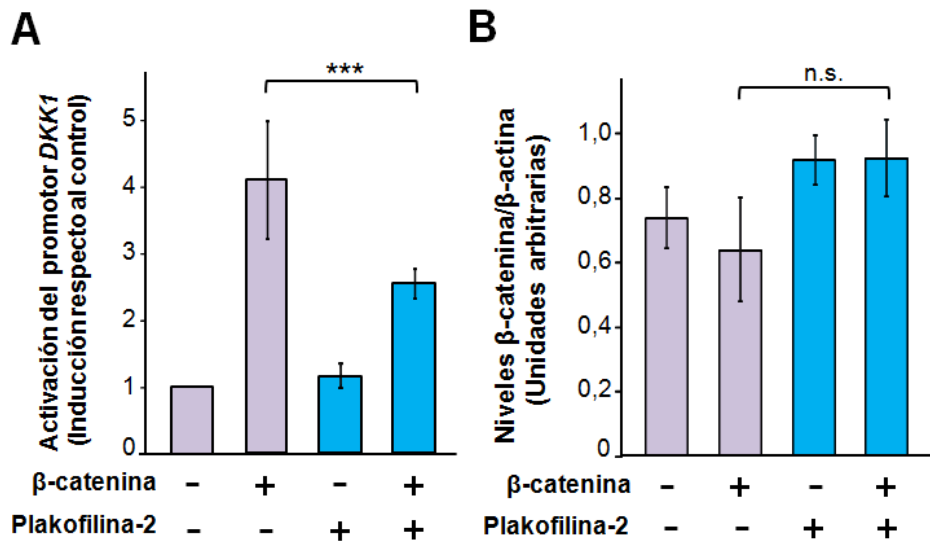


Figura 32. Plakofilina-2 disminuye la activación transcripcional del promotor de *DKK1* mediada por β -catenina. (A) Se transfectaron células HEK-293T con una construcción del promotor de *DKK1*, junto con un plásmido de expresión de β -catenina (+) y en presencia (+) o ausencia (-) de un plásmido de expresión de Plakofilina-2. El plásmido pRL-TK fue usado como control interno. Las células fueron lisadas 48 horas después de la transfección y se midieron las actividades Luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes de *Renilla* y se representaron como inducción respecto al control. Las barras de error representan la DE (***) $P \leq 0,001$). (B) Los extractos proteicos obtenidos en (A) fueron sometidos a SDS-PAGE y, seguidamente, se realizó un *western blot* para descartar la posibilidad de que los efectos de Plakofilina-2 sobre la transcripción dependiente de β -catenina/TCF fuesen debidos a cambios en los niveles de β -catenina como consecuencia de la expresión de Plakofilina-2 (n.s., no significativo).

Discusión

1. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA INDUCIDO POR EL FACTOR WNT3A EN LA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS DE COLON HUMANO CCD-18Co

Desde su descubrimiento, la vía Wnt/ β -catenina (Nusse y Varmus, 1982) se ha estudiado extensamente tanto en células epiteliales normales como en tumorales (carcinoma). Sin embargo, su actividad y papel en las células del estroma es desconocido. La alteración de esta vía ha sido implicada en una larga serie de enfermedades, entre ellas el cáncer. En el cáncer colorrectal, la vía Wnt/ β -catenina se encuentra frecuentemente alterada debido en gran parte a mutaciones activadoras en componentes intracelulares de la vía (Krausova *et al.*, 2014; Fearon, 2011), siendo un factor clave en el inicio y probablemente en la progresión de esta neoplasia.

En los últimos años numerosos trabajos han sugerido un papel importante del estroma tumoral en la formación y en el desarrollo del tumor (Micke y Östman, 2004; DeWever y Mareel, 2003; Chen y Huang, 2014; Chen *et al.*, 2014; Guinney *et al.*, 2015; Becht *et al.*, 2016). En particular, las células estromales del colon son esenciales en el mantenimiento de la homeostasis tisular, pero en un contexto patológico también contribuyen a la progresión del cáncer colorrectal. Igualmente, los factores Wnt extracelulares son clave tanto en el mantenimiento de la homeostasis de las criptas del colon como en la progresión tumoral, cuando la vía de señalización está alterada.

En este trabajo hemos observado que los fibroblastos de colon son muy sensibles a Wnt3A y que su presencia conduce a la activación o represión de un elevado número de genes. De entre todos ellos, destaca un grupo de genes cuya expresión se induce de forma elevada y consistente que codifican inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina. Los factores Wnt pueden actuar sobre las células epiteliales que se encuentran en la mitad inferior de la cripta y también sobre los fibroblastos pericriptales que los secretan y que poseen receptores funcionales en su membrana plasmática. El hecho que varios inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina se encuentren entre los genes diana que se regulan más fuertemente por Wnt3A, podría sugerir la existencia de un mecanismo que limite las acciones de la señalización Wnt en estas células o que quizás las proteja frente a los efectos que son necesarios para las células troncales y proliferativas de la zona baja de la cripta pero que podrían ser perjudiciales para los fibroblastos que los secretan. En este grupo de genes encontramos inhibidores intracelulares como Naked-1 o Naked-2, inhibidores transmembrana como APCDD1 o inhibidores extracelulares como DKK2. En el caso de DKK2, al ser una proteína de secreción, existe la posibilidad de que actúe no sólo limitando la activación de la vía Wnt/ β -catenina en los

fibroblastos pericriptales sino que también, al igual que los factores Wnt, pueda alcanzar las células epiteliales de la cripta e inhibir la señalización evitando la formación del complejo Fzd-LRP5/6-Wnt (**Figura 33**). Esta observación va en la misma dirección que la realizada en células epiteliales donde en respuesta a factores Wnt se detecta un aumento de la expresión del gen *DKK1* que codifica otro inhibidor de la familia Dickkopf (Niida *et al.*, 2004; González-Sancho *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 2005).

El análisis GSEA que realizamos mostró una correlación inversa entre nuestra lista de genes regulados por Wnt3A en los fibroblastos de colon humano CCD-18Co y una lista de genes característicos de la transición epitelio-mesenchima (EMT; FDR-qval=0,022; FWER p-val=0,019; **Figura 34A**). Esto indica que los genes cuya expresión aumenta durante la EMT son en cambio inhibidos en fibroblastos de colon tratados con Wnt3A. Este resultado contrasta con lo que ocurre en células cancerígenas de origen epitelial donde se sabe que la activación de la vía Wnt/ β -catenina favorece la EMT (Lindsey y Langhans, 2014), lo que sugiere que algunos programas genéticos que se inducen en respuesta a Wnt3A en fibroblastos son diferentes de los que se inducen en otros tipos celulares. Esto confirma algo que ya se sabía, que los genes diana de Wnt/ β -catenina son específicos de tejido. Además, hemos observado que la lista de genes cuya expresión se induce en presencia de la proteína de fusión oncogénica EWS-FLI1 en células de sarcoma de Ewing muestra una correlación positiva con nuestra lista de genes inducidos por Wnt3A en células CCD-18Co (FDR-qval<0,001; FWER p-val<0,001; **Figura 34B**), a pesar de que nuestro grupo y otros han demostrado un antagonismo mutuo entre EWS-FLI1 y la señalización Wnt/ β -catenina en sarcoma de Ewing (Navarro *et al.*, 2010; Pedersen *et al.*, 2016).

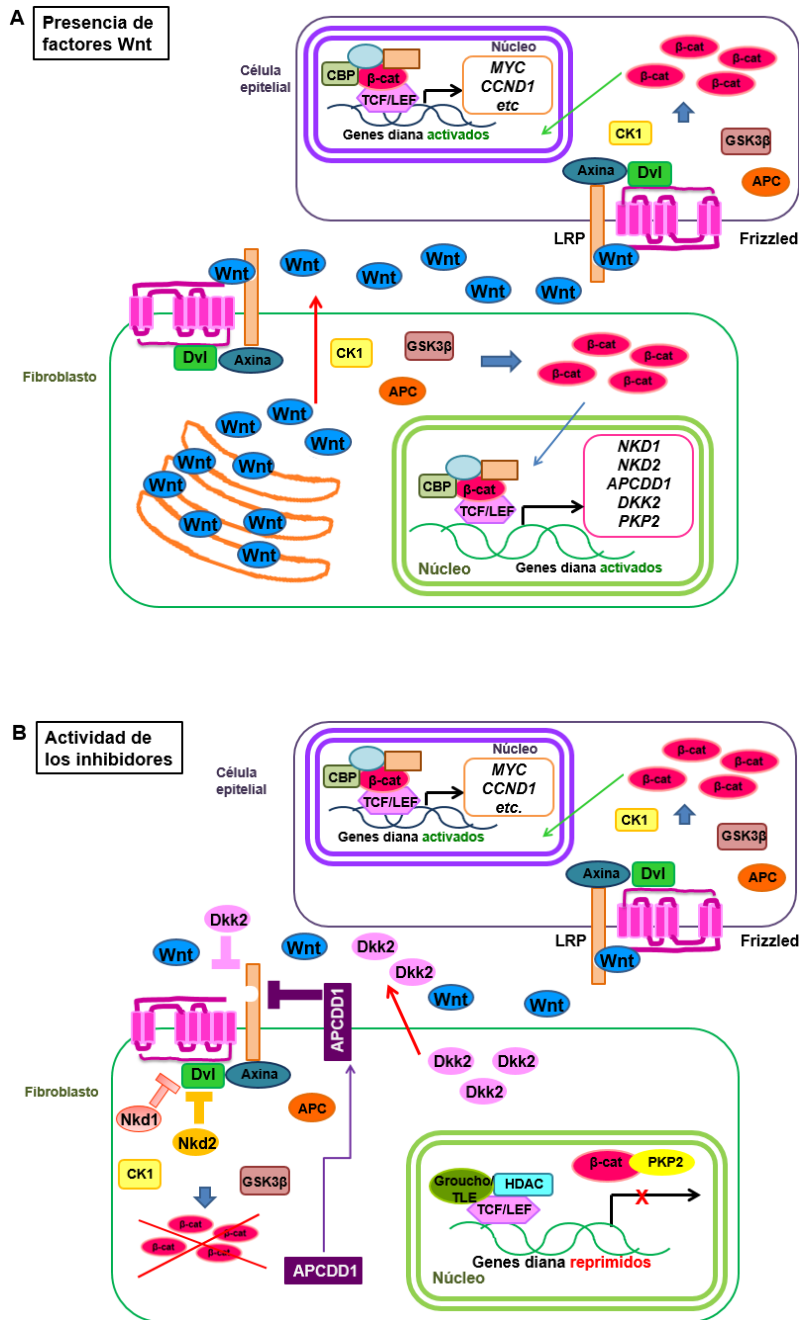


Figura 33. Esquema de la acción de genes inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina estudiados en esta Tesis doctoral. (A) Los factores Wnt sintetizados en los fibroblastos pericriptales son secretados y pueden interactuar con sus receptores de membrana tanto en las células epiteliales como en los fibroblastos que los han secretado. La activación de la vía Wnt/ β -catenina induce la transcripción de sus genes diana en las células epiteliales que, entre otros procesos, controlan la proliferación y el mantenimiento de la pluripotencialidad. En los fibroblastos se induce la transcripción de numerosos genes, entre ellos algunos que codifican inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina. **(B)** Se indican las acciones que ejercen los inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina que se han sintetizado en respuesta a los factores Wnt en los fibroblastos. En el caso de Dickkopf-2 (DKK2), al ser secretado, existe la posibilidad de que inhiba la vía Wnt/ β -catenina tanto en los fibroblastos como en las células epiteliales cercanas. En el caso de las células epiteliales también encontramos que la activación de la vía tiene como genes diana inhibidores de la propia vía como por ejemplo Axina2 o Dickkopf-1.

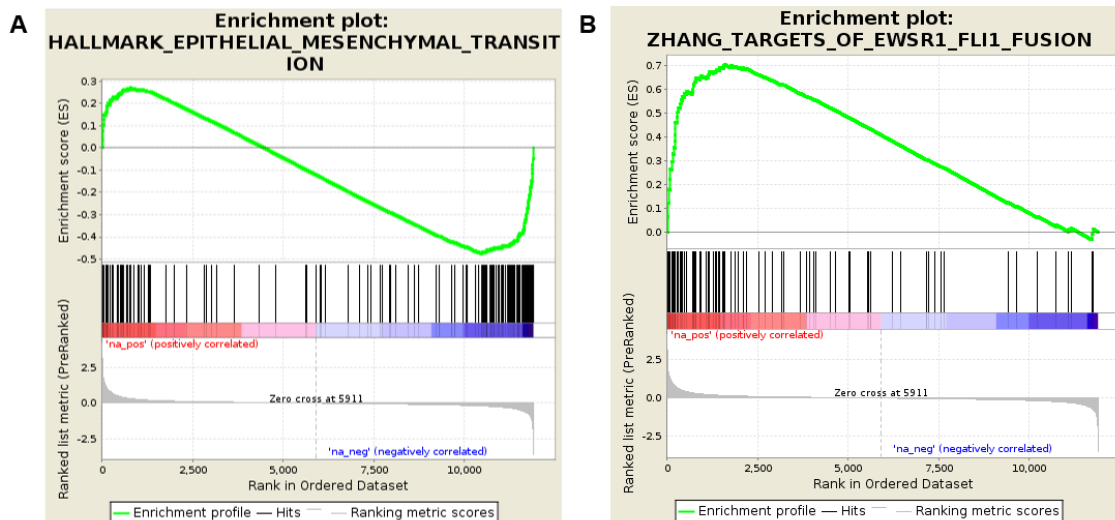


Figura 34. Gráficos de enriquecimiento. (A) Gráfico de enriquecimiento para la firma molecular “Transición epitelio-mesenquima”. La lista de genes regulados por Wnt3A en las células CCD-18Co se sometió a un análisis GSEA y observamos que la firma molecular (*hallmark*) de genes “inducidos en la transición epitelio-mesenquima” tiene una correlación inversa significativa respecto a la lista de genes regulados por Wnt3A en CCD-18Co. (B) Gráfico de enriquecimiento para la firma molecular “Dianas de la proteína de fusión EWS/FLI1”. La lista de genes regulados por Wnt3A en las células CCD-18Co se sometió a un análisis GSEA y observamos que la firma molecular de genes “inducidos por la proteína de fusión EWS/FLI1” correlaciona directamente con la lista de genes regulados por Wnt3A en las células CCD-18Co.

2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL GEN *PKP2*/PLAKOFILINA-2 POR WNT/ β -CATENINA Y EFECTO SOBRE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR β -CATENINA/TCF

Uno de los genes que muestra un mayor aumento de expresión en respuesta a Wnt3A es el gen *PKP2*, que codifica la proteína Plakofilina-2. Aunque es principalmente conocida por formar parte de los desmosomas de las células epiteliales, esta proteína está también involucrada en la formación de otros tipos de estructuras de adhesión que incluyen las uniones compuestas (*area composita*) de los cardiomiocitos y un tipo especial de uniones adherentes altamente específicas que contienen Plakofilina-2 (*coiuncciones adherentes*) y que se pueden encontrar en células mesenquimales con elevada tasa proliferativa (Franke *et al.*, 2009). Por otro lado, Plakofilina-2 parece tener funciones adicionales que no están relacionadas con la adhesión, ya que se ha observado su presencia en el núcleo celular (Mertens *et al.*, 1996; Mertens *et al.*, 2001). Los resultados de nuestros experimentos de transfección transitoria en células HEK-293T muestran que la expresión de Plakofilina-2 interfiere con la actividad

transcripcional β -catenina/TCF, lo que indicaría que esta molécula actúa como un inhibidor de la vía Wnt/ β -catenina. Desafortunadamente, las células CCD-18Co son muy resistentes tanto a la transfección transitoria como a la infección lentiviral, lo que ha impedido la realización de estudios de ganancia o pérdida de función.

Nuestros resultados contrastan con los publicados por Chen y colaboradores que muestran como Plakofilina-2 puede unirse a β -catenina y como la presencia de Plakofilina-2 en la línea celular de carcinoma de colon SW480 produce un efecto pequeño pero positivo sobre la actividad β -catenina/TCF (Chen *et al.*, 2002). Esta discrepancia nos sugiere que el efecto de Plakofilina-2 sobre la actividad transcripcional mediada por β -catenina puede ser específica del tipo celular o, quizá, dependiente del estatus de la vía Wnt/ β -catenina, ya que las células SW480 poseen una proteína APC mutada lo que significa que tienen la vía Wnt/ β -catenina activa de forma constitutiva. En este sentido, células mesenquimales multipotentes y células iPS procedentes de un paciente con el gen *PKP2* mutado presentan una actividad transcripcional β -catenina/TCF más baja que la de las células control, obtenidas de una persona sana (Khudiakov *et al.*, 2016). Es interesante destacar que, recientemente, Miyazaki y colaboradores han publicado que Plakofilina-1, otro miembro de la familia de las plakofilinas, es un mediador clave de la señalización a través de la vía Wnt/ β -catenina en la odontogénesis y en la diferenciación de los ameloblastos (Miyazaki *et al.*, 2016), lo que sugiere la existencia de una estrecha relación entre la familia *PKP* y la señalización Wnt/ β -catenina.

Nuestros datos indican que el gen *PKP2* se regula a través de varios sitios de unión β -catenina/TCF presentes en su promotor y en una región *enhancer* situada a aproximadamente 20 kb del TSS. El análisis de la secuencia de los posibles sitios β -catenina/TCF detectados en estas regiones reguladoras indica que la conservación de los nucleótidos centrales de la secuencia 5'-CCTTTG(A/T)(A/T)-3' es esencial para que sean funcionales. Cuando se altera la citidina en posición 5' (lo que ocurre en los sitios 3 y 7 del promotor), los sitios mantienen una funcionalidad parcial, mientras que cambios en una de las dos adenosinas/timidinas del extremo 3' dan lugar a sitios no funcionales. Los datos de ChIP-seq obtenidos del UCSC *Genome Browser* confirman que estos sitios son funcionales *in vivo* y que, por tanto, el gen *PKP2* es un nuevo gen diana de Wnt/ β -catenina.

En base a los resultados obtenidos se puede proponer el siguiente esquema de la zona reguladora de la expresión del gen *PKP2* en respuesta a la activación de la vía Wnt/ β -catenina: por un lado, a aproximadamente unas 20 kb del inicio de transcripción

tenemos una región reguladora que presenta un sitio β -catenina/TCF funcional; por otro, en la región promotora existen al menos 3 sitios β -catenina/TCF que contribuyen a potenciar la transcripción del gen (Figura 35).



Figura 35. Esquema de la organización de la región reguladora del gen *PKP2* en relación a los sitios β -catenina/TCF. Entre las posiciones -20666 y -20091 tenemos la región *enhancer* en la que encontramos un sitio β -catenina/TCF funcional (caja morada). En el promotor propiamente dicho, entre las posiciones -1509 y -735, encontramos 3 sitios β -catenina/TCF funcionales (cajas naranjas). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que estos 4 sitios contribuyen a la inducción de la expresión del gen *PKP2* (caja rosa) en respuesta a Wnt3A.

Cada vez hay más datos que sugieren que Plakofilina-2 y otras plakofilinas o proteínas desmosomales están implicadas en el cáncer (Huber y Petersen, 2015). Plakofilina-2 se expresa en una gran variedad de carcinomas (Mertens *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2006) y, en algunos de ellos, su expresión se asocia con un comportamiento invasivo y metastásico (Papagerakis *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2012). En 2014, Arimoto y colaboradores publicaron que Plakofilina-2 podía favorecer la progresión tumoral uniéndose al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y potenciando su actividad, tanto dependiente como independiente de ligando (Arimoto *et al.*, 2014; Kazlauskas *et al.*, 2014). Sin embargo, aún son necesarios más estudios para definir el papel específico de Plakofilina-2 en diferentes tipos de cáncer. De la misma forma, sería también importante determinar la relevancia que puede tener la expresión e inducción de Plakofilina-2 en respuesta a Wnt3A en CAF de cáncer colorrectal. Tradicionalmente, se ha asumido que las células de carcinoma de colon son insensibles a los factores Wnt, ya que poseen mutaciones en componentes intracelulares de la vía (*APC*, *CTNNB1*/ β -catenina, *AXINA1*) y, por tanto, la vía Wnt/ β -catenina está activada de forma constitutiva. Aunque recientemente se ha descrito que estas células pueden responder a proteínas Wnt exógenas y autocrinas intensificando la activación de la vía Wnt/ β -catenina (Voloshanenko *et al.*, 2013), es posible que los factores Wnt ejerzan algunos de sus efectos en células de cáncer de colon a través de la activación de los CAF, que como hemos visto en esta Tesis doctoral, son sensibles a la acción de estas proteínas. Hemos observado, sin embargo, que la expresión de *PKP2* aumenta en respuesta a Wnt3A tanto en NF como en CAF, lo que sugiere que

este gen no es inducido de forma específica en CAF, sino que es una diana transcripcional global de Wnt/ β -catenina en fibroblastos. Esta hipótesis se ve corroborada por nuestros datos en fibroblastos de pulmón IMR-90.

En resumen, en esta Tesis doctoral hemos mostrado que Wnt3A:

- a) Regula un amplio grupo de genes en los fibroblastos de colon humano CCD-18Co.
- b) Dentro de este grupo de genes hay varios que codifican inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina.
- c) El gen *PKP2*, que codifica la proteína Plakofilina-2, es una nueva diana transcripcional de la vía Wnt/ β -catenina y, además, podría funcionar como inhibidor *feedback* de la actividad transcripcional β -catenina/TCF en fibroblastos y quizá en otros tipos celulares.

La relevancia de este hallazgo proviene de los recientes datos que sugieren la implicación de Plakofilina-2 en cáncer, y más aún, si tenemos en cuenta el papel esencial que tiene en cardiomiocitos donde las mutaciones en *PKP2* son la principal causa de la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho. Por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar si *PKP2* es también un gen diana de Wnt en el corazón y esclarecer el papel que tiene en el cáncer colorrectal.

Conclusiones

1. Wnt3A, factor que induce la vía canónica Wnt/ β -catenina de señalización, ejerce una profunda acción reguladora de la expresión génica en la línea CCD-18Co de fibroblastos humanos de colon.
2. Wnt3A aumenta la expresión de un grupo de genes que codifican inhibidores intracelulares y extracelulares de la vía Wnt/ β -catenina en las células CCD-18Co y en fibroblastos de pulmón.
3. Wnt3A induce el gen *PKP2*/Plakofilina-2 en células CCD-18Co y en cultivos primarios de fibroblastos normales y asociados a cáncer aislados de pacientes con cáncer colorrectal.
4. La inducción de *PKP2*/Plakofilina-2 por Wnt3A es transcripcional, mediada por al menos tres sitios β -catenina/TCF en el promotor del gen y otro en una región reguladora situada aproximadamente 20 kb antes del inicio de transcripción.
5. Plakofilina-2 antagoniza la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF en células HEK-293T, comportándose como un inhibidor intracelular de la vía Wnt/ β -catenina.

Bibliografía

Ahn, V.E., Chu, M.L., Choi, H.J., Tran, D., Abo, A. y Weis, W.I. (2011) Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6. *Dev Cell*, 21, 862-873.

Arimoto, K., Burkart, C., Yan, M., Ran, D., Weng, S. y Zhang, D.E. (2014) Plakophilin-2 promotes tumor development by enhancing ligand-dependent and -independent epidermal growth factor receptor dimerization and activation. *Mol Cell Biol*, 34, 3843-3854.

Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A. y Aaronson, S.A. (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol*, 3, 683-686.

Bass-Zubek, A.E., Godsel, L.M., Delmar, M. y Green, K.J. (2009) Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 708-716.

Becht, E., de Reyniès, A., Giraldo, N.A., Pilati, C., Buttard, B., Lacroix, L., Selves, J., Sautès-Fridman, C., Laurent-Puig, P. y Fridman, W.H. (2016) Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 22, 4057-4066.

Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G. y Moses, H.L. (2004) TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*, 303, 848-851.

Bonné, S., van Hengel, J., Nollet, F., Kools, P. y van Roy, F. (1999) Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci*, 112, 2265-2276.

Boudin, E., Fijalkowski, I., PETERS, E. y Van Hul, W. (2013) The role of extracellular modulators of canonical Wnt signaling in bone metabolism and diseases. *Semin Arthritis Rheum*, 43, 220-240.

Budinska, E., Popovici, V., Tejpar, S., D'Ario, G., Lapique, N., Sikora, K.O., Di Narzo, A.F., Yan, P., Hodgson, J.G., Weinrich, S., Bosman, F., Roth, A. y Delorenzi, M. (2013) Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol*, 231, 63-76.

Cancer Genome Atlas N. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330-337.

Chamorro, M.N., Schwartz, D.R., Vonica, A., Brivanlou, A.H., Cho, K.R. y Varmus, H.E. (2005) FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J*, 24, 73-84.

Chen, S. y Huang, E.H. (2014) The colon cancer stem cell microenvironment holds keys to future cancer therapy. *J Gastrointest Surg*, 18, 1040-1048.

Chen, X., Bonne, S., Hatzfeld, M., van Roy, F. y Green, K.J. (2002) Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem*, 277, 10512-10522.

Chen, S.X., Xu, X.E., Wang, X.Q., Cui, S.J., Xu, L.L., Jiang, Y.H., Zhang, Y., Yan, H.B., Zhang, Q., Qiao, J., Yang, P.Y. y Liu, F. (2014) Identification of colonic fibroblast secretomes reveals secretory factors regulating colon cancer cell proliferation. *J Proteomics*, 110, 155-171.

Clevers, H. y Nusse, R. (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 149, 1192-1205.

Coiras, M., López-Huertas, M.R., Mateos, E. y Alcamí, J. (2008) Caspase-3-mediated cleavage of p65/RelA results in a carboxy-terminal fragment that inhibits I κ B α and enhances HIV-1 replication in human T lymphocytes. *Retrovirology*, 5:109.

Creyghton, M.P., Roël, G., Eichhorn, P.J., Hijmans, E.M., Maurer, I., Destrée, O. y Bernards, R. (2005) PR72, a novel regulator of Wnt signaling required for Naked cuticle function. *Genes Dev*, 19, 376-386.

Cruciat, C.M. y Niehrs, C. (2013) Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a015081.

Cunningham, F., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., Gil, L., Girón, C.G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S.E., Janacek, S.H., Johnson, N., Juettemann, T., Kähäri, A.K., Keenan, S., Martin, F.J., Maurel, T., McLaren, W., Murphy, D.N., Nag, R., Overduin, B., Parker, A., Patricio, M., Perry, E., Pignatelli, M., Riat, H.S., Sheppard, D., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Wilder, S.P., Zadissa, A., Aken, B.L., Birney, E., Harrow, J., Kinsella, R., Muffato, M., Ruffier, M., Searle, S.M., Spudich, G., Trevanion, S.J., Yates, A., Zerbino, D.R. y Flicek, P. (2015) Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res*, 43, 662-669.

De Sousa E Melo, F., Wang, X., Jansen, M., Fessler, E., Trinh, A., de Rooij, L.P., de Jong, J.H., de Boer, O.J., van Leersum, R., Bijlsma, M.F., Rodermond, H., van der Heijden, M., van Noesel, C.J., Tuijnman, J.B., Dekker, E., Markowitz, F., Medema,

- J.P. y Vermeulen, L. (2013) Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med*, 19, 614-618.
- Deng, C., Reddy, P., Cheng, Y., Luo, C.W., Hsiao, C.L. y Hsueh, A.J. (2013) Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. *J Cell Sci*, 126, 2060-2068.
- DeWever, O. y Mareel, M. (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*, 200, 429-47.
- Dubash, A.D., Kam, C.Y., Aguado, B.A., Patel, D.M., Delmar, M., Shea, L.D. y Green, K.J. (2016) Plakophilin-2 loss promotes TGF- β 1/p38 MAPK-dependent fibrotic gene expression in cardiomyocytes. *J Cell Biol*, 212, 425-438.
- Ellwanger, K., Saito, H., Clément-Lacroix, P., Maltry, N., Niedermeyer, J., Lee, W.K., Baron, R., Rawadi, G., Westphal, H. y Niehrs, C. (2008) Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol*, 28, 4875-4882.
- Elston, M.S. y Clifton-Bligh, R.J. (2010) Identification of Wnt family inhibitors: a pituitary tumor directed whole genome approach. *Mol Cell Endocrinol*, 326, 48-54.
- ENCODE Project Consortium. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489, 54-74.
- Fearon, E.R. (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*, 6, 479-507
- Fearon, E.R. y Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.
- Ferrer-Mayorga, G., Gómez-López, G., Barbáchano, A., Fernández-Barral, A., Peña, C., Pisano, D.G., Cantero, R., Rojo, F., Muñoz, A. y Larriba, M.J. (2016) Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. *Gut*, 0, 1-14.
- Filipovich, A., Gehrke, I., Poll-Wolbeck, S.J. y Kreuzer, K.A. (2011) Physiological inhibitors of Wnt signaling. *Eur J Haematol*, 86, 453-465.
- Franke, W.W., Rickelt, S., Barth, M. y Pieperhoff, S. (2009) he junctions that don't fit the scheme: special symmetrical cell-cell junctions of their own kind. *Cell Tissue Res*, 338, 1-17.

Gao, C., Xiao, G. y Hu, J. (2014) Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell Biosci*, 4:13

Gerbe, F. y Jay, P. (2016) Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunol*, doi:10.1038/mi.2016.68.

Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., Paul, M., Basson, C.T., McDermott, D.A., Lerman, B.B., Markowitz, S.M., Ellinor, P.T., MacRae, C.A., Peters, S., Grossmann, K.S., Drenckhahn, J., Michely, B., Sasse-Klaassen, S., Birchmeier, W., Dietz, R., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E. y Thierfelder, L. (2004) Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet*, 36, 1162-1164.

Giannakis, M., Hodis, E., Jasmine, Mu. X., Yamauchi, M., Rosenbluh, J., Cibulskis, K., Saksena, G., Lawrence, M.S., Qian, Z.R., Nishihara, R., Van Allen, E.M., Hahn, W.C., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Getz, G., Ogino, S., Fuchs, C.S. y Garraway, L.A. (2014) RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat Genet*, 46, 1264-1266.

Gómez-Orte, E., Sáenz-Narciso, B., Moreno, S. y Cabello, J. (2013) Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends Genet*, 29, 545-553.

González-Sancho J.M., Aguilera, O., García, J.M., Pendás-Franco, N., Peña, C., Cal, S., García de Herreros, A., Bonilla, F. y Muñoz, A. (2005) The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene*, 24, 1098-1103.

González-Sancho, J.M., Brennan, K.R., Castelo-Soccio, L.A. y Brown, A.M. (2004) Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6- independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize beta-catenin. *Mol Cell Biol*, 24, 4757-4768.

Gross, J.C. y Boutros, M. (2013) Secretion and extracellular space travel of Wnt proteins. *Curr Opin Genet Dev*, 23, 385-390.

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reynies, A., Schlicker, A., Sonesson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B.M., Morris, J.S., Simon, I.M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa, E. Melo F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., Homicsko, K., Maru, D., Manyam, G.C., Broom, B., Boige, V., Perez-Villamil, B., Laderas, T., Salazar, R., Gray, J.W., Hanahan, D., Tabernero, J., Bernardis, R., Friend, S.H., Laurent-Puig, P., Medema, J.P., Sadanandam, A., Wessels, L.,

Delorenzi, M., Kopetz, S., Vermeulen, L. y Tejpar, S. (2015) The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, 21, 1350-1356.

Guo, J., Cagatay, T., Zhou, G., Chan, C.C., Blythe, S., Suyama, K., Zheng, L., Pan, K., Qian, C., Hamelin, R., Thibodeau, S.N., Klein, P.S., Wharton, K.A. y Liu, W. (2009) Mutations in the human naked cuticle homolog NKD1 found in colorectal cancer alter Wnt/Dvl/beta-catenin signaling. *PLoS One*, 4, e7982.

Harterink, M. y Korswagen, H.C. (2012) Dissecting the Wnt secretion pathway: key questions on the modification and intracellular trafficking of Wnt proteins. *Acta Physiol (Oxf)*, 204, 8-16.

Hatzfeld, M. (2007) Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta*, 1773, 69-77.

Hatzfeld, M., Haffner, C., Schulze, K. y Venzens, U. (2000) The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol*, 149, 209-222.

Herrera, M., Islam, A.B., Herrera, A., Martín, P., García, V., Silva, J., Garcia, J.M., Salas, C., Casal, I., de Herreros, A.G., Bonilla, F. y Peña, C. (2013) Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin. Cancer Res*, 19, 5914-5926.

Hofmann, I., Mertens, C., Brettel, M., Nimmrich, V., Schnölzer, M. y Herrmann, H. (2000) Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci*, 113, 2471-2483.

Howitt, M.R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A.M., Tran, S.V., Weinstock, J.V., Gallini, C.A., Redding, K., Margolskee, R.F., Osborne, L.C., Artis, D. y Garrett, W.S. (2016) Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*, 351, 1329-1333.

Hsieh, J.J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M.G. y Hayward, S.D. (1996) Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol*, 16, 952-959.

Hu, T., Li, C., Cao, Z., Van Raay, T.J., Smith, J.G., Willert, K., Solnica-Krezel, L. y Coffey, R.J. (2010) Myristoylated Naked2 antagonizes Wnt-beta-catenin activity by degrading Dishevelled-1 at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 285, 13561-13568.

Huber, O. y Petersen, I. (2015) 150th Anniversary Series: Desmosomes and the Hallmarks of Cancer. *Cell Commun Adhes*, 22, 15-28.

Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J. y Matsumoto, K. (2003) The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol*, 23, 131-139.

James, R.G., Conrad, W.H. y Moon, R.T. (2008) Beta-catenin-independent Wnt pathways: signals, core proteins, and effectors. *Methods Mol Biol*, 468, 131-144.

Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B., Devarajan, E., Krishnappa, S., Pinilla, S., Droll, L. y Song, Y.H. (2010) Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors. *Anal cellular pathol*, 33, 61-79.

Kazlauskas, A. (2014) Plakophilin-2 promotes activation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*, 34, 3778-3779.

Keil, R., Schulz, J. y Hatzfeld, M. (2013) p0071/PKP4, a multifunctional protein coordinating cell adhesion with cytoskeletal organization. *Biol Chem*, 394, 1005-1017.

Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M. y Haussler, D. (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res*, 12, 996-1006.

Khudiakov, A.A., Kostina, D.A., Kostareva, A.A., Tomilin, A.N. y Malashicheva, A.B. (2016) The effect of plakophilin-2 gene mutations on the activity of canonical Wnt signaling. *Tsitologiya*, 10, 106-113.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. y Salzberg, S.L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 14, R36.

Koetsier, J.L., Amargo, E.V., Todorović, V., Green, K.J. y Godsel, L.M. (2014) Plakophilin 2 affects cell migration by modulating focal adhesion dynamics and integrin protein expression. *J Invest Dermatol*, 134, 112-122.

Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. y Clevers, H. (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*, 275, 1784-1787.

Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Harris, A.L. y Sivridis, E. (2006) Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res*, 66, 632-637.

Kowalczyk, A.P., Hatzfeld, M., Bornslaeger, E.A., Kopp, D.S., Borgwardt, J.E., Corcoran, C.M., Settler, A. y Green, K.J. (1999) The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *J Biol Chem*, 274, 18145-18148.

Krausova, M. y Korinek, V. (2014) Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal*, 26, 570-579.

Larraguibel, J., Weiss, A.R., Pasula, D.J., Dhaliwal, R.S., Kondra, R. y Van Raay, T.J. (2015) Wnt ligand-dependent activation of the negative feedback regulator Nkd1. *Mol Biol Cell*, 26, 2375-2384.

Lindsey, S. y Langhans, S.A. (2014) Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Oncol*, 4, artículo 358.

Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.

Lu, J.Y. y Sheng, J.Q. (2015) Advances in the study of Lynch syndrome in China. *World J Gastroenterol*, 21, 6861-6871.

MacDonald, B.T., Tamai, K. y He, X. (2009) Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17, 9-26.

Malinauskas, T. y Jones, E.Y. (2014) Extracellular modulators of Wnt signalling. *Curr Opin Struct Biol*, 29, 77-84.

Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A. y Niehrs, C. (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 417, 664-667.

Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. y Niehrs, C. (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 411, 321-325.

Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., Kirzin, S., Chazal, M., Fléjou, J.F., Benchimol, D., Berger, A., Lagarde, A., Pencreach, E., Piard, F., Elias, D., Parc, Y., Olschwang, S., Milano, G., Laurent-Puig, P. y Boige, V. (2013) Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*, 10(5):e1001453.

Medema, J.P., y Vermeulen, L. (2011) Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474, 318-326.

Mertens, C., Hofmann, I., Wang, Z., Teichmann, M., Sepehri Chong, S., Schnölzer, M. y Franke, W.W. (2001) Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7795-7800.

Mertens, C., Kuhn, C., Moll, R., Schwetlick, I. y Franke, W.W. (1999) Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. *Differentiation*, 64, 277-290.

Mertens, C., Kuhn, C. y Franke, W.W. (1996) Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol*, 135, 1009-1025.

Micke, P. y Östman, A. (2004) Tumour–stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*, 45 Suppl. 2, S163–S175.

Mink, S., Vashistha, S., Zhang, W., Hodge, A., Agus, D., y Jain, A. (2010) Cancer-associated fibroblasts derived from egfr-tki-resistant tumors reverse egfr pathway inhibition by egfr-tkis. *Mol cancer res*, 8, 809-820.

Miyazaki, K., Yoshizaki, K., Arai, C., Yamada, A., Saito, K., Ishikawa, M., Xue, H., Funada, K., Haruyama, N., Yamada, Y., Fukumoto, S. y Takahashi, I. (2016) Plakophilin-1, a Novel Wnt Signaling Regulator, Is Critical for Tooth Development and Ameloblast Differentiation. *PLoS One*, 11, e0152206.

Mueller, M.M. y Fusenig, N.E. (2004) Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4, 839 –849.

Müller, J., Ritt, D.A., Copeland, T.D. y Morrison, D.K. (2003) Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *EMBO J*, 22, 4431-4442.

Munoz, W.A., Lee, M., Miller, R.K., Ahmed, Z., Ji, H., Link, T.M., Lee, G.R., Kloc, M., Ladbury, J.E. y McCrea, P.D. (2014) Plakophilin-3 catenin associates with the ETV1/ER81 transcription factor to positively modulate gene activity. *PLoS One*, 9, e86784.

Nakayama, H., Enzan, H., Miyazaki, E., Naruse, K., Kiyoku, H., Hiroi, M. (1998) The role of myofibroblasts at the tumor border of invasive colorectal adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol*, 28, 615–620.

- Navarro, D., Agra, N., Pestaña, A., Alonso, J. y González-Sancho, J.M. (2010) The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes beta-catenin/TCF-mediated transcription. *Carcinogenesis*, 31, 394-401.
- Neutra, M.R., Frey, A. y Kraehenbuhl JP. (1996) Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, 86, 345-348.
- Niehhs, C. (2006) Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 25, 7469-7481.
- Niehhs, C. (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 767-779.
- Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., Sugano, S. y Akiyama, T. (2004) DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*, 23, 8520-8526.
- Nusse, R. y Varmus, H.E. (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31, 99-109.
- Nusse, R. (2012) Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, a011163.
- Ormanns, S., Neumann, J., Horst, D., Kirchner, T. y Jung, A. (2014) WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear β -Catenin depend on active PI3K signaling. *Oncotarget*, 5, 2999-3011.
- Papagerakis, S., Shabana, A.H., Depondt, J., Gehanno, P. y Forest, N. (2003) Immunohistochemical localization of plakophilins (PKP1, PKP2, PKP3, and p0071) in primary oropharyngeal tumors: correlation with clinical parameters. *Hum Pathol*, 34, 565-572.
- Patel, D.M. y Green, K.J. (2014) Desmosomes in the heart: a review of clinical and mechanistic analyses. *Cell Commun Adhes*, 21, 109-128.
- Pedersen, E.A., Menon, R., Bailey, K.M., Thomas, D.G., Van Noord, R.A., Tran, J., Wang, H., Qu, P.P., Hoering, A., Fearon, E.R., Chugh, R y Lawlor, E.R. (2016) Activation of Wnt/ β -Catenin in Ewing Sarcoma Cells Antagonizes EWS/ETS Function and Promotes Phenotypic Transition to More Metastatic Cell States. *Cancer Res*, 76, 5040-5053.

- Rasanen, K. y Vaheri, A. (2010) Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*, 316, 2713–2722.
- Reya, T. y Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434, 843-850.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. y Smyth, G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26, 139-140.
- Roepman, P., Schlicker, A., Tabernero, J., Majewski, I., Tian, S., Moreno, V., Snel, M.H., Chresta, C.M., Rosenberg, R., Nitsche, U., Macarulla, T., Capella, G., Salazar, R., Orphanides, G., Wessels, L.F., Bernards, R. y Simon, I.M. (2014) Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer*, 134, 552-562.
- Rousset, R., Mack, J.A., Wharton, K.A., Jr., Axelrod, J.D., Cadigan, K.M., Fish, M.P., Nusse, R. y Scott, M.P. (2001) Naked cuticle targets dishevelled to antagonize Wnt signal transduction. *Genes Dev*, 15, 658–671.
- Rousset, R., Wharton, K.A. Jr., Zimmermann, G. y Scott, M.P. (2002) Zinc-dependent interaction between dishevelled and the *Drosophila* Wnt antagonist naked cuticle. *J Biol Chem*, 277, 49019–49026
- Rubin, D.C., Shaker, A. y Levin, M.S. (2012) Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front Immunol*, 3, 107.
- Sadanandam, A., Lyssiotis, C.A., Homiczko, K., Collisson, E.A., Gibb, W.J., Wullschlegel, S., Ostos, L.C., Lannon, W.A., Grotzinger, C., Del Rio, M., Lhermitte, B., Olshen, A.B., Wiedenmann, B., Cantley, L.C., Gray, J.W. y Hanahan, D. (2013) A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*, 19, 619-625.
- Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H. y Kikuchi, A. (2010) Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J*, 29, 41-54.
- Schlicker, A., Beran, G., Chresta, C.M., McWalter, G., Pritchard, A., Weston, S., Runswick, S., Davenport, S., Heathcote, K., Castro, D.A., Orphanides, G., French, T., Wessels, L.F. (2012) Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med Genomics*, 5:66. doi: 10.1186/1755-8794-5-66.

Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Prätzel, S., Zimbelmann, R. y Franke, W.W.. (1997) Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res*, 290, 481-499.

Schwarz, J., Ayim, A., Schmidt, A., Jäger, S., Koch, S., Baumann, R., Dünne, A.A. y Moll, R. (2006) Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation. *Hum Pathol*, 37, 613-622.

Sebio, A., Kahn, M. y Lenz, H.J. (2014) The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 18, 611-615.

Semënov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kühl, M., Sokol, S. y He, X. (2001) Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol*, 11, 951-961.

Sharma, G., Sharma, A.R., Seo, E.M. y Nam, J.S. (2015) Genetic polymorphism in extracellular regulators of Wnt signaling pathway. *Biomed Res Int*, 2015, 1-9.

Shimomura, Y., Agalliu, D., Vonica, A., Luria, V., Wajid, M., Baumer, A., Belli, S., Petukhova, L., Schinzel, A., Brivanlou, A.H., Barres, B.A. y Christiano, A.M. (2010) APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature*, 464, 1043-1047.

Smith, E.A. y Fuchs, E. (1998) Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol*, 141, 1229-1241.

Sobolik-Delmaire, T., Reddy, R., Pashaj, A., Roberts, B.J. y Wahl, J.K. 3rd. (2010) Plakophilin-1 localizes to the nucleus and interacts with single-stranded DNA. *J Invest Dermatol*, 130, 2638-2646.

Solanas, G., Porta-de-la-Riva, M., Agustí, C., Casagolda, D., Sánchez-Aguilera, F., Larriba, M.J., Pons, F., Peiró, S., Escrivà, M., Muñoz, A., Duñach, M., de Herreros, A.G. y Baulida, J. (2008) E-cadherin controls beta-catenin and NF-kappaB transcriptional activity in mesenchymal gene expression. *J Cell Sci*, 121, 2224-2234.

Sugimura, R. y Li, L. (2010) Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 90, 243-256.

Takahashi, H., Nakatsuji, H., Takahashi, M., Avirmed, S., Fukawa, T., Takemura, M., Fukumori, T. y Kanayama, H. (2012) Up-regulation of plakophilin-2 and Down-regulation of plakophilin-3 are correlated with invasiveness in bladder cancer. *Urology*, 79, 240.e1-240.e8.

Takahashi, M., Fujita, M., Furukawa, Y., Hamamoto, R., Shimokawa, T., Miwa, N., Ogawa, M. y Nakamura, Y. (2002) Isolation of a novel human gene, APCDD1, as a direct target of the beta-Catenin/T-cell factor 4 complex with probable involvement in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*, 62, 5651-5656.

Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J. y Yang, Y. (2003) Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol*, 162, 899-908.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., y Jemal, A. (2015) Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*, 65, 87-108.

Torre, L.A., Siegel, R.L., Ward, E.M., y Jemal, A. (2016) Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 25, 16-27.

Van Raay, T.J., Coffey, R.J. y Solnica-Krezel, L. (2007) Zebrafish Naked1 and Naked2 antagonize both canonical and non-canonical Wnt signaling. *Dev Biol*, 309, 151-168.

van Tintelen, J.P., Entius, M.M., Bhuiyan, Z.A., Jongbloed, R., Wiesfeld, A.C., Wilde, A.A., van der Smagt, J., Boven, L.G., Mannens, M.M., van Langen, I.M., Hofstra, R.M., Otterspoor, L.C., Doevendans, P.A., Rodriguez, L.M., van Gelder, I.C. y Hauer, R.N. (2006) Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation*, 113, 1650-1658.

Voloshanenko, O., Erdmann, G., Dubash, T.D., Augustin, I., Metzsig, M., Moffa, G., Hundsrucker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., Demir, K., Boehm, C., Leible, S., Ball, C.R., Glimm, H., Spang, R. y Boutros, M. (2013) Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nat Commun*, 4, 2610.

Wang, X.Y., Yin, Y., Yuan, H., Sakamaki, T., Okano, H. y Glazer, R.I. (2008) Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways. *Mol Cell Biol*, 28, 3589-3599.

Wharton, K.A. Jr., Zimmermann, G., Rousset, R. y Scott, M.P. (2001) Vertebrate proteins related to Drosophila Naked Cuticle bind Dishevelled and antagonize Wnt signaling. *Dev Biol*, 234, 93-106.

Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R. y Nusse, R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423, 448-452.

Willert, K., Shibamoto, S. y Nusse, R. (1999) Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev*, 13, 1784-1787.

Williams, P. y Warwick, R. (1985) *Gray Anatomía*. Salvat Editores, S.A., Tomo II, 1481-1488.

Yan, D., Wallingford, J.B., Sun, T.Q., Nelson, A.M., Sakanaka, C., Reinhard, C., Harland, R.M., Fantl, W.J. y Williams, L.T. (2001) Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3802-3807.

Yue, W., Sun, Q., Dacic, S., Landreneau, R.J., Siegfried, J.M., Yu, J. y Zhang, L. (2008) Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis*, 29, 84-92.

Zeisberg, E., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M. y Kalluri, R. (2007) Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 67, 10123-10128.

Zhang, T., Boswell, E.L., McCall, S.J. y Hsu, D.S. (2015) Mismatch repair gone awry: Management of Lynch syndrome. *Crit Rev Oncol Hematol*, 93, 170-179.

Anexos

Material suplementario

Tabla suplementaria I. Lista de genes inducidos por Wnt3A en la línea de fibroblastos de colon humano CCD-18Co. Los genes con $FDR < 0,05$ aparecen ordenados de mayor a menor inducción (logFC). Los genes que codifican los inhibidores de la vía Wnt estudiados en esta Tesis doctoral aparecen sombreados en azul. El gen *PKP2* aparece sombreado en rosa.

Gen	Cromosoma	Inicio	Fin	logFC
<i>KCNK3</i>	2	26915581	26954066	7,702
<i>NKD1</i>	16	50582241	50668641	4,912
<i>CPLX2</i>	5	175223610	175311023	4,167
<i>GPC3</i>	X	132669776	133119673	4,117
<i>ODZ3</i>	4	183245137	183724177	3,213
<i>AXIN2</i>	17	63524683	63557740	3,174
<i>PKP2</i>	12	32943680	33049780	3,090
<i>PTGER3</i>	1	71318036	71513491	2,556
<i>FAM162B</i>	6	117073360	117086886	2,449
<i>LPPR4</i>	1	99729848	99775138	2,327
<i>APCDD1</i>	18	10454625	10488698	2,223
<i>DKK2</i>	4	107842959	107957453	2,221
<i>ILDR2</i>	1	166882441	166944561	2,093
<i>COLEC12</i>	18	319355	500729	1,820
<i>KCNQ5</i>	6	73331571	73908573	1,634
<i>IL16</i>	15	81489219	81605006	1,593
<i>NKD2</i>	5	1009168	1038925	1,532
<i>CXCL14</i>	5	134906371	134914969	1,497
<i>GJA5</i>	1	147228332	147245484	1,464
<i>ZNF503</i>	10	77157603	77161285	1,445
<i>ACPP</i>	3	132036211	132087146	1,444
<i>SPINT1</i>	15	41136246	41149853	1,444
<i>OSR1</i>	2	19551246	19558372	1,439
<i>SLCO2A1</i>	3	133651540	133748920	1,430
<i>C10orf114</i>	10	21783421	21786213	1,429
<i>RPLP0P2</i>	11	61382508	61406921	1,422
<i>RARB</i>	3	25469754	25639422	1,392
<i>LOC100132356</i>	5	43065289	43067073	1,391
<i>SYT7</i>	11	61282785	61348298	1,387
<i>GPR125</i>	4	22388999	22517672	1,358
<i>TNFRSF19</i>	13	24144723	24250232	1,354
<i>RORA</i>	15	60780483	61521502	1,348
<i>RNF128</i>	X	105937068	106040246	1,328
<i>SCN5A</i>	3	38589553	38691163	1,323
<i>SOBP</i>	6	107811317	107982513	1,309
<i>UBE2QL1</i>	5	6448736	6496834	1,305
<i>KIAA0040</i>	1	175126123	175162229	1,303
<i>SLC27A6</i>	5	128301210	128369335	1,287
<i>SETBP1</i>	18	42260138	42648475	1,278
<i>KIAA0355</i>	19	34745456	34846471	1,273
<i>NTM</i>	11	131240371	132206716	1,263

GREM2	1	240652873	240775462	1,263
TCF7	5	133450402	133483920	1,250
FAM45B	X	129628915	129631421	1,222
IL24	1	207070788	207076630	1,216
CDH6	5	31193796	31325237	1,208
SGK223	8	8175258	8239257	1,191
SLC9A3	5	473334	524549	1,185
PLCB1	20	8113296	8865547	1,166
FGFR3	4	1795039	1810599	1,164
CCDC75	2	37311594	37323738	1,155
FSTL4	5	132532152	132948223	1,155
CNIH3	1	224804179	224928249	1,148
KIT	4	55524095	55606881	1,144
ADRA1D	20	4201278	4229659	1,129
SH3RF2	5	145316126	145442879	1,121
CGNL1	15	57668705	57842921	1,114
DOCK4	7	111366164	111846462	1,099
KRTAP1-5	17	39182279	39183454	1,092
PALMD	1	100111431	100160097	1,091
ABCB1	7	87132948	87342564	1,083
MCOLN3	1	85483765	85514169	1,051
PPM1E	17	56833232	57062534	1,032
STXBP6	14	25281306	25519095	1,031
MMP10	11	102641233	102651359	1,027
CADM1	11	115044345	115375241	1,022
NHS	X	17393543	17754113	1,012
CCNJL	5	159678671	159739573	1,004
CYB5R2	11	7686326	7694821	0,994
BCAT1	12	24962958	25102393	0,986
ADAM19	5	156904312	157002783	0,977
USP44	12	95910888	95945263	0,964
ST8SIA1	12	22346325	22487648	0,961
SLC35F3	1	234040679	234460262	0,960
MYO5B	18	47349156	47721451	0,956
GLI3	7	42000548	42276618	0,952
FAM171B	2	187558789	187628512	0,951
C17orf76	17	16345341	16395480	0,948
LIPG	18	47088427	47119278	0,938
TMEM100	17	53796988	53809482	0,935
VWA2	10	115999018	116049751	0,933
FAM43A	3	194406622	194409766	0,925
C21orf58	21	47721047	47743785	0,916
CRISPLD2	16	84853587	84943116	0,915
GK	X	30671476	30748725	0,915
KCNN2	5	113698016	113832197	0,906
KCTD15	19	34287751	34306666	0,905
SYTL2	11	85405265	85522178	0,899
PDPN	1	13910252	13944452	0,887
TRPC3	4	122800183	122872909	0,886
GPR63	6	97245888	97285353	0,884

MEF2C	5	88014058	88199922	0,883
STC1	8	23699434	23712320	0,879
PAR3B	2	205410516	206480537	0,872
ISOC1	5	128430442	128449719	0,869
EYA4	6	133562495	133853258	0,866
HOPX	4	57514154	57547872	0,850
MDGA2	14	47308828	48144157	0,845
E2F2	1	23832920	23857712	0,838
CCR1	3	46243200	46249832	0,834
CCDC48	3	128720472	128759585	0,831
KIAA1161	9	34368907	34376894	0,820
KIAA0754	1	39875176	39882154	0,818
RAP2B	3	152880029	152886263	0,806
SKP2	5	36152189	36184147	0,799
GSTCD	4	106629941	106766910	0,795
PIGA	X	15337573	15353676	0,792
MND1	4	154265801	154336243	0,791
AGTPBP1	9	88161454	88356944	0,787
UGP2	2	64068098	64118696	0,784
SLC16A7	12	60083126	60175408	0,783
MPP4	2	202509597	202563417	0,782
RET	10	43572517	43625797	0,776
SEMA3A	7	83587659	83824217	0,767
TSHZ1	18	72922731	73001901	0,766
AMPH	7	38423297	38671167	0,765
MBOAT1	6	20100935	20212670	0,761
C12orf68	12	48577366	48579709	0,759
KIAA1199	15	81071712	81243999	0,758
MYBL2	20	42295709	42345122	0,758
RAPH1	2	204298539	204400058	0,757
INHBA	7	41728601	41742706	0,752
CCDC134	22	42196678	42222303	0,750
MOSPD1	X	134021662	134049297	0,750
SLC25A10	17	79679371	79688042	0,749
RIMS3	1	41086352	41131324	0,749
TBC1D2	9	100961280	101018003	0,746
RASSF7	11	560971	564025	0,744
ZSWIM5	1	45482076	45672250	0,736
CLCN3	4	170541722	170642157	0,735
AFAP1L2	10	116054583	116164515	0,733
ZFHX2	14	23990065	24020858	0,733
STARD5	15	81605105	81616524	0,732
MAMDC2	9	72658497	72841888	0,731
RNF152	18	59482304	59560304	0,729
CORO6	17	27941780	27948441	0,727
KIF15	3	44803209	44894748	0,725
TLE4	9	82186878	82341656	0,724
FAM111B	11	58874658	58894888	0,723
LRRC32	11	76368568	76381791	0,721
ZNRF3	22	29279890	29453475	0,720

PRDM1	6	106534195	106557811	0,720
MMP1	11	102660641	102668966	0,720
PDE4D	5	58264866	59481514	0,720
CAMK2N2	3	183977003	183979251	0,717
KCTD12	13	77454304	77460540	0,714
SPG25	2	169727401	169746944	0,711
CENPI	X	100354798	100417978	0,710
ARL4A	7	12726452	12730556	0,707
ZFPM2	8	106331147	106816767	0,703
WDR76	15	44119112	44160617	0,702
BMP7	20	55743809	55841707	0,700
C6orf132	6	42068857	42110715	0,699
MKI67	10	129894925	129924468	0,695
SKA1	18	47901392	47920538	0,690
ATAD5	17	29159023	29222295	0,689
SPIN4	X	62567107	62571218	0,684
CDT1	16	88870186	88875666	0,679
FAP	2	163027200	163100045	0,679
PPFIBP2	11	7535001	7674991	0,677
KIF24	9	34252522	34329198	0,675
HS3ST3A1	17	13399006	13505244	0,675
SLC2A3	12	8071824	8088892	0,675
MMD	17	53469974	53499341	0,673
KIF26B	1	245318287	245866428	0,673
MLF1IP	4	185615219	185655286	0,671
UHRF1	19	4909510	4962165	0,670
AMIGO2	12	47469490	47473734	0,670
STMN1	1	26210677	26233368	0,668
SSH2	17	27952965	28257018	0,667
ARL4C	2	235401686	235405693	0,665
CHTF18	16	838622	848040	0,664
NDC80	18	2571510	2616634	0,663
GPC4	X	132435064	132549205	0,659
AGPAT9	4	84457653	84527026	0,659
PREX2	8	68864603	69143897	0,657
SLC40A1	2	190425316	190445537	0,654
ZIK1	19	58095628	58103758	0,649
NXN	17	702585	883010	0,649
KIF18B	17	43003448	43025082	0,646
EZH2	7	148504475	148581414	0,645
FMNL2	2	153191751	153506348	0,643
FOSL2	2	28615779	28637516	0,643
BRCA2	13	32889617	32973809	0,642
C16orf59	16	2510115	2514964	0,638
E2F8	11	19245610	19262507	0,637
CEP72	5	612405	653666	0,636
SHANK1	19	51165084	51220195	0,635
ATP9A	20	50213314	50384908	0,634
TCF19	6	31126303	31131992	0,633
GSG2	17	3627197	3629992	0,632

ZNF300	5	150273954	150284545	0,627
LOC100287216	2	109743784	109746575	0,626
MXD3	5	176732501	176739292	0,622
MBOAT2	2	8996701	9143876	0,618
ASF1B	19	14230321	14247440	0,614
AURKB	17	8108049	8113883	0,612
C10orf118	10	115881974	115934364	0,611
CHN1	2	175664042	175870170	0,611
PTPN13	4	87515468	87736328	0,609
APBB2	4	40812044	41216635	0,608
APBA1	9	72042449	72287275	0,608
CDKN3	14	54863673	54886934	0,607
RBPJ	4	26321332	26433278	0,605
LOC150776	2	132250386	132279149	0,604
NEIL3	4	178230991	178284092	0,603
TROAP	12	49716971	49725514	0,600
FAM122B	X	133903596	133931262	0,599
RAD51AP1	12	4647950	4669213	0,595
GINS4	8	41386725	41402565	0,595
FAM89A	1	231154704	231175995	0,594
CDCA2	8	25316513	25365425	0,594
CDK2	12	56360556	56366568	0,592
RNF144A	2	7057523	7184309	0,591
CCNF	16	2479395	2508859	0,583
SEMA5A	5	9035138	9546233	0,581
C5	9	123714614	123812554	0,581
C17orf65	17	42253352	42264082	0,580
DIRC2	3	122513901	122599986	0,579
DNM3	1	171810621	172381857	0,578
NCAPH	2	97001484	97041274	0,578
RRM2	2	10262695	10271546	0,576
SHC4	15	49115934	49255641	0,575
SAP30L	5	153825517	153840613	0,574
DEPDC1	1	68939835	68962799	0,572
PAG1	8	81880046	82024303	0,572
BARD1	2	215593275	215674428	0,570
KIFC1	6	33359313	33377699	0,569
IQGAP3	1	156495197	156542396	0,565
BDH1	3	197236654	197300194	0,564
ELP4	11	31531297	31805329	0,564
DIAPH3	13	60239723	60738119	0,561
FAM115C	7	143318045	143427173	0,559
STXBP5	6	147525508	147708707	0,559
HJURP	2	234745486	234763212	0,558
E2F1	20	32263292	32274210	0,558
BUB1B	15	40453210	40513337	0,558
FAM54A	6	136552168	136571449	0,556
PGM2L1	11	74041361	74109502	0,556
CABIN1	22	24407765	24574596	0,556
CEP55	10	95256369	95288849	0,555

PRICKLE1	12	42852140	42983572	0,555
DMC1	22	38914954	38966189	0,554
GLT25D2	1	183904966	184006863	0,553
ADORA1	1	203096836	203136533	0,552
MRV11	11	10594638	10715535	0,552
KIF2C	1	45205490	45233438	0,552
SNAP25	20	10199477	10288065	0,551
MCM10	10	13203554	13253104	0,551
PLK4	4	128802016	128820377	0,550
TOP2A	17	38544773	38574202	0,549
MCM7	7	99690404	99699427	0,549
FIGNL1	7	50511832	50518088	0,548
PTPLA	10	17631958	17659373	0,548
L2HGDH	14	50709152	50778947	0,548
ITPKB	1	226819391	226926876	0,546
CORO7	16	4404543	4466639	0,543
LBH	2	30454397	30482899	0,543
FANCG	9	35073835	35080013	0,543
GPR161	1	168053997	168105624	0,542
KIAA0101	15	64657211	64673702	0,541
SIK2	11	111473170	111597632	0,541
GNAI1	7	79764140	79848725	0,541
KIF4A	X	69509879	69640774	0,540
MCM8	20	5931298	5975831	0,540
CASC5	15	40886447	40954881	0,539
ESPL1	12	53662083	53687427	0,536
CDK1	10	62538089	62554610	0,533
MYO10	5	16662016	16936385	0,533
CLSPN	1	36197713	36235551	0,530
SLC12A2	5	127419483	127525380	0,529
MGAT5	2	135011830	135206468	0,529
GDE1	16	19513015	19533450	0,529
SOX4	6	21593972	21598849	0,529
ABLIM1	10	116190869	116444414	0,525
AHRR	5	304291	438405	0,525
RAB3B	1	52373628	52456436	0,522
LMNB1	5	126112315	126172712	0,522
LRRN3	7	110731062	110765509	0,522
BRIP1	17	59756547	59940920	0,522
COL6A3	2	238232655	238322850	0,520
ORC1	1	52838501	52870143	0,520
UBE2C	20	44441255	44445596	0,519
C4orf21	4	113460489	113558119	0,518
CCDC21	1	26560693	26605299	0,518
EPS8	12	15773075	15942510	0,516
DUSP5	10	112257625	112271302	0,516
SLC16A6	17	66263167	66287405	0,516
MESDC1	15	81293295	81296345	0,515
ERCC6L	X	71424507	71458858	0,515
DLG1	3	196769431	197025447	0,515

SRPX2	X	99899163	99926296	0,513
GIN51	20	25388323	25429191	0,513
CDCA8	1	38158159	38175391	0,513
CHSY3	5	129240523	129522327	0,513
CENPF	1	214776532	214837914	0,510
KIF11	10	94352825	94415152	0,509
ANKRD32	5	93954391	94031573	0,507
ZNF213	16	3185057	3192805	0,507
CSGALNACT2	10	43633934	43680749	0,506
FANCD2	3	10068113	10143614	0,505
WDHD1	14	55405656	55493819	0,504
WDR27	6	169857307	170102159	0,503
POLD1	19	50887593	50921271	0,501
PRR5L	11	36317725	36486754	0,501
LAMA2	6	129204286	129837710	0,501
SYTL4	X	99929489	99987135	0,500
PRDM2	1	14026735	14151574	0,500
C15orf42	15	90118818	90171200	0,500
NTF3	12	5541280	5604465	0,500
TACC3	4	1723266	1746897	0,499
MYLIP	6	16129317	16148478	0,498
BNC2	9	16409501	16870786	0,496
NCAPG	4	17812525	17844002	0,495
FANCA	16	89803959	89883065	0,495
GIN53	16	58426298	58440048	0,495
DRP2	X	100474933	100519485	0,494
AURKA	20	54944445	54967351	0,493
DNA2	10	70173821	70231879	0,493
CNPY4	7	99717265	99723128	0,493
RGS12	4	3315874	3441640	0,492
ASTN2	9	119187504	120177317	0,491
MMP3	11	102706528	102714342	0,490
CCNA2	4	122737603	122745088	0,489
ARNT2	15	80696692	80890277	0,489
GREM1	15	33010205	33026870	0,487
LEF1	4	108968701	109090112	0,487
NUSAP1	15	41624926	41673248	0,487
TIMELESS	12	56810157	56843200	0,487
CENPL	1	173768688	173793777	0,487
CDCA5	11	64844927	64851615	0,486
MAD2L1	4	120980579	120988013	0,486
HUNK	21	33245628	33376377	0,485
CIT	12	120123598	120315092	0,485
POLE	12	133200348	133263945	0,484
ETV1	7	13930856	14031050	0,482
SEMA3C	7	80371854	80548667	0,481
CDC6	17	38444146	38459413	0,481
RFC3	13	34392206	34540695	0,479
EXO1	1	242011493	242053241	0,479
UBE2T	1	202300785	202311094	0,479

FEN1	11	61560150	61564710	0,478
CDCA7L	7	21940517	21985542	0,478
SYNE2	14	64319683	64693167	0,477
RAD51	15	40987327	41024356	0,476
CDK14	7	90338712	90839904	0,476
SPATA5	4	123844225	124240604	0,476
MARCKSL1	1	32799440	32801834	0,475
ZWINT	10	58117199	58121034	0,474
FUT8	14	65879535	66209962	0,474
CDK17	12	96672039	96794366	0,474
RFC5	12	118454508	118470039	0,473
H2AFX	11	118964585	118966177	0,472
LZTS1	8	20103676	20112803	0,472
TEX11	X	69748790	70128567	0,470
DENND2A	7	140218220	140302342	0,469
TCF21	6	134210259	134216675	0,468
ACACB	12	109577202	109706030	0,467
CRMP1	4	5822491	5894785	0,467
CABLES1	18	20714528	20840434	0,467
KCNE1	21	35818988	35883613	0,466
FANCI	15	89787194	89860362	0,466
ZNF710	15	90544752	90625432	0,466
TBC1D19	4	26585546	26756918	0,465
DHTKD1	10	12110934	12165224	0,464
ST3GAL5	2	86066271	86116157	0,463
DCBLD1	6	117803820	117891020	0,462
CDK2AP2	11	67273968	67276102	0,462
OSBPL6	2	179059374	179260875	0,457
PIK3CD	1	9711790	9789078	0,457
SLC37A4	11	118895061	118901616	0,456
TRIP13	5	892969	918164	0,455
VAT1L	16	77822483	78014001	0,454
RFWD3	16	74655297	74700779	0,452
KLHL2	4	166128770	166244308	0,451
MCOLN2	1	85391266	85462796	0,451
NHSL1	6	138743181	138893668	0,450
FRY	13	32605437	32870776	0,448
PAQR4	16	3019342	3023485	0,448
ARHGAP26	5	142150292	142608572	0,446
CENPO	2	25016252	25045245	0,446
ATAD2	8	124332091	124408705	0,446
MCC	5	112357796	112824527	0,446
DUSP14	17	35849951	35873588	0,445
C1orf183	1	112264686	112282046	0,445
HMMR	5	162887517	162918953	0,444
TPX2	20	30326904	30389603	0,444
PKMYT1	16	3024001	3030540	0,444
KLF8	X	56258822	56314322	0,443
KIF23	15	69706688	69740764	0,441
IPMK	10	59951278	60027694	0,441

ALCAM	3	105085713	105295744	0,440
DTL	1	212209003	212278187	0,439
NCAPG2	7	158424003	158497520	0,437
GDPD5	11	75145685	75236599	0,436
ARSK	5	94890825	94940806	0,435
COL13A1	10	71561644	71718904	0,435
ANO4	12	101188374	101522419	0,434
FBXO34	14	55738021	55820329	0,434
BRCA1	17	41196312	41277500	0,433
SLC38A4	12	47158544	47219780	0,432
CALD1	7	134464164	134655480	0,431
TUBB3	16	89988417	90002505	0,431
MMP15	16	58059282	58080804	0,430
NCAPD2	12	6603298	6641132	0,429
KRT34	17	39533921	39538636	0,428
HOXB2	17	46620019	46622393	0,428
TLE1	9	84198598	84303596	0,427
SHCBP1	16	46614468	46655311	0,426
KIAA1211	4	57036361	57196890	0,425
DEK	6	18224400	18264799	0,423
ITGA6	2	173292314	173371181	0,423
MAP4K5	14	50885243	50999376	0,420
GLIS3	9	3824128	4300035	0,418
CDKN2C	1	51434367	51440306	0,418
SEMA7A	15	74701630	74726299	0,418
TMEM35	X	100333836	100351355	0,417
C2CD3	11	73745480	73882064	0,416
SNX24	5	122181160	122344902	0,416
NET1	10	5454518	5500426	0,415
FNIP2	4	159690182	159827954	0,414
CNNM2	10	104678114	104838240	0,414
CKAP2	13	53029495	53050763	0,413
GTSE1	22	46692638	46726707	0,413
RACGAP1	12	50382945	50419307	0,412
TRPV2	17	16318856	16340317	0,411
C5orf30	5	102594442	102614361	0,409
TTF2	1	117602949	117645491	0,408
GMNN	6	24775164	24786278	0,408
SGOL2	2	201390865	201448818	0,408
CCNB2	15	59397320	59417244	0,407
ACSS2	20	33462766	33515769	0,406
FHOD3	18	33877702	34360018	0,406
PDE7A	8	66629905	66753755	0,405
PLK1	16	23690201	23701625	0,404
NYNRIN	14	24867992	24888494	0,404
KIF22	16	29802058	29816706	0,403
MAN1A1	6	119499267	119670926	0,403
FOXM1	12	2966849	2986303	0,402
CTNNA1	9	111704851	111775764	0,401
CHAF1A	19	4402660	4443394	0,401

DDX26B	X	134654555	134716460	0,400
KNTC1	12	123011809	123110947	0,399
CKAP2L	2	113495444	113522254	0,398
BTBD9	6	38136227	38607924	0,398
C1GALT1	7	7222246	7288251	0,398
TMPO	12	98909676	98944157	0,397
ENTPD4	8	23289572	23315244	0,397
DCLRE1B	1	114447915	114456708	0,397
ID2	2	8822113	8824583	0,396
NUP214	9	134000981	134109091	0,396
SKA3	13	21727734	21746820	0,396
PRC1	15	91509268	91537804	0,394
PKNOX1	21	44394643	44453688	0,394
TGM2	20	36756864	36793700	0,394
PDE4DIP	1	144851424	145076186	0,393
DLGAP5	14	55614834	55658396	0,393
ROD1	9	114980715	115095944	0,393
WWP1	8	87354994	87480178	0,392
SAMD4A	14	55034637	55260033	0,392
PBX3	9	128509617	128729655	0,392
PSTPIP2	18	43563502	43652250	0,389
ARHGEF18	19	7459999	7537371	0,389
LIG1	19	48618703	48673560	0,389
OSMR	5	38845960	38935743	0,388
POLA1	X	24712064	25015102	0,388
GALNT10	5	153570295	153800543	0,388
RBL1	20	35626178	35724410	0,387
SSFA2	2	182756472	182795464	0,387
DCBLD2	3	98514814	98620533	0,386
IDI1	10	1085964	1095061	0,386
LRRC45	17	79981280	79989027	0,385
TRIM59	3	160153291	160167626	0,385
PPME1	11	73882368	73965748	0,383
PBK	8	27667138	27695349	0,383
NT5DC3	12	104166081	104234975	0,383
C15orf23	15	40674922	40686489	0,382
CENPK	5	64813593	64858995	0,381
MCM4	8	48873494	48890068	0,381
POLA2	11	65029432	65065088	0,379
H2AFZ	4	100869244	100871512	0,378
FKBP5	6	35541362	35688325	0,377
SCD	10	102106772	102124588	0,377
DHX40	17	57642886	57685713	0,376
C1orf198	1	230972865	231005335	0,375
MCM5	22	35796116	35820495	0,375
NAV2	11	19372271	20143147	0,374
KIAA1632	18	43427574	43547305	0,374
INCENP	11	61891445	61920635	0,373
LOC151162	2	135206960	135212192	0,373
MVD	16	88718348	88729495	0,373

CISD1	10	60028895	60049019	0,372
ANLN	7	36429432	36493400	0,372
GLI2	2	121554867	121750229	0,372
POLQ	3	121150273	121264853	0,371
MCM2	3	127317253	127341278	0,370
TNC	9	117782805	117880486	0,369
WDR62	19	36545783	36596012	0,368
CDCA3	12	6957972	6960456	0,367
ACAT2	6	160182989	160199312	0,366
ZWILCH	15	66797431	66841822	0,365
ARHGAP11A	15	32907691	32931868	0,365
FAM178A	10	102672326	102724891	0,365
KPNA2	17	66031848	66042970	0,364
TTC7A	2	47168313	47303275	0,364
RPS6KA3	X	20168029	20284750	0,363
MYO1B	2	192110107	192290115	0,363
FAM83D	20	37554955	37581703	0,362
CCDC51	3	48473580	48481529	0,361
C16orf70	16	67143915	67182004	0,361
SPAG5	17	26904583	26926056	0,360
C10orf58	10	82168242	82192753	0,360
SMC2	9	106856541	106903700	0,358
ZNF804A	2	185463093	185804214	0,357
STIL	1	47715811	47779819	0,356
CENPE	4	104026963	104119566	0,354
TTK	6	80714322	80752244	0,353
ANK1	8	41510744	41754280	0,353
CYB5B	16	69458498	69500167	0,353
NR2F2	15	96869157	96883492	0,353
KIF20A	5	137514417	137523336	0,352
CAMK2D	4	114372188	114683083	0,349
NBL1	1	19969726	19984945	0,349
CEP192	18	12991361	13125051	0,349
LCOR	10	98592017	98724198	0,349
CDC20	1	43824626	43828873	0,349
IRS1	2	227596033	227663506	0,347
LPCAT2	16	55542913	55620582	0,346
TK1	17	76170160	76183285	0,345
POLD3	11	74303629	74353765	0,345
CUL4B	X	119658446	119709684	0,344
MASTL	10	27443753	27475848	0,344
KIAA1524	3	108268718	108308336	0,343
ORC6	16	46723558	46732306	0,343
CLCN5	X	49687225	49863892	0,342
STARD4	5	110834022	110848157	0,338
KIF13B	8	28924795	29120610	0,336
LOC100294145	6	32861953	32871535	0,336
HMGB2	4	174252527	174255595	0,335
KALRN	3	123813558	124440036	0,333
DSN1	20	35380194	35402230	0,333

TGFB2	1	218518676	218617961	0,332
DHCR24	1	55315300	55352921	0,331
ITSN1	21	35014784	35261609	0,331
ZADH2	18	72909278	72921281	0,329
TMEM194A	12	57449426	57472574	0,328
MCM3	6	52128812	52149582	0,328
FN1	2	216225179	216300791	0,325
TTLL5	14	76127551	76421425	0,325
IGF1R	15	99192761	99507759	0,324
SMC4	3	160117430	160152741	0,324
NEURL1B	5	172068276	172118533	0,320
PRR11	17	57232860	57284070	0,320
BUB1	2	111395409	111435684	0,319
HEG1	3	124684554	124774802	0,318
MAST2	1	46269285	46501796	0,315
LMO7	13	76194570	76434006	0,315
INMT	7	30793347	30797218	0,315
CENPN	16	81040103	81066709	0,315
FAM198B	4	159045732	159094202	0,315
HMGB3	X	150151763	150159248	0,312
GEN1	2	17935177	17966632	0,312
KIF20B	10	91461367	91534700	0,312
CYTH3	7	6201412	6312242	0,311
FADS2	11	61595713	61634825	0,311
TMEM47	X	34645181	34675405	0,309
RUNX1	21	36160098	36421595	0,309
FOXRED2	22	36883233	36903148	0,308
TTC28	22	28374002	29075853	0,308
FAM84A	2	14772810	14780168	0,307
WIPI1	17	66417422	66453653	0,307
USP1	1	62901975	62917475	0,306
PTPLAD1	15	65822827	65870693	0,306
CLN6	15	68499330	68522080	0,306
NMT2	10	15147771	15210695	0,305
RHOBTB3	5	95066850	95132071	0,305
GAS7	17	9813926	10101868	0,304
CDC42EP1	22	37956471	37965410	0,304
INSIG1	7	155089486	155101945	0,304
TMEM48	1	54231134	54304225	0,303
GLUL	1	182350839	182361341	0,302
QTRT1	19	10812112	10824043	0,302
KLHDC5	12	27933187	27955973	0,301
TEAD1	11	12695969	12966284	0,300
VCAM1	1	101185196	101204601	0,300
RRM1	11	4115924	4160106	0,298
ZFP90	16	68573661	68601039	0,297
ITGA11	15	68594042	68724492	0,297
HAUS2	15	42841011	42862190	0,295
HEATR5B	2	37208153	37311485	0,294
FAM111A	11	58910318	58922511	0,294

MYH10	17	8377530	8534036	0,294
SC4MOL	4	166248818	166264225	0,292
WNT5A	3	55499743	55521331	0,289
RAB15	14	65412532	65438875	0,288
DNMT1	19	10244022	10305755	0,287
LRP8	1	53711212	53793726	0,286
ARID3A	19	926037	972803	0,284
TMEM106C	12	48357330	48362661	0,283
PIP4K2A	10	22823766	23003503	0,281
CEP57	11	95523642	95565854	0,280
UBAP2	9	33921691	34048947	0,280
DUT	15	48623621	48635570	0,280
B4GALT5	20	48249483	48330421	0,279
GOLM1	9	88641058	88715116	0,278
NCAPD3	11	134022337	134094426	0,274
SREBF2	22	42229106	42302375	0,274
MSH6	2	48010221	48034058	0,274
LRRC58	3	120043576	120068186	0,273
GPI	19	34855645	34893318	0,272
PCNA	20	5095599	5107268	0,271
SLC16A2	X	73641085	73753752	0,270
ECT2	3	172472298	172539263	0,270
C5orf62	5	150157508	150176298	0,269
EZR	6	159186773	159240456	0,269
SMC1A	X	53401070	53449618	0,268
HS2ST1	1	87380335	87575681	0,268
CKAP5	11	46765084	46867843	0,267
TJP2	9	71736224	71870124	0,265
LMNB2	19	2428164	2456958	0,262
RPA1	17	1733273	1802848	0,262
FBXW5	9	139834887	139839173	0,261
ARL6IP1	16	18802991	18812857	0,259
NUP62	19	50410084	50432773	0,258
LDLR	19	11200038	11244505	0,255
RUSC1	1	155291487	155300909	0,255
XPO6	16	28109316	28223190	0,252
NUMA1	11	71713911	71780957	0,252
MTHFD1	14	64854759	64926725	0,251
DENND3	8	142138720	142205900	0,251
DPYSL3	5	146770371	146889619	0,250
NRP2	2	206547224	206662857	0,249
NFATC2IP	16	28962318	28977767	0,248
CEP250	20	34043223	34099803	0,247
H1FO	22	38201114	38203443	0,245
EXOC3	5	443334	467409	0,244
DDAH1	1	85784168	86044046	0,243
KIAA1462	10	30301729	30348488	0,242
WHSC1	4	1873123	1983934	0,241
PARP1	1	226548392	226595801	0,237
ABI2	2	204193003	204296892	0,235

<i>IQSEC1</i>	3	12938719	13114617	0,235
<i>IPO9</i>	1	201798288	201853422	0,230
<i>CTDSPL</i>	3	37903669	38025960	0,230
<i>PLXNB1</i>	3	48445261	48471460	0,227
<i>RAD23B</i>	9	110045544	110094470	0,227
<i>OGDH</i>	7	44646121	44748669	0,225
<i>TSPAN9</i>	12	3186521	3395730	0,224
<i>MIB1</i>	18	19321545	19450912	0,224
<i>SORT1</i>	1	109852192	109940563	0,221
<i>TYK2</i>	19	10461204	10491248	0,219
<i>COPS8</i>	2	237994084	238007489	0,217
<i>ZCCHC24</i>	10	81142083	81205383	0,216
<i>SPECC1L</i>	22	24666786	24813708	0,210
<i>HMGCR</i>	5	74632993	74657926	0,210
<i>AP2B1</i>	17	33914282	34053436	0,205
<i>AGFG1</i>	2	228336888	228425938	0,202
<i>ETS2</i>	21	40177849	40196878	0,199
<i>FAM126A</i>	7	22980878	23053770	0,196
<i>ARMC9</i>	2	232063342	232209914	0,196
<i>ZFP36L1</i>	14	69254375	69259785	0,195
<i>MAPKAPK2</i>	1	206858289	206907626	0,194

Tabla suplementaria II. Lista de genes reprimidos por Wnt3A en la línea de fibroblastos de colon humano CCD-18Co. Los genes con FDR<0,05 aparecen ordenados de mayor a menor represión (logFC).

Gen	Cromosoma	Inicio	Fin	logFC
<i>IL1RL1</i>	2	102927962	102968497	-1,772
<i>C10orf81</i>	10	115511213	115542192	-1,716
<i>LOC100130331</i>	1	238025475	238091619	-1,577
<i>F2RL2</i>	5	75911307	75919240	-1,466
<i>AKR1B10</i>	7	134212344	134226166	-1,417
<i>SLC7A2</i>	8	17354597	17428077	-1,414
<i>TSPAN12</i>	7	120427374	120498177	-1,404
<i>ANGPTL4</i>	19	8429011	8439257	-1,348
<i>FGF7</i>	15	49715375	49779523	-1,345
<i>KRT4</i>	12	53200333	53208335	-1,338
<i>CMKLR1</i>	12	108681821	108733094	-1,336
<i>TACR1</i>	2	75273590	75426645	-1,326
<i>FOS</i>	14	75745481	75748937	-1,325
<i>INHBB</i>	2	121103719	121109383	-1,241
<i>PTGIR</i>	19	47123725	47128354	-1,219
<i>TNFAIP6</i>	2	152214106	152236562	-1,208
<i>TMOD1</i>	9	100263462	100362361	-1,199
<i>RASL11B</i>	4	53728495	53733002	-1,168
<i>LOC100499467</i>	17	70399463	70588943	-1,144
<i>CLDN1</i>	3	190023490	190040235	-1,103
<i>FLT1</i>	13	28874483	29069265	-1,100
<i>GRIA4</i>	11	105480800	105852819	-1,094
<i>VWF</i>	12	6058040	6233836	-1,094
<i>IL1RN</i>	2	113875470	113891593	-1,059
<i>PTX3</i>	3	157154580	157161417	-1,047
<i>KCNE4</i>	2	223916862	223920355	-1,037
<i>CXCL1</i>	4	74735109	74736955	-0,985
<i>TMEM37</i>	2	120189446	120196096	-0,984
<i>PAQR5</i>	15	69591294	69699976	-0,960
<i>OVCH1</i>	12	29580489	29650619	-0,948
<i>RASL11A</i>	13	27844464	27847827	-0,939
<i>POPDC3</i>	6	105605775	105627858	-0,938
<i>GPRC5A</i>	12	13043956	13066600	-0,933
<i>ADAMTS9</i>	3	64501331	64673365	-0,932
<i>IGFBP3</i>	7	45951844	45960871	-0,925
<i>TSPAN15</i>	10	71211226	71267423	-0,914
<i>FZD8</i>	10	35927177	35930362	-0,912
<i>NTNG2</i>	9	135037334	135118220	-0,896
<i>MYOCD</i>	17	12569207	12670651	-0,886
<i>NMNAT2</i>	1	183217379	183387737	-0,874
<i>MCTP1</i>	5	94042289	94620279	-0,870
<i>IL8</i>	4	74606275	74609433	-0,864
<i>TRPA1</i>	8	72933486	72987819	-0,862
<i>SFMBT2</i>	10	7200586	7453448	-0,856

PTGS1	9	125133229	125157981	-0,838
FZD4	11	86656721	86666433	-0,836
LRRTM2	5	138205079	138211057	-0,832
KBTBD7	13	41765711	41768702	-0,832
DIO2	14	80663869	80678525	-0,829
NBPF3	1	21766631	21811393	-0,825
MTERFD3	12	107371069	107380929	-0,818
NPTX1	17	78440633	78450404	-0,799
FIBIN	11	27015628	27018632	-0,793
FST	5	52776595	52781904	-0,785
SLCO2B1	11	74862032	74917445	-0,785
OSGIN1	16	83982672	83999937	-0,774
MAN1C1	1	25943959	26111258	-0,771
KCNH1	1	210851657	211307457	-0,769
FOSB	19	45971253	45978437	-0,763
IL6ST	5	55230925	55290821	-0,762
TTC28-AS1	22	28315364	28398667	-0,746
GPR56	16	57653910	57698944	-0,742
PLEKHA6	1	204187981	204329044	-0,742
PTGES	9	132500615	132515344	-0,733
CYP26B1	2	72356367	72374963	-0,730
KYNU	2	143635195	143799885	-0,726
NTN4	12	96051583	96184536	-0,724
IL15RA	10	5994334	6020142	-0,723
RGS2	1	192778169	192781407	-0,718
PTGR1	9	114312002	114362135	-0,718
ARHGAP28	18	6834432	6915712	-0,714
CHRM3	1	239792373	240072717	-0,713
DNAH5	5	13690437	13944589	-0,713
MSC	8	72753777	72756731	-0,712
RAB27B	18	52495840	52557211	-0,711
CASP1	11	104896237	104905201	-0,708
IGFBP5	2	217536828	217560272	-0,701
LOC728392	17	5402747	5404319	-0,698
KCNF1	2	11052063	11054351	-0,697
CCL2	17	32582296	32584220	-0,695
FGF9	13	22245215	22278640	-0,690
ABCA1	9	107543284	107690527	-0,687
PLA2G4A	1	186798032	186958113	-0,678
NUDT11	X	51232863	51239459	-0,677
SGK1	6	134490384	134639196	-0,674
GPR126	6	142623056	142767403	-0,674
CSF1	1	110453233	110472355	-0,672
SEMA6D	15	47476403	48066420	-0,670
HTR7	10	92500576	92617671	-0,669
RDH10	8	74207265	74237516	-0,668
TRPM2	21	45773484	45862964	-0,663
C4orf49	4	140187317	140201492	-0,661
WNT16	7	120965421	120981158	-0,658
THBD	20	23026270	23030301	-0,657

MAF	16	79627745	79634622	-0,655
TFPI	2	188328958	188419219	-0,649
FOXL1	16	86612115	86615304	-0,642
NFE2L2	2	178095033	178129859	-0,640
IL6	7	22766766	22771621	-0,638
PCDH18	4	138440074	138453629	-0,634
PPARG	3	12329349	12475855	-0,632
DTX4	11	58939812	58975982	-0,629
SMPDL3A	6	123109971	123130864	-0,627
HACE1	6	105175968	105307794	-0,626
UGCG	9	114659206	114695433	-0,624
STON1	2	48757308	48825654	-0,624
PDGFRA	4	55095264	55164412	-0,624
CARD16	11	104912053	104916051	-0,621
JAG1	20	10618332	10654694	-0,620
SLC30A1	1	211748381	211752099	-0,618
ADAMTS1	21	28208606	28217728	-0,617
ATP8B4	15	50150435	50411419	-0,612
GPR68	14	91698876	91720224	-0,611
LRRC20	10	72058729	72142382	-0,607
SLC9A9	3	142984064	143567373	-0,606
SVIL	10	29746277	30024730	-0,605
TBXAS1	7	139478047	139720125	-0,605
ODC1	2	10580508	10588453	-0,600
BDKRB1	14	96722559	96731100	-0,598
EPHA4	2	222282747	222437010	-0,592
GRK5	10	120967197	121215131	-0,591
HLX	1	221052743	221058400	-0,589
KIAA1217	10	23983675	24836772	-0,581
VEPH1	3	156977532	157221415	-0,579
PLAU	10	75672043	75677258	-0,578
TNFRSF11B	8	119935796	119964383	-0,570
FLT3LG	19	49977486	49989488	-0,570
BANK1	4	102711764	102995969	-0,568
CXCR7	2	237478380	237490994	-0,567
SRXN1	20	627268	633890	-0,567
TXNRD1	12	104609559	104744062	-0,567
CEBPD	8	48649476	48650726	-0,566
MAMLD1	X	149531551	149682448	-0,562
SLC7A11	4	139085248	139163503	-0,560
ODZ1	X	123509756	124097666	-0,560
RPS6KA2	6	166822854	167275771	-0,559
IL6R	1	154377669	154440188	-0,556
ABCC3	17	48712218	48769063	-0,555
GBP4	1	89646831	89664633	-0,553
PRKAR2B	7	106685178	106802256	-0,552
REEP2	5	137774776	137782658	-0,546
F2R	5	76011868	76031595	-0,545
DACT1	14	59104757	59115038	-0,543
DSEL	18	65173819	65183782	-0,543

KLF9	9	72999513	73029573	-0,539
TM4SF1	3	149086805	149095568	-0,538
GCLC	6	53362140	53409927	-0,537
STK32B	4	5053527	5502725	-0,537
GNG11	7	93551016	93555826	-0,537
AVPI1	10	99437181	99447015	-0,536
ZBTB49	4	4291924	4323513	-0,533
HGF	7	81331444	81399452	-0,533
ETV7	6	36333971	36355467	-0,531
SCAI	9	127704888	127905838	-0,529
TSPAN2	1	115590633	115632121	-0,528
GBP2	1	89573310	89591799	-0,524
ITGB3	17	45331208	45390077	-0,522
SALL1	16	51169886	51185183	-0,520
PMP22	17	15133096	15168644	-0,520
DGKG	3	185864990	186080023	-0,519
ZRANB1	10	126630692	126676005	-0,516
RIPK2	8	90769975	90803292	-0,515
CLEC2B	12	10004968	10022458	-0,512
TBX2	17	59477257	59486827	-0,512
VEGFA	6	43737946	43754223	-0,512
GJA1	6	121756745	121770873	-0,512
STARD13	13	33677272	33859901	-0,508
PXK	3	58318617	58410878	-0,506
TSPYL2	X	53111542	53117728	-0,505
C2CD2	21	43305219	43373999	-0,504
C2orf89	2	85048796	85108252	-0,504
PTPRE	10	129705325	129884164	-0,501
MAFF	22	38597939	38612517	-0,500
SOD2	6	160100149	160114353	-0,499
NAMPT	7	105888732	105925638	-0,496
NCOA7	6	126102307	126253176	-0,496
CD44	11	35160417	35253949	-0,494
MALAT1	11	65265233	65273939	-0,492
ID1	20	30193092	30194313	-0,491
C4orf34	4	39552546	39640481	-0,489
AOX1	2	201450731	201536217	-0,489
OSGIN2	8	90914096	90940095	-0,487
SLC16A14	2	230899690	230933715	-0,486
ACSL4	X	108884564	108976621	-0,484
SH2D4A	8	19171081	19253729	-0,482
SH2D5	1	21046225	21059133	-0,481
AHCYL1	1	110527308	110566364	-0,480
CASP4	11	104813594	104839325	-0,480
MORN4	10	99374310	99393913	-0,474
LYAR	4	4269429	4291896	-0,473
BCKDHB	6	80816344	81055987	-0,472
HERC4	10	69681656	69835103	-0,472
WWTR1	3	149235022	149421060	-0,471
PDGFD	11	103777914	104035027	-0,470

EFEMP1	2	56093102	56150932	-0,470
TMEM164	X	109245863	109421016	-0,470
TNS3	7	47314752	47621742	-0,464
IL12A	3	159706629	159713806	-0,464
GSR	8	30535580	30585486	-0,464
CTGF	6	132269317	132272518	-0,463
LEPREL1	3	189674517	189840226	-0,458
PTGER4	5	40680032	40693837	-0,458
ABCC1	16	16043434	16236930	-0,457
KITLG	12	88886570	88974250	-0,457
FLJ36031	7	106297211	106301634	-0,453
ARRDC3	5	90664541	90679149	-0,451
MGST1	12	16500076	16517344	-0,449
FZD1	7	90893783	90898132	-0,449
PARM1	4	75858285	75975325	-0,449
RPS25	11	118886456	118889057	-0,447
PSD3	8	18384813	18871196	-0,447
GAB1	4	144257983	144395718	-0,445
PVRL3	3	110790865	110853062	-0,445
FAM46A	6	82455447	82462428	-0,444
HERC3	4	89513647	89629686	-0,443
ALPL	1	21835858	21904905	-0,443
TMEM22	3	136537861	136574734	-0,441
THSD4	15	71433788	72075722	-0,440
HSD17B2	16	82068858	82132139	-0,439
RGS20	8	54764368	54871863	-0,434
GTF2F2	13	45694631	45858239	-0,433
SPSB1	1	9352941	9429590	-0,432
PELI2	14	56585093	56768031	-0,432
NAV1	1	201617450	201796102	-0,429
IRAK2	3	10206563	10285427	-0,427
PLCB4	20	9049701	9461462	-0,426
FHL1	X	135228861	135293518	-0,425
OAF	11	120081747	120100650	-0,425
VWA5A	11	123986111	124017618	-0,423
PNRC1	6	89790429	89794879	-0,417
LPAR1	9	113636054	113800365	-0,415
FAM69A	1	93307721	93427079	-0,413
CHST11	12	104850692	105155792	-0,413
CRYBB2P1	22	25844054	25857645	-0,413
LIF	22	30636442	30642796	-0,413
DLC1	8	12940872	13372429	-0,413
UGDH	4	39500375	39529218	-0,410
TDP2	6	24650205	24667115	-0,408
PMEPA1	20	56223452	56286541	-0,407
ELK4	1	205585235	205602000	-0,406
ZBTB43	9	129567285	129600487	-0,406
TBC1D8	2	101623690	101767846	-0,406
APOL3	22	36536371	36562225	-0,404
TSLP	5	110407390	110413722	-0,403

PRNP	20	4666797	4682234	-0,403
LRRRC37BP1	17	28903483	28964484	-0,401
C9orf6	9	111696673	111703237	-0,401
FBXO30	6	146119272	146135921	-0,395
FHL2	2	105977283	106055230	-0,394
MINPP1	10	89264223	89313218	-0,393
TXN	9	113006310	113018778	-0,388
SYNE1	6	152442822	152958534	-0,387
PDE5A	4	120415550	120549981	-0,384
NQO1	16	69743304	69760533	-0,382
SMURF2	17	62540735	62658386	-0,381
PITPNM2	12	123468027	123594975	-0,381
COL15A1	9	101706138	101833068	-0,380
PRPS1	X	106871654	106894256	-0,379
PRSS23	11	86511491	86522273	-0,379
PGD	1	10459085	10480201	-0,377
HPSE	4	84213614	84256306	-0,377
RGS3	9	116207011	116360018	-0,377
KCNJ6	21	38996786	39288696	-0,376
MXRA5	X	3226609	3264684	-0,374
IL4R	16	27325251	27376099	-0,371
BDKRB2	14	96671135	96710666	-0,370
GLA	X	100652779	100663001	-0,370
DPYD	1	97543300	98386615	-0,368
PLEKHG4	16	67311413	67323392	-0,368
PPP1R3C	10	93388199	93392858	-0,367
CLN8	8	1711870	1734736	-0,365
NAPB	20	23355156	23402156	-0,364
CEBPB	20	48807376	48809212	-0,361
F3	1	94994732	95007413	-0,361
APOL2	22	36622255	36636000	-0,360
TALDO1	11	747432	765024	-0,359
PPA1	10	71962586	71993190	-0,359
RRAS2	11	14299466	14386052	-0,359
ABHD16A	6	31654726	31671137	-0,357
APOBEC3G	22	39473010	39483748	-0,357
RND3	2	151324710	151344180	-0,356
ARHGEF6	X	135747712	135863503	-0,356
MAPRE3	2	27193525	27250087	-0,355
DSE	6	116601283	116759442	-0,355
RIT1	1	155867601	155881177	-0,353
C14orf156	14	78174425	78183941	-0,352
FGF2	4	123747863	123819390	-0,347
ATP8B1	18	55313659	55470327	-0,346
SAV1	14	51100360	51135023	-0,346
SCN9A	2	167051697	167232497	-0,345
SSBP3	1	54692195	54871979	-0,344
B4GALT4	3	118930589	118959752	-0,343
ZNF295	21	43406940	43430496	-0,342
HMGA1	6	34204577	34214008	-0,342

C12orf23	12	107349544	107367813	-0,341
BCL6	3	187439165	187463513	-0,341
LOC645638	17	58160927	58165828	-0,341
UCK2	1	165796732	165880855	-0,340
SOX6	11	15987995	16497935	-0,340
CLDN23	8	8559666	8561617	-0,339
UACA	15	70946893	71055850	-0,338
RGS10	10	121259339	121302222	-0,337
TRIM13	13	50571143	50592603	-0,337
TBC1D2B	15	78287327	78369994	-0,337
TMEM158	3	45265956	45267814	-0,336
NCK1	3	136581050	136667968	-0,335
COL4A1	13	110801310	110959496	-0,334
RAB23	6	57053582	57087078	-0,334
SQRDL	15	45927256	45983479	-0,334
SH3KBP1	X	19552083	19905744	-0,333
EGFR	7	55086725	55275031	-0,333
MLLT11	1	151032151	151040973	-0,332
GCLM	1	94352590	94375012	-0,331
NUB1	7	151038858	151075532	-0,331
ARSI	5	149675909	149682525	-0,329
ABHD5	3	43732375	43764217	-0,329
BMP2	20	6748745	6760910	-0,328
FTL	19	49468566	49470136	-0,327
TSC22D1	13	45007655	45150701	-0,327
C17orf91	17	1614798	1619566	-0,326
PSMB9	6	32821938	32827628	-0,326
GLRX	5	95149553	95158577	-0,326
PLEKHA4	19	49340354	49371884	-0,325
RPP14	3	58291972	58305920	-0,324
FBN1	15	48700503	48937985	-0,324
PLIN2	9	19115759	19127573	-0,324
SEC22B	1	145096407	145116922	-0,323
ATP1B1	1	169075947	169101768	-0,323
RBPM5	8	30241944	30429734	-0,323
SYNJ2	6	158402888	158520207	-0,323
PLAT	8	42032236	42065194	-0,322
NPC1	18	21111463	21166581	-0,321
IFT57	3	107879659	107941417	-0,320
EMP1	12	13349602	13369708	-0,320
C12orf10	12	53693470	53700965	-0,320
BTRC	10	103113825	103317070	-0,318
GSTM3	1	110276554	110283660	-0,317
EEA1	12	93166285	93323107	-0,316
NLK	17	26369688	26523404	-0,316
TMEM173	5	138855113	138862343	-0,316
IRF1	5	131817301	131826465	-0,316
LHFPL2	5	77781038	77944648	-0,315
PNMA1	14	74178486	74181128	-0,315
SYNPO	5	149980642	150038792	-0,314

MASP1	3	186933873	187009810	-0,313
STOM	9	124101353	124132545	-0,313
DPP4	2	162848755	162931052	-0,312
PDE1C	7	31792632	32338383	-0,311
TRNP1	1	27320195	27327377	-0,311
EXT1	8	118811602	119124058	-0,310
EPAS1	2	46524541	46613842	-0,310
CTSO	4	156845270	156875048	-0,309
PTPRK	6	128289924	128841819	-0,309
ME1	6	83920110	84140938	-0,307
ABHD4	14	23067147	23081265	-0,307
STAG1	3	136055999	136471245	-0,305
SPCS3	4	177241090	177253396	-0,302
SEL1L3	4	25749049	25864610	-0,301
MAP4K3	2	39476422	39664219	-0,300
GPC6	13	93879078	95060273	-0,300
SASH1	6	148663729	148873184	-0,299
LIMA1	12	50569563	50677353	-0,298
BASP1	5	17217750	17276943	-0,298
CSDA	12	10851676	10875953	-0,298
ATP6V1A	3	113465866	113530905	-0,297
APOL6	22	36044424	36064456	-0,295
GBP1	1	89517987	89531043	-0,295
PPIF	10	81107220	81115089	-0,294
FAM26E	6	116832808	116839709	-0,293
DNAJC6	1	65730430	65881552	-0,292
GALM	2	38893052	38961909	-0,292
HRH1	3	11178779	11304939	-0,288
MINA	3	97660661	97691295	-0,288
ERP44	9	102741463	102861330	-0,287
ELL2	5	95220802	95297775	-0,287
POMP	13	29233141	29253093	-0,286
EPHX1	1	225997797	226033232	-0,286
CLIP2	7	73703805	73820273	-0,285
CLIP4	2	29338308	29406679	-0,285
CHL1	3	238650	451097	-0,281
ENAH	1	225674534	225840845	-0,281
DDX47	12	12966280	12982915	-0,281
COTL1	16	84599204	84651669	-0,280
HIF1A	14	62162119	62214977	-0,279
PRDX1	1	45976740	45987609	-0,279
ABLIM3	5	148521054	148639999	-0,278
ADAMTS5	21	28290231	28339439	-0,277
ALDH9A1	1	165631449	165667900	-0,277
ZFAND5	9	74966341	74980163	-0,276
FAM129B	9	130267618	130341268	-0,274
BET1	7	93621000	93633690	-0,274
CDCP1	3	45123769	45187914	-0,274
SIPA1L1	14	71996042	72206120	-0,273
PRKAA1	5	40759481	40798297	-0,273

BTG1	12	92534054	92539673	-0,271
MYLK	3	123331143	123603149	-0,271
C16orf72	16	9185537	9213555	-0,270
ARHGAP17	16	24930712	25026675	-0,270
MAT2A	2	85766288	85772403	-0,270
DHX32	10	127525125	127569884	-0,269
RGNEF	5	72921983	73237818	-0,268
RICTOR	5	38938022	39074501	-0,267
CREB3L1	11	46299228	46342972	-0,266
C3orf23	3	44379611	44450940	-0,264
CD47	3	107761941	107809935	-0,263
NMD3	3	160939099	160969795	-0,263
FADS3	11	61640998	61659006	-0,261
NIPAL3	1	24742245	24799473	-0,261
BAG3	10	121410882	121437329	-0,261
SQSTM1	5	179233388	179265077	-0,260
AKR1B1	7	134127107	134143888	-0,260
MCTP2	15	94841430	95027181	-0,260
LIMD1	3	45636323	45722755	-0,260
CDR2	16	22357257	22385938	-0,260
ANKH	5	14704909	14871887	-0,258
PCSK6	15	101844133	102030187	-0,257
CASK	X	41374189	41782287	-0,256
PRRG1	X	37208528	37316548	-0,255
CYB561	17	61509665	61523722	-0,255
ZEB1	10	31608101	31818742	-0,254
TNPO1	5	72112418	72210215	-0,253
PLK2	5	57749810	57755913	-0,253
MPHOSPH6	16	82181767	82203829	-0,251
AGPS	2	178257471	178408564	-0,251
SMURF1	7	98625058	98741743	-0,250
CBR1	21	37442285	37445462	-0,248
ATXN10	22	46067678	46241187	-0,247
SMARCA1	X	128580478	128657460	-0,247
BACH1	21	30671220	30734217	-0,247
DUSP10	1	221874766	221915461	-0,246
TMEM176B	7	150488376	150498448	-0,246
SYNM	15	99645286	99675800	-0,243
CD9	12	6309555	6347427	-0,243
RFTN1	3	16357352	16555222	-0,242
AXL	19	41725108	41767671	-0,239
PGRMC1	X	118370211	118378429	-0,239
TMEM43	3	14166440	14185180	-0,238
DHRS7	14	60611500	60632211	-0,238
PPP3CA	4	101944587	102268628	-0,238
LACTB	15	63413999	63434260	-0,238
UXS1	2	106709759	106810795	-0,237
SHANK2	11	70313961	70935808	-0,237
G6PD	X	153759606	153775233	-0,236
TMCO1	1	165693528	165738135	-0,236

PRKAB2	1	146626685	146644129	-0,236
YIPF5	5	143537729	143550278	-0,235
JKAMP	14	59951161	59972081	-0,234
TNFRSF1A	12	6437923	6451283	-0,232
C20orf111	20	42825136	42839431	-0,231
ATP2B4	1	203595928	203713209	-0,231
TPCN1	12	113659260	113736389	-0,230
VGLL3	3	86987123	87040257	-0,229
GBE1	3	81538850	81810950	-0,229
GFPT1	2	69546905	69614382	-0,228
LRP11	6	150139894	150185480	-0,228
RALA	7	39663162	39747717	-0,224
PVR	19	45147098	45169428	-0,224
PNMA2	8	26362196	26371483	-0,224
UBE2H	7	129472995	129592789	-0,224
GNA13	17	63005407	63052920	-0,224
LIMS1	2	109150857	109303702	-0,223
TKT	3	53258724	53290130	-0,222
ARL6IP5	3	69134090	69155239	-0,217
USP46	4	53457127	53525502	-0,217
PTK2	8	141668481	142011412	-0,217
NBR1	17	41322498	41363707	-0,216
SLC3A2	11	62623484	62656355	-0,216
LPCAT1	5	1461542	1524076	-0,216
PSMA3	14	58711593	58738726	-0,212
TMBIM4	12	66530717	66563807	-0,207
MMADHC	2	150426147	150444330	-0,201
TAPBP	6	33267472	33282164	-0,200
SMAD3	15	67358195	67487533	-0,191
TXNIP	1	145438462	145442628	-0,186

Publicaciones

El trabajo realizado en esta Tesis doctoral ha dado lugar al siguiente artículo:

Núria Niell, Isabel Sánchez-Pérez, María Jesús Larriba, Gemma Ferrer-Mayorga, Ramón Cantero, Luis del Peso, Alberto Muñoz y José Manuel González-Sancho. The human PKP2/Plakophilin-2 gene is induced by Wnt/ β -catenin in normal and cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis* (enviado).

Además, durante la realización de esta Tesis doctoral, la doctoranda ha participado en los siguientes trabajos, de los que es co-autora:

Óscar Aguilera, José Manuel González-Sancho, Sandra Zazo, Agustín F. Fernández, Olga Tapia, Francesc Canals, Beatriz Morte, Vincenzo Calvanese, José L. Orgaz, **Núria Niell**, Susana Aguilar, José M.P. Freije, Osvaldo Graña, David G. Pisano, Aurea Borrero, Javier Martínez-Useros, Benilde Jiménez, Mario F. Fraga, Carlos López-Otín, Miguel Lafarga, Federico Rojo y Alberto Muñoz. (2015) Nuclear DICKKOPF-1 as a biomarker of chemoresistance and poor clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget*, 6, 5903-5917.

María Jesús Larriba, José Manuel González-Sancho, Antonio Barbáchano, **Núria Niell**, Gemma Ferrer-Mayorga y Alberto Muñoz. (2013) Vitamin D Is a Multilevel Repressor of Wnt/ β -Catenin Signaling in Cancer Cells. *Cancers*, 5, 1242-1260.